(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- (43) Дата публикации заявки 2023.05.23
- (22) Дата подачи заявки 2021.02.23

(51) Int. Cl. C12N 5/0783 (2010.01) C07K 14/725 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01) A61K 31/663 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ РАЗМНОЖЕНИЯ Т-КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА И СВЯЗАННЫХ С НИМ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

- (31) 62/980,844; 63/038,008; 63/082,881
- (32) 2020.02.24; 2020.06.11; 2020.09.24
- (33) US
- (86) PCT/US2021/019252
- (87) WO 2021/173560 2021.09.02
- (71) Заявитель: ИММАТИКС ЮС, ИНК. (US)
- (72) Изобретатель:
 Мата Мелинда, Карла Мамта,
 Мохамед Али, Вальтер Штеффен,
 Буллиард Янник (US)
- (74) Представитель:
 Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
 Ш.Ф., Угрюмов В.М., Гизатуллина
 Е.М., Строкова О.В., Джермакян Р.В.
 (RU)

202292452

(57) Способ размножения γδ Т-клеток in vitro включает выделение γδ Т-клеток из образца крови человека-субъекта, активацию выделенных γδ Т-клеток в присутствии аминобисфосфоната и/или питающей клетки и по меньшей мере одного цитокина, размножение активированных γδ Т-клеток и, необязательно, повторную стимуляцию размноженных γδ Т-клеток.











СПОСОБЫ РАЗМНОЖЕНИЯ Т-КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА И СВЯЗАННЫХ С НИМ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

<u>ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В</u> ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0001] Официальная копия перечня последовательностей представлена в электронном виде через EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII с именем файла «3000011-020977_Seq_Listing_ST25.txt», созданного 22 февраля 2021 г., имеющего размер 51 360 байт и поданного одновременно с данным описанием изобретения. Перечень последовательностей, содержащийся в этом документе формата ASCII, является частью описания изобретения и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] 1. Область техники

[0003] Настоящее изобретение относится к размножению и активации Т-клеток. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к размножению и активации γδ Т-клеток, которые можно использовать для экспрессии трансгена. В другом варианте осуществления изобретение относится к размножению и активации γδ Т-клеток при одновременном истощении α- и/или β-ТСR-положительных клеток. Настоящее изобретение также предлагает популяции Т-клеток, включающие в себя размноженные γδ Т-клетки и истощенные или обедненные α- и/или β-ТСR-положительные клетки. Настоящее изобретение дополнительно предлагает способы применения раскрытых популяций Т-клеток.

[0004] 2. Уровень техники

[0005] νδ Т-клетки представляют собой Т-клеток, подмножество экспрессирующих уб TCR вместо αβ TCR. уб Т-клетки можно разделить на два основных подмножества – связанные с тканью $V\delta 2$ -отрицательные клетки и периферические циркулирующие $V\delta 2$ -положительные клетки, в частности $V\gamma 9\delta 2$. показано. что оба подмножества обладают противовирусной противоопухолевой активностью. В отличие от обычных клеток, экспрессирующих αβ TCR, клетки, экспрессирующие уδ TCR, распознают свои мишени независимо от классических МНС I и II. Подобно естественным Т-клеткам-киллерам (NK), уб Тэкспрессируют NKG2D, который связывается с клетки неклассическими молекулами MHC. e. С родственной полипептиду **MHC** Т. класса последовательностью A (MICA) и родственной полипептиду МНС класса I последовательностью В (МІСВ), присутствующими на стрессовых клетках и/или опухолевых клетках. уб ТСR распознает множество лигандов, например связанный со стрессом и/или с опухолью фосфоантиген. уб Т-клетки опосредуют прямой цитолиз своих мишеней с помощью нескольких механизмов, а именно, секреции TRAIL, FasL, перфорина и гранзима. Кроме того, уб Т-клетки, экспрессирующие CD16, усиливают антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC).

[0006] Проблема с уб Т-клетками, которые обычно присутствуют в периферической крови в количестве всего лишь от 1 до 5 %, заключается в том, что невозможно обеспечить чистоту и численность уб Т-клеток, достаточную для лечения, особенно если собирают небольшое количество крови и затем из него эти клетки активируют и/или размножают. Увеличение количества взятой у пациента крови для обеспечения чистоты и численности уб Т-клеток, достаточных для лечения, также представляет собой проблему, поскольку это создает большую нагрузку на пациента.

[0007] Сохраняется потребность в способах, которые позволяли бы получать достаточное число уб Т-клеток в качестве коммерчески реализуемого терапевтического продукта. Решение этой технической проблемы предлагается в вариантах осуществления, описанных в формуле изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Настоящее изобретение предлагает метод размножения уб Т-клеток, включающий выделение уб Т-клеток из образца крови человека-субъекта, активацию выделенных уб Т-клеток в присутствии питающей клетки и по меньшей мере одного цитокина и размножение активированных уб Т-клеток.

[0009] Настоящее изобретение предлагает также способ размножения уб Т-клеток, включающий выделение уб Т-клеток из образца крови человека-субъекта, активацию выделенных уб Т-клеток в присутствии по меньшей мере одного цитокина и одного или нескольких из 1) аминобисфосфоната, 2) питающей клетки

или 3) аминобисфосфоната и питающей клетки, размножение активированных уб Т-клеток и повторное стимулирование размноженных уб Т-клеток.

[0010] В одном варианте осуществления образец крови представляет собой продукт лейкафереза.

[0011] В одном варианте осуществления образец крови представляет собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

[0012] В некоторых вариантах осуществления активация осуществляется в присутствии аминобисфосфоната.

[0013] В некоторых вариантах осуществления аминобисфосфонат представляет собой памидроновую кислоту, алендроновую кислоту, золедроновую кислоту, ризедроновую кислоту, ибандроновую кислоту, инкадроновую кислоту, их соль и/или их гидрат.

[0014] В некоторых вариантах осуществления аминобисфосфонат представляет собой золедроновую кислоту.

[0015] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один цитокин выбран из группы, состоящей из интерлейкина (ИЛ)-1, ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-15, ИЛ-21, интерферона (IFN)- α и IFN- β .

[0016] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один цитокин представляет собой ИЛ-2 и ИЛ-15.

[0017] В одном варианте осуществления выделение заключается в приведении образца крови в контакт с антителами к α - и β -Т-клеточному рецептору (TCR) и удалении α - и/или β -TCR-положительных клеток из образца крови.

[0018] В одном варианте осуществления питающая клетка представляет собой опухолевую клетку или линию лимфобластоидных клеток.

[0019] В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка представляет собой клетку К562.

[0020] В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка представляет собой сконструированную опухолевую клетку, содержащую по меньшей мере один рекомбинантный белок.

[0021] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из CD86, 4-1BBL, ИЛ-15 и любой их комбинации.

[0022] В некоторых вариантах осуществления ИЛ-15 представляет собой связанный с мембраной ИЛ-15.

[0023] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один рекомбинантный белок представляет собой 4-1BBL и/или связанный с мембраной ИЛ-15.

[0024] В некоторых вариантах осуществления питающая клетка является облученной.

[0025] В некоторых вариантах осуществления выделенные $\gamma\delta$ Т-клетки и питающую клетку смешивают в соотношении от примерно 1:1 до примерно 50:1 (питающая клетка: выделенные $\gamma\delta$ Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления выделенные $\gamma\delta$ Т-клетки и питающая клетка присутствуют в соотношении от примерно 2:1 до примерно 20:1 (питающая клетка: выделенные $\gamma\delta$ Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления размноженные $\gamma\delta$ Т-клетки и питающая клетка присутствуют в соотношении примерно 1:1, примерно 1:5:1, примерно 2:1, примерно 3:1, примерно 4:1, примерно 5: 1, примерно 6:1, примерно 7:1, примерно 8:1, примерно 9:1, примерно 10:1, примерно 11:1, примерно 12:1, примерно 13:1, примерно 14:1, примерно 15: 1, примерно 20:1, примерно 25:1, примерно 30:1, примерно 35:1, примерно 40:1, примерно 45:1 или примерно 50:1 (питающие клетки: размноженные $\gamma\delta$ Т-клетки).

[0026] В одном варианте осуществления способ по настоящей заявке дополнительно включает трансдукцию активированных уб Т-клеток рекомбинантным вирусным вектором перед проведением размножения.

[0027] В одном варианте осуществления размножение проводится в отсутствие аминобисфосфоната и в присутствии по меньшей мере одного цитокина, такого как, например, ИЛ-2 и/или ИЛ-15.

[0028] В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению включает повторную стимуляцию размноженных уб Т-клеток.

[0029] В некоторых вариантах осуществления повторная стимуляция заключается в приведении в контакт размноженных уб Т-клеток с дополнительной

питающей клеткой, которая может быть такой же или отличной от питающей клетки, используемой во время активации (если она присутствует).

[0030] В некоторых вариантах осуществления размноженные уб Т-клетки и дополнительную питающую клетку смешивают в соотношении от примерно 1:1 до примерно 50:1 (дополнительная питающая клетка: размноженные уб Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления размноженные уб Т-клетки и дополнительная питающая клетка присутствуют в соотношении от примерно 2:1 до примерно 20:1 (дополнительная питающая клетка: размноженные уб Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления размноженные уб Т-клетки и питающая клетка присутствуют в соотношении примерно 1:1, примерно 1:5:1, примерно 2:1, примерно 3:1, примерно 4:1, примерно 5: 1, примерно 6:1, примерно 7:1, примерно 8:1, примерно 9:1, примерно 10:1, примерно 11:1, примерно 12:1, примерно 13:1, примерно 14:1, примерно 15: 1, примерно 20:1, примерно 25:1, примерно 30:1, примерно 35:1, примерно 40:1, примерно 45:1 или примерно 50:1 (питающие клетки: размноженные уб Т-клетки).

[0031] В одном варианте осуществления дополнительная питающая клетка выбрана из группы, состоящей из моноцитов, МКПК и их комбинаций.

[0032] В некоторых вариантах осуществления дополнительная питающая клетка является аутологичной для человека-субъекта.

[0033] В некоторых вариантах осуществления дополнительная питающая клетка является аллогенной для человека-субъекта.

[0034] В некоторых вариантах осуществления дополнительная питающая клетка обеднена αβ Т-клетками.

[0035] В некоторых вариантах осуществления перед проведением повторной стимуляции дополнительную питающую клетку приводят в контакт или активируют с помощью аминобисфосфоната, таким как золедроновая кислота.

[0036] В одном варианте осуществления дополнительная питающая клетка представляет собой опухолевую клетку или линию лимфобластоидных клеток.

[0037] В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка представляет собой клетку **K**562.

[0038] В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка представляет собой сконструированную опухолевую клетку, содержащую по меньшей мере один рекомбинантный белок.

[0039] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из CD86, 4-1BBL, ИЛ-15 и любой их комбинации.

[0040] В некоторых вариантах осуществления ИЛ-15 представляет собой связанный с мембраной ИЛ-15.

[0041] В некоторых вариантах осуществления дополнительная питающая клетка является облученной.

[0042] В одном варианте осуществления настоящая заявка предлагает популяцию размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, полученную способами по настоящему изобретению, в которой плотность размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток составляет по меньшей мере примерно 1×10^5 клеток/мл, по меньшей мере примерно 1×10^6 клеток/мл, по меньшей мере примерно 1×10^6 клеток/мл, по меньшей мере примерно 1×10^6 клеток/мл или по меньшей мере примерно 1×10^6 клеток/мл.

[0043] В одном варианте осуществления настоящая заявка предлагает способ лечения рака, который заключается во введении пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества размноженных уб Т-клеток, полученных способами по настоящему изобретению.

[0044] В одном варианте осуществления рак выбран из группы, состоящей из лимфобластного острого лейкоза. острого миелоидного лейкоза. адренокортикальной карциномы, СПИД-ассоциированных раковых опухолей, СПИД-ассоциированных лимфом, рака анального канала, рака аппендикса, астроцитом, нейробластомы, базально-клеточной карциномы, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, рака кости, опухолей головного мозга, таких как астроцитома мозжечка, астроцитома головного мозга/злокачественная глиома, медуллобластома, супратенториальные нейроэктодермальные опухоли, глиома зрительного пути и гипоталамуса, рака молочной железы, бронхиальных аденом, лимфомы Беркитта, карциномы неизвестного первичного происхождения, лимфомы центральной системы, астроцитомы мозжечка, рака шейки матки, детских раковых опухолей, хронического лимфолейкоза, хронического миелогенного лейкоза, хронических

миелопролиферативных заболеваний, рака толстой кишки, кожной Т-клеточной лимфомы, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, рака эндометрия, эпендимомы, рака пищевода, саркомы Юинга, герминогенных опухолей, рака желчного пузыря, рака желудка, карциноидной опухоли желудочно-кишечного стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта, тракта, глиом, волосатоклеточного лейкоза, рака головы и шеи, рака сердца, гепатоцеллюлярного рака (печени), лимфомы Ходжкина, рака гортаноглотки, внутриглазной меланомы, островково-клеточной карциномы, саркомы Капоши, рака почки, рака гортани, рака губы и полости рта, липосаркомы, рака печени, рака легкого, такого как немелкоклеточный мелкоклеточный лимфом, лейкозов, и рак легкого, макроглобулинемии, злокачественной фиброзной гистиоцитомы/остеосаркомы кости. медуллобластомы, мезотелиомы, меланомы, метастатического плоскоклеточного рака шеи со скрытой первичной опухолью, рака ротовой полости, множественной эндокринной неоплазии, синдрома миелодиспластических синдромов, миелоидного лейкоза, рака полости носа и околоносовых пазух, носоглотки, нейробластомы, карциномы неходжкинской лимфомы, ротоглотки, немелкоклеточного рака легкого. рака полости рта, рака остеосаркомы/злокачественной фиброзной гистиоцитомы кости, рака яичников, эпителиального рака яичников, герминогенной опухоли поджелудочной железы, рака островковых клеток поджелудочной железы, рака придаточных пазух носа и полости носа, рака паращитовидной железы, рака полового члена, рака глотки, феохромоцитомы, астроцитомы пинеальной области, герминомы пинеальной области, аденомы гипофиза, плевропульмональной бластомы, плазмоклеточной неоплазии, первичной лимфомы центральной нервной системы, рака предстательной железы, рака прямой кишки, почечно-клеточного рака, переходно-клеточного почечной лоханки и рака мочеточника, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, рака слюнных желез, саркомы, раковых заболеваний кожи, карциномы кожи из клеток Меркеля, рака тонкой кишки, саркомы мягких тканей, плоскоклеточного рака, рака желудка, Т -клеточной лимфомы, рака горла, тимомы, карциномы тимуса, рака щитовидной железы, трофобластической (гестационной) опухоли, рака неизвестной первичной локализации, рака уретры, саркомы матки, рака влагалища, рака вульвы, макроглобулинемии Вальденстрема и опухоли Вильмса.

[0045] В одном варианте осуществления рак представляет собой меланому.

[0046] В одном варианте осуществления настоящая заявка относится к способу лечения инфекционного заболевания, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества размноженных уб Т-клеток, полученных способами по настоящему изобретению.

[0047] В одном варианте осуществления инфекционное заболевание выбрано из группы, состоящей из лихорадки денге, лихорадки Эбола, вируса Марбурга, туберкулеза (ТБ), менингита и сифилиса.

[0048] В одном варианте осуществления настоящая заявка относится к способу лечения аутоиммунного заболевания, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества размноженных уб Т-клеток, полученных способами по настоящему изобретению.

[0049] В одном варианте осуществления аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из артрита, хронической обструктивной болезни легких, анкилозирующего спондилита, болезни Крона (одного ИЗ двух типов идиопатического воспалительного заболевания кишечника «B3K»). дерматомиозита, сахарного диабета 1 типа, эндометриоза, Синдрома Гудпасчера, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре (СГБ), болезни Хашимото, гнойного гидраденита, болезни Кавасаки, IgA-нефропатии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, интерстициального цистита, красной волчанки, смешанного заболевания соединительной ткани, очаговой склеродермии, миастении гравис, нарколепсии, нейромиотонии, обыкновенной пузырчатки, пернициозной анемии, псориаза, псориатического артрита, полимиозита, первичного билиарного цирроза, рецидивирующего полихондрита, ревматоидного шизофрении, артрита, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома тугоподвижности, височного артериита (также известного как «гигантоклеточный артериит»), язвенного колита (одного ИЗ двух типов идиопатического «ВЗК»), воспалительного заболевания кишечника васкулита, витилиго гранулематоза Вегенера.

[0050] В одном варианте осуществления настоящая заявка относится к способу получения уб Т-клеток, включающему выделение уб Т-клеток из образца крови человека-субъекта, активацию выделенных уб Т-клеток в отсутствие питающей клетки, введение вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую Т-клеточный рецептор (TCR) или химерный антигенный рецептор (CAR), в

активированные уб Т-клетки и размножение трансдуцированных уб Т-клеток в присутствии питающей клетки.

[0051] В другом варианте осуществления активация, трансдукция и/или размножение могут быть выполнены в присутствии по меньшей мере одного цитокина, выбранного из группы, состоящей из интерлейкина (ИЛ)-1, ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15., ИЛ-18, ИЛ-21, интерферона (IFN)- α и IFN- β .

[0052] В другом варианте осуществления питающей клеткой может быть человеческая клетка, нечеловеческая клетка, инфицированная вирусом клетка, неинфицированная вирусом клетка, клеточный экстракт, частица, микросфера, нить или их комбинация.

[0053] В другом варианте осуществления питающая клетка может включать мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и/или лимфобластоидные клетки (LCL).

[0054] В другом варианте осуществления активацию, трансдукцию и/или размножение можно проводить в присутствии ОКТ3.

[0055] В другом варианте осуществления размноженные уб Т-клетки могут включать б1 и/или б2 Т-клетки.

[0056] В другом варианте осуществления вектор может быть вирусным вектором или невирусным вектором.

[0057] В другом варианте осуществления вектор может включать нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CD8αβ или CD8α.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0058] Файл патента или заявки содержит как минимум один рисунок, выполненный в цвете. Копии публикации этого патента или патентной заявки с цветным(-и) рисунком(-ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и за уплату необходимой пошлины.

[0059] Для дальнейшего понимания сущности, целей и преимуществ настоящего изобретения следует обратиться к следующему подробному описанию, прочитанному вместе со следующими фигурами, на которых одинаковые ссылочные номера обозначают одинаковые элементы.

[0060] На ФИГ. 1 показана схема аллогенной Т-клеточной терапии согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения. Аллогенная Т-клеточная терапия может включать сбор уб Т-клеток от здоровых доноров, конструирование уб Т-клеток путем вирусной трансдукции представляющих интерес экзогенных генов, таких как экзогенные TCR, с последующим размножением клеток, сбор размноженных сконструированных уб Т-клеток, которые могут быть криоконсервированы в виде Т-клеточных препаратов, перед последующей инфузией пациентам.

[0061] На ФИГ. 2 показана схема производства уб Т-клеток согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения. Производство уб Т-клеток может включать сбор или получение лейкоцитов или МКПК, например продукта лейкафереза, удаление ав Т-клеток из МКПК или продукта лейкафереза с последующей активацией, трансдукцией, размножением и, необязательно, повторной стимуляцией уб Т-клеток.

[0062] На ФИГ. ЗА и ЗВ показано влияние повторной стимуляции аутологичными моноцитами на размножение γδ Т-клеток. На ФИГ. ЗА показан процесс повторной стимуляции. Коротко говоря, в день 0 мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), обедненные αβ-ТСR-экспрессирующими Т-клетками (включая СD4+ и CD8+ Т-клетки) («γδ Т-клетки»), активировали в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-2 (100 Ед/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл). В день 3 активированные γδ-Т-клетки подвергали имитации трансдукции. В день 4 имитационно-трансдуцированные клетки размножали. В день 7 размноженные клетки повторно стимулировали аутологичными моноцитами, полученными путем отбора CD14+ из МКПК (Miltenyi), в присутствии ZOL (100 мкМ) в течение 4 часов при соотношении 10 (моноциты): 1 (γδ Т-клетки).

[0063] На ФИГ. ЗВ показано, что повторная стимуляция моноцитами увеличивает кратность роста числа уб Т-клеток, полученных от двух доноров (D1 и D2), по сравнению с таковой без повторной стимуляции. Кратность размножения повторно стимулированных клеток уменьшается через 10 дней. Ко дню 14 кратность роста числа повторно стимулированных клеток снижается до кратности, аналогичной таковой без повторной стимуляции.

[0064] На ФИГ. 4А и 4В показано влияние повторной стимуляции облученными аутологичными моноцитами на размножение үб Т-клеток. На ФИГ. 4А показан

процесс повторной стимуляции. Коротко говоря, в день 0 мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), обедненные аβ-TCR-экспрессирующими Т-клетками (включая CD4+ и CD8+ Т-клетки) («үб Т-клетки»), активировали в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-2 (100 Ед/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл). В день 2 активированные үб-Т-клетки подвергали имитации трансдукции. В день 3 имитационно-трансдуцированные клетки размножали. В день 7 размноженные клетки повторно стимулировали облученными (100 Гр) аутологичными МКПК, обедненными аβ-TCR-экспрессирующими Т-клетками, в присутствии ZOL (100 мкМ) в течение 4 часов в соотношении 5:1 или 10:1 (МКПК, обедненные аβ-TCR-экспрессирующими Т-клетками: уб Т-клетки).

[0065] На ФИГ. 4В показано, что повторная стимуляция МКПК, обедненными αβ-ТСR-экспрессирующими Т-клетками, в соотношениях 5:1 и 10:1 увеличивает кратность роста числа γδ Т-клеток, полученных от двух доноров (D1 и D2), по сравнению с таковой без повторной стимуляции.

[0066] На ФИГ. 5 показан процесс размножения, использованный для генерации данных, представленных на ФИГ. 6-11. Коротко говоря, в день 0 мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), обедненные аβ-ТСR-экспрессирующими Тклетками (включая CD4+ и CD8+ Т-клетки) («уб Т-клетки»), активировали в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-2 (100 Ед/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл). В день 2 активированные уб-Т-клетки подвергали имитации трансдукции. В день 7 и 3 имитационно-трансдуцированные клетки размножали. В день 14 размноженные клетки повторно стимулировали либо 1) аутологичными моноцитами (полученными путем отбора CD14+ ИЗ МКПК (Miltenyi) и активированными с помощью ZOL (100 мкМ) в течение 4 часов) в соотношении 1:1, 5:1 или 10:1 (моноциты: уб Т-клетки), либо 2) облученными (100 Гр) аутологичными МКПК, обедненными αβ-ТСR-экспрессирующими Т-клетками (активированными с помощью ZOL (100 мкМ) в течение 4 часов), в соотношении 10: 1 или 20:1 (αβобедненные МКПК:γδ Т-клетки).

[0067] На ФИГ. 6А и 6В показано влияние многократных повторных стимуляций аутологичными моноцитами или облученными аутологичными αβ-обедненными МКПК на размножение γδ Т-клеток от двух доноров (D1 (ФИГ. 6A) и D2 (ФИГ. 6Б)). γδ Т-клетки активировали и размножали, как показано на ФИГ. 5.

[0068] На ФИГ. 7А-7С показано влияние многократных повторных стимуляций аутологичными моноцитами или облученными аутологичными $\alpha\beta$ -обедненными МКПК на размножение $\gamma\delta$ Т-клеток от одного донора. $\gamma\delta$ Т-клетки активировали и размножали, как показано на ФИГ. 5. На ФИГ. 7А показана кратность роста общего числа $\gamma\delta$ Т-клеток, на ФИГ. 7В показана кратность роста числа δ 2 Т-клеток, и на ФИГ. 7С показана кратность роста числа δ 1 Т-клеток.

[0069] На ФИГ. 8А-8С показано влияние многократных повторных стимуляций аутологичными моноцитами или облученными аутологичными $\alpha\beta$ -обедненными МКПК на размножение $\gamma\delta$ Т-клеток от второго донора. $\gamma\delta$ Т-клетки активировали и размножали, как показано на ФИГ. 5. На ФИГ. 8А показана кратность роста общего числа $\gamma\delta$ Т-клеток, на ФИГ. 8В показана кратность роста числа δ 2 Т-клеток, и на ФИГ. 8С показана кратность роста числа δ 1 Т-клеток.

[0070] ФИГ. 9 показано, что многократные повторные стимуляции аутологичными моноцитами или облученными аутологичными αβ-обедненными МКПК существенно не меняют фенотип памяти размноженных уб Т-клеток. уб Тклетки от одного донора активировали и размножали, как показано на ФИГ. 5, собирали в день 21 и анализировали с помощью проточной цитометрии для определения фенотипа памяти путем обнаружения CD45, CD27 и CCR7 на клеточной поверхности. Небольшое увеличение экспрессии CD27 было обнаружено в размноженных уб Т-клетках, повторно стимулированных моноцитами в соотношении 10:1.

[0071] На ФИГ. 10 показано, что многократные повторные стимуляции аутологичными моноцитами или облученными аутологичными αβ-обедненными МКПК существенно не меняют фенотип памяти размноженных γδ Т-клеток. γδ Т-клетки от второго донора активировали и размножали, как показано на ФИГ. 5, собирали в день 21 и анализировали с помощью проточной цитометрии для определения фенотипа памяти путем обнаружения CD45, CD27 и CCR7 на клеточной поверхности. Небольшое увеличение экспрессии CD27 было обнаружено в размноженных γδ Т-клетках, повторно стимулированных моноцитами в соотношении 10:1.

[0072] На ФИГ. 11А и 11В показано влияние многократных повторных стимуляций аутологичными моноцитами или облученными аутологичными $\alpha\beta$ - обедненными МКПК на жизнеспособность размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток. δ Т-клетки от

двух доноров активировали и размножали, как показано на ФИГ. 5, собирали в день 21 и анализировали с помощью проточной цитометрии для определения процентной доли живых клеток в общей популяции үб-Т-клеток. Результаты для донора 1 показаны на ФИГ. 11А, а результаты для донора 2 показаны на ФИГ. 11В.

[0073] На ФИГ. 12А и 12В показано влияние совместного культивирования со сконструированными клетками опухолевого происхождения на уб Т-клетки. Коротко говоря, в день 0 мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), обедненные αβ-TCR-экспрессирующими Т-клетками (включая CD4+ и CD8+ Tклетки) («γδ Т-клетки»), активировали в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-15 (100 нг/мл). Облученные ИЛ-2 (100 Ед/мл) И клетки опухолевого происхождения (К562) добавляли в соотношении 2:1 (опухолевые клетки: уб Тклетки) к некоторым образцам либо в присутствии, либо в отсутствие ZOL. Другие образцы культивировали на планшетах, покрытых моноклональными антителами против CD28 или CD27. В день 3 активированные уδ-Т-клетки подвергали имитации трансдукции. На 4-й день имитационно-трансдуцированные клетки размножали. Размноженные клетки замораживали в день 21 день. На ФИГ. 12А и 12В показано, что γδ Т-клетки, полученные от двух доноров (D1 (ФИГ. 12A) и D2 (ФИГ. 12B)), стимулированные облученными клетками опухолевого происхождения +/- ZOL демонстрируют более высокую кратность роста числа, чем такие клетки, стимулированные анти-CD28 антителом + ZOL, анти-CD27 антителом + ZOL и только ZOL (контроль).

[0074] На ФИГ. 13А-С показаны результаты совместного культивирования с различными клетками опухолевого происхождения во время активации уб Т-клеток.

На ФИГ. 13А показана кратность роста числа γδ Т-клеток, полученных от двух доноров (D1 (верхняя панель) и D2 (нижняя панель)), активированных в день 0 в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-2 (100 Ед/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл): 1) в отсутствие клеток опухолевого происхождения (контроль); 2) с клетками опухолевого происхождения дикого типа (K562 WT); 3) с модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 1 K562); 4) с модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 2 K562); 5) с модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 2 K562) в отсутствие ZOL и 6) с модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 2 К562) в отсутствие ZOL и 6) с отсутствие ZOL с повторной стимуляцией (вариант 2 К562 + ИЛ-2 + ИЛ-15) в дни 7 и

14. На ФИГ. 13В и 13С показано размножение как δ1 (левая панель), так и δ2 (правая панель) Т-клеток от донора 1 (ФИГ. 13В) и донора 2 (ФИГ. 13С).

[0075] На ФИГ. 14А и 14В показаны результаты совместного культивирования с различными клетками опухолевого происхождения во время активации γδ Т-клеток. На ФИГ. 14А и 14В показана процентная доля γδ Т-клеток, присутствующих во всей популяции живых клеток. Коротко говоря, клетки, полученные от двух доноров (D1 (ФИГ. 14А) и D2 (ФИГ. 14В)) активировали в день 0 в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-2 (100 ед/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл): 1) в отсутствие клеток опухолевого происхождения (контроль); 2) с клетками опухолевого происхождения дикого типа (K562 WT); 3) с модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 1 К562); 4) с модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 2 К562); 5) с модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 2 К562) в отсутствие ZOL и 6) с модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 2 К562) в отсутствие ZOL с повторной стимуляцией (вариант 2 К562 + ИЛ-2 + ИЛ-15) в дни 7 и 14.

[0076] На ФИГ. 15 показано, что отсутствие золедроната в культуре приводит к формированию поликлональной популяции (как б1, так и б2 үб Т-клеток) по сравнению с условиями, когда золедронат присутствовал в культуре. Коротко говоря, клетки, полученные от двух доноров (D1 (верхние панели) и D2 (нижние панели)) активировали в день 0 в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-2 (100 Eд/мл) и ИЛ -15 (100 нг/мл): 1) в отсутствие клеток опухолевого происхождения (контроль); 2) с клетками опухолевого происхождения дикого типа (К562); 3) с модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 2 К562) в отсутствие ZOL; 4) с модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 2 К562) в отсутствие ZOL с повторной стимуляцией (вариант 2 К562 + ИЛ-2 + ИЛ-15) в дни 7 и 14; 5) с модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 2 К562) и 6) с модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 1 К562). Клетки собирали на 21-й день и анализировали с помощью проточной цитометрии для определения популяций δ1 и δ2.

[0077] На ФИГ. 16 показано, что совместное культивирование с клетками опухолевого происхождения не меняет фенотип памяти размноженных уб Т-клеток. Коротко говоря, клетки, полученные от двух доноров (D1 (верхние панели) и

D2 (нижние панели)) активировали в день 0 в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-2 (100 Ед/мл) и ИЛ -15 (100 нг/мл): 1) в отсутствие клеток опухолевого происхождения (контроль); 2) с клетками опухолевого происхождения дикого типа; 3) с клетками опухолевого происхождения, сконструированными для экспрессии 4-1BBL и мембраносвязанного ИЛ-15 (mblL15), в отсутствие ZOL; 4) с клетками опухолевого происхождения, экспрессирующими 4-1BBL и mblL15, в отсутствие повторной стимуляцией (клетки опухолевого происхождения. экспрессирующие 4-1BBL и mblL15, + ИЛ-2 + ИЛ-15) в дни 7 и 14; 5) с клетками опухолевого происхождения, экспрессирующими 4-1BBL и mbIL15; и 6) с клетками опухолевого происхождения, экспрессирующими СD86. Клетки собирали в день 21 и анализировали с помощью проточной цитометрии для определения фенотипа памяти путем обнаружения CD45, CD27 и CCR7 на клеточной поверхности.

[0078] На ФИГ. 17А и 17В показано влияние многократных повторных стимуляций облученными аллогенными МКПК +/-LCL на размножение $\gamma\delta$ Т-клеток от двух доноров (D1 (ФИГ. 17А) и D2 (ФИГ. 17В). Коротко говоря, клетки, полученные от двух доноров (D1 и D2), активировали в день 0 в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-2 (100 Ед/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл), имитировали трансдукцию в день 2 и размножали в день 3. В день 7-й и день 14 размноженные клетки повторно стимулировали: 1) контролем (100 Ед/мл ИЛ-2 + 100 нг/мл ИЛ-15); 2) МКПК+LCL+OKT3 (25х106 облученных аллогенных МКПК, объединенных от 2-3 доноров, + 5х106 облученных LCL + 30 нг/мл ОТКЗ + 50 Ед/мл ИЛ-2); 3) МКПК (25х106 облученных аллогенных МКПК, объединенных от 2-3 доноров, + 50 Ед/мл ИЛ-2); 4) LCL (5х106 облученных LCL + 50 Ед/мл ИЛ-2) или 5) ОКТЗ (30 нг/мл ОТКЗ + 50 ЕД/мл ИЛ-2).

[0079] На ФИГ. 18А-С показано влияние многократных повторных стимуляций облученными аллогенными МКПК +/- LCL на размножение уб Т-клеток от двух доноров. уб Т-клетки активировали и размножали, как описано выше для ФИГ. 17А-В. На ФИГ. 18А и 18В показана кратность роста числа б1 Т-клеток от двух доноров. На ФИГ. 18С показаны результаты анализа методом проточной цитометрии в день 21 для образцов от двух доноров после контрольной обработки (ИЛ-2 + ИЛ-15) и повторной стимуляции с помощью МКПК + LCL + ОКТ3.

[0080] На ФИГ. 19А и 19В показан фенотип памяти размноженных үб Т-клеток от двух доноров, повторно стимулированных с помощью МКПК +/- LCL. Коротко

говоря, клетки, полученные от двух доноров (D1 и D2), активировали в день 0 в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-2 (100 Ед/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл), имитировали трансдукцию в день 2 и размножали в день 3. В день 7 размноженные клетки повторно стимулировали: 1) контролем (100 Ед/мл ИЛ-2 + 100 нг/мл ИЛ-15); 2) МКПК+LCL+ОКТЗ ($25x10^6$ облученных аллогенных МКПК, объединенных от 2-3 доноров, + $5x10^6$ облученных LCL + 30 нг/мл ОКТЗ + 50 Ед/мл ИЛ-2); 3) МКПК ($25x10^6$ облученных аллогенных МКПК, объединенных от 2-3 доноров + 50 Ед/мл ИЛ-2) или 4) LCL ($5x10^6$ облученных LCL + 50 Ед/мл ИЛ-2). Клетки собирали в день 14 и анализировали с помощью проточной цитометрии для определения фенотипа памяти путем обнаружения CD45, CD27 и CCR7 на клеточной поверхности.

[0081] На ФИГ. 20А и 20В показана киллерная активность $\gamma\delta$ Т-клеток, трансдуцированных ТСR (TCR-T), или нетрансдуцированных (NT), приготовленных с помощью различных процессов, против пептид-положительных клеток U2OS (ФИГ. 20A) или пептид-отрицательных клеток МСF7 (ФИГ. 20B)

[0082] На ФИГ. 21 показан процесс производства Т-клеток в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0083] На ФИГ. 22A-22D показана кратность роста числа $\gamma\delta$ Т-клеток, полученных с помощью контрольного процесса (ФИГ. 22A), процесса 1 (ФИГ. 22B), процесса 2 (ФИГ. 22C) и процесса 3 (ФИГ. 22D).

[0084] На ФИГ. 23A-23C показан фенотип CD27+CD45RA- (ФИГ. 23A), CD62L+ (ФИГ. 23B) и CD57+ (ФИГ. 23C) $\gamma \delta$ Т-клеток, приготовленных с помощью различных процессов.

[0085] На ФИГ. 24А-24D показан % үб Т-клеток, экспрессирующих PD1 (ФИГ. 24A), LAG3 (ФИГ. 24B), TIM3 (ФИГ. 24C) и TIGIT (ФИГ. 24D), приготовленных с помощью различных процессов.

[0086] На ФИГ. 25А и 25В показан % үб Т-клеток, экспрессирующих трансгены, например ТСР (ФИГ. 25А), и число копий интегрированного ТСР (ФИГ. 25В) в үб Т-клетках, приготовленных с помощью различных процессов.

[0087] На ФИГ. 26А-26С показан % уб Т-клеток, экспрессирующих трансгены, например CD8 и TCR, которые связывают комплекс пептид PRAME/MHC, полученных с помощью контрольного процесса (ФИГ. 26А), процесса 2 (ФИГ. 26В) и процесса 3 (ФИГ. 26С).

[0088] На ФИГ. 27А показан процесс производства Т-клеток в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0089] На ФИГ. 27В показана кратность роста числа уб Т-клеток, приготовленных с помощью различных процессов.

[0090] На ФИГ. 28А-28С показан % үб Т-клеток, экспрессирующих трансгены, например CD8 и TCR, полученных путем стимуляции клетками K562 в день 0 с последующей трансдукцией в день 2 с помощью вирусного вектора, кодирующего трансгены, в количестве 60 мкл (ФИГ. 28А), 120 мкл (ФИГ. 28В) и 240 мкл (ФИГ. 28С).

[0091] На ФИГ. 28D показано число копий интегрированных трансгенов в уб Т-клетках, полученных с помощью процессов, показанных на ФИГ. 28A-28C.

[0092] На ФИГ. 28Е показан % уб Т-клеток, экспрессирующих трансгены, например CD8 и TCR, и полученных путем трансдукции с помощью вирусного вектора, кодирующего трансгены, в количестве 60 мкл в день 2, с последующей стимуляцией клетками K562 в день 4.

[0093] На ФИГ. 28F показано число копий интегрированного трансгена в уб Т-клетках, полученных способом, показанным на ФИГ. 28E.

[0094] На ФИГ. 29 показан % уб Т-клеток, экспрессирующих трансгены, например CD8 и TCR, и полученных с помощью различных процессов.

[0095] На ФИГ. 30 показан процесс производства уб Т-клеток в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0096] На ФИГ. 31А-31D показана киллерная активность үб Т-клеток, полученных с помощью различных процессов, против клеток UACC257 (ФИГ. 31A), клеток U2OS (ФИГ. 31B), клеток А375 (ФИГ. 31C) и клеток МСF7 (ФИГ. 31D).

[0097] На ФИГ. 32А-32С показана секреция IFN у из уб Т-клеток, полученных с помощью различных процессов, против клеток UACC257 (ФИГ. 32A), клеток U2OS (ФИГ. 32B) и клеток МСF7 (ФИГ. 32C).

[0098] На ФИГ. 33А-33С показана секреция ТNF α из $\gamma\delta$ Т-клеток, полученных с помощью различных процессов, против клеток UACC257 (ФИГ. 33A), клеток U2OS (ФИГ. 33B) и клеток МСF7 (ФИГ. 33C).

[0099] На ФИГ. 34А-34С показана секреция GM-CSF из $\gamma\delta$ Т-клеток, полученных с помощью различных процессов, против клеток UACC257 (ФИГ. 34A), клеток U2OS (ФИГ. 34B) и клеток MCF7 (ФИГ. 34C).

[00100] На ФИГ. 35А и 35В показано ингибирование роста клеток UACC257, индуцированное уб Т-клетками, полученными от 2 доноров (донор 1 (ФИГ. 35А) и донор 2 (ФИГ. 35В)) и приготовленными с помощью различных процессов.

[00101] На ФИГ. 36 показан % трансген(CD8 и TCR)-экспрессирующих үб Т-клеток, экспрессирующих PD1, LAG3, TIM3 или TIGIT, и приготовленных с помощью различных процессов.

[00102] На ФИГ. 37 показаны процессы производства уб Т-клеток в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[00103] На ФИГ. 38 показаны количества CD28+CD62L+ уб Т-клеток, приготовленных с помощью различных процессов.

[00104] На ФИГ. 39А-39С показана кратность роста числа $\gamma\delta$ Т-клеток, полученных от 3 доноров (SD01004687 (ФИГ. 39А), D155410 (ФИГ. 39В) и SD010000256 (ФИГ. 39С)) и приготовленных с помощью различных процессов.

[00105] На ФИГ. 40А-40С показан % δ 1 и δ 2 Т-клеток, приготовленных с помощью контрольного процесса (ФИГ. 40А), HDACi + ИЛ-21 (w1) (ФИГ. 40В) и HDACi + ИЛ-21 (w2) (ФИГ. 40С).

[00106] На ФИГ. 41А показан % CD28+CD62L+ уб Т-клеток, приготовленных с помощью различных процессов.

[00107] На ФИГ. 41В показан % CD27+CD45RA- уб Т-клеток, приготовленных с помощью различных процессов.

[00108] На ФИГ. 41С показан % CD57+ уб Т-клеток, приготовленных с помощью различных процессов.

[00109] На ФИГ. 42 показаны процессы производства уб Т-клеток в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[00110] На ФИГ. 43A и 43B показан % үб Т-клеток, взятых от 2 доноров (D155410 (ФИГ. 43A) и SD010004867 (ФИГ. 43B)), экспрессирующих ИЛ-2Ra, ИЛ-2Rb, ИЛ-2Rb, ИЛ-7Ra и ИЛ-21R.

[00111] На ФИГ. 44А-44С показана кратность роста числа $\gamma\delta$ Т-клеток, взятых от 3 доноров (SD010004867 (ФИГ. 44А), D155410 (ФИГ. 44В) и SD010000256 (ФИГ. 44С)) и приготовленных с помощью различных процессов.

[00112] На ФИГ. 45А-45С показан % б1 и б2 Т-клеток, приготовленных примированием с помощью ИЛ-12 + ИЛ-18 (ФИГ. 45А), с помощью ИЛ-2; ИЛ-15 (ФИГ. 45В) и с помощью контрольного процесса (ФИГ. 45С).

[00113] На ФИГ. 46А показан % CD27+CD45RA- уб Т-клеток, приготовленных с помощью различных процессов.

[00114] На ФИГ. 46В показан % CD28+CD62L+ уб Т-клеток, приготовленных с помощью различных процессов.

[00115] На ФИГ. 46С показан % CD57+ үб Т-клеток, приготовленных с помощью различных процессов.

[00116] На ФИГ. 47А и 47В показан % б1 и б2 Т-клеток, полученных от 2 доноров (D148960 (ФИГ. 47А) и SD010000723 (ФИГ. 47В)) и приготовленных с помощью различных процессов.

[00117] На ФИГ. 48А и 48В показан % б1 (ФИГ. 48А) и б2 (ФИГ. 48В) Т-клеток, полученных от донора SD010000723, приготовленных с помощью различных процессов.

[00118] На ФИГ. 49А и 49В показан % б1 (ФИГ. 49А) и б2 (ФИГ. 49В) Т-клеток, полученных от донора D148960, приготовленных с помощью различных процессов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00119] Аллогенная Т-клеточная терапия может быть основана на генном конструировании аллогенных уб Т-клеток с целью экспрессии экзогенных ТСR. Помимо специфического распознавания опухоли с помощью эктопического ТСR или CAR, уб Т-клетки могут обладать активностью против многочисленных типов опухолей, как описано в настоящем документе.

[00120] Термин «үб Т-клетки (гамма-дельта Т-клетки)», используемый в данном документе, относится к подмножеству Т-клеток, которые экспрессируют на своей поверхности определенный Т-клеточный рецептор (TCR), уб TCR, состоящий из

одной у- цепи и одной б-цепи. Термин «уб Т-клетки», в частности, включает все подмножества уб Т-клеток, включая, помимо прочего, Vб1 и Vб2, Vб3 уб Т-клетки, а также наивные уб Т-клетки, уб Т-клетки эффекторной памяти, уб Т-клетки центральной памяти и терминально дифференцированные уб Т-клетки. В качестве дополнительного примера термин «уб Т-клетки» включает Vб4, Vб5, Vб7 и Vб8 уб Т-клетки, а также Vу2, Vу3, Vу5, Vу8, Vу9, Vу10 и Vу11 уб Т-клетки.

[00121] Термин «обогащенная» клеточная популяция или препарат относится к клеточной популяции, полученной из исходной смешанной клеточной популяции и содержащей более высокий процент клеток определенного типа относительно процента клеток этого типа в исходной популяции. Например, исходная смешанная клеточная популяция может быть обогащена конкретной популяцией уб Т-клеток. В одном варианте осуществления обогащенная популяция уб Т-клеток содержит более высокий процент клеток б1 относительно процента клеток этого типа в исходной популяции. В качестве другого примера, обогащенная уб Т-клеточная популяция может содержать более высокий процент как б1-клеток, так и б3-клеток относительно процента клеток этих типов в исходной популяции. В качестве еще одного примера, обогащенная уб Т-клеточная популяция может содержать более высокий процент как б1-клеток, так б4-клеток относительно процента клеток этих типов в исходной популяции. В качестве еще одного примера, обогащенная популяция уб Т-клеток может содержать более высокий процент б1 Т-клеток, б3 Тклеток, б4 Т-клеток и б5 Т-клеток относительно процента клеток этих типов в исходной популяции. В другом варианте осуществления обогащенная уб популяция Т-клеток содержит более высокий процент клеток б2 относительно процента клеток этого типа в исходной популяции. В еще одном варианте осуществления обогащенная γδ Т-клеточная популяция содержит более высокий процент как δ1клеток, так и б2-клеток относительно процента клеток этих типов в исходной популяции. Во всех вариантах осуществления обогащенная популяция уб Т-клеток содержит более низкий процент популяций ав Т-клеток.

[00122] Под термином «размноженный» в контексте настоящего документа подразумевается, что число клеток желаемого или целевого типа (например, б1 и/или б2 Т-клеток) в обогащенном препарате может быть выше, чем в начальной или исходной клеточной популяции. Под «селективным размножением» подразумевается, что целевой тип клеток (например, б1 или б2 Т-клетки) может быть размножен предпочтительно по сравнению с другими типами клеток, не

являющимися целевыми, например по сравнению с αβ Т-клетками или NKклетками. В некоторых вариантах осуществления активирующие агенты по настоящей заявке могут избирательно способствовать размножению, например, сконструированных или несконструированных б1 Т-клеток без значительного увеличения числа δ2 Т-клеток. В других вариантах осуществления активирующие агенты по настоящей заявке могут избирательно способствовать размножению, например сконструированных или несконструированных, δ2 Т-клеток, значительного увеличения числа δ1 Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления активирующие агенты по настоящей заявке могут избирательно способствовать размножению, например сконструированных несконструированных, б1 и б3 Т-клеток без значительного увеличения числа б2 Тклеток. В некоторых вариантах осуществления активирующие агенты по настоящей заявке могут избирательно способствовать размножению, например сконструированных или несконструированных, б1 и б4 Т-клеток без значительного δ2 Т-клеток. В некоторых увеличения числа вариантах осуществления активирующие агенты по настоящей заявке могут избирательно способствовать размножению, например сконструированных или несконструированных, б1, б3, б4 и δ5 Т-клеток без значительного увеличения числа δ2 Т-клеток. В данном контексте термин «без значительного увеличения числа» означает, что численность предпочтительно размноженной популяции клеток увеличилась по меньшей мере в 10 раз, предпочтительно в 100 раз и более предпочтительно в 1000 раз относительно контрольной популяции клеток. Увеличение популяций Т-клеток можно охарактеризовать, например, с помощью магнитно-активированной сортировки клеток (MACS) и/или флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS), при которой окрашиваются маркеры на клеточной поверхности, различные для разных популяций.

[00123] Выделение үб Т-клеток

[00124] В некоторых вариантах осуществления настоящая заявка может предлагать способы ех vivo для размножения сконструированных или несконструированных уб Т-клеток. В некоторых случаях в таком способе может использоваться одна или несколько (например, первая и/или вторая) стадий размножения, которые могут не включать цитокин, способствующий размножению определенной популяции уб Т-клеток, такой как ИЛ-4, ИЛ-2 или ИЛ-15 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления настоящая заявка предлагает

способы ех vivo для получения обогащенных популяций үб Т-клеток из выделенных смешанных клеточных популяций, включая приведение в контакт смешанной клеточной популяции с одним или несколькими агентами, которые способствуют селективному размножению б1 Т-клеток; б1 Т-клеток и б3 Т-клеток; б1 Т-клеток и б4 Т-клеток; или б1, б3, б4 и б5 Т-клеток путем связывания с эпитопом, специфичным для б1 ТСR; б1 и б4 ТСR; или б1, б3, б4 и б5 ТСR соответственно для получения обогащенной популяции үб Т-клеток. В других вариантах осуществления настоящая заявка предлагает способы ех vivo для получения обогащенных популяций үб Т-клеток из выделенных смешанных клеточных популяций, включая приведение смешанной популяции клеток в контакт с одним или несколькими агентами, которые способствуют селективному размножению б2 Т-клеток путем связывания с эпитопом, специфическим к б2 ТСR, для получения обогащенной популяции үб Т-клеток.

[00125] В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к размножению и/или активации Т-клеток. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к размножению и/или активации уб Т-клеток в отсутствие агентов, которые связываются с эпитопами, специфичными к уб ТСR, такими как анти-уб ТСR антитела. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к размножению и/или активации уб Т-клеток, которые можно использовать для экспрессии трансгена.

[00126] Изобретение дополнительно относится к размножению и активации $\gamma\delta$ Т-клеток при одновременном истощении α - и/или β -TCR-положительных клеток. Настоящее изобретение также предлагает популяции Т-клеток, включающие в себя размноженные $\gamma\delta$ Т-клетки и истощенные или обедненные α - и/или β -TCR-положительные клетки. Настоящее изобретение дополнительно предлагает способы применения раскрытых популяций Т-клеток.

[00127] В одном варианте осуществления в настоящем документе предложены способы крупномасштабного производства ТСR-сконструированных Vγ9δ2 Т-клеток, отвечающего требованиям надлежащей производственной практики (GMP).

[00128] Добавление ИЛ-18 к очищенным $\gamma\delta$ Т-клеткам в отсутствие питающих клеток усиливает размножение $\gamma\delta$ Т-клеток с заметным увеличением количества поверхностных высокоаффинных рецепторов к ИЛ-2 (CD25 или ИЛ-2Ra). Кроме того, амфотерицин B, лиганд toll-подобного рецептора 2 (TLR2), может

активировать γδ Т-клетки, CD8+ Т-клетки и NK-клетки и способствовать обнаружению поверхностной экспрессии CD25, высокоаффинного ИЛ-2Ra. В совокупности эти наблюдения подчеркивают критическую роль передачи сигналов ИЛ-2 в процессе опосредованной золедронатом активации и размножения $V_79\delta2$ Тклеток. Таким образом, для максимальной доступности ИЛ-2 для размножения уб Т-клеток посредством передачи сигналов ИЛ-2 (или для сведения к минимуму ингибирования ИЛ-2 из-за большого числа αβ Т-клеток), способы по настоящему изобретению могут включать удаление αβ Т-клеток из нормальных МКПК с использованием коммерчески доступных анти-αβ TCR реагентов, отвечающих требованиям GMP. Поскольку рекомбинантный ИЛ-18 в настоящее время не доступен в качестве коммерческого реагента, отвечающего требованиям GMP, изобретению МОГУТ способы настоящему дополнительно культивирование в присутствии низкой дозы амфотерицина В для повышения поверхностной экспрессии CD25 для усиления связывания и передачи сигнала ИЛ-2, что, в свою очередь, может усиливать реагирование на ИЛ-2 во время активации/размножения. Кроме того, может быть добавлен ИЛ-15, поскольку было показано, что ИЛ-15 увеличивает пролиферацию и выживаемость $V_{\gamma}9\delta2$ Т-клеток, обработанных ІРР.

[00129] На ФИГ. 1 показан подход к адоптивной аллогенной Т-клеточной терапии, который предлагает готовые Т-клеточные продукты, такие как препараты үб Т-клеток, для быстрого лечения подходящих пациентов со специфическим раком, экспрессирующих в своих опухолях представляющую интерес мишень. Этот подход может включать сбор үб Т-клеток от здоровых доноров, конструирование үб Т-клеток посредством вирусной трансдукции представляющих интерес экзогенных генов, таких как экзогенные TCR, с последующим размножением клеток, сбором размноженных сконструированных үб Т-клеток, которые могут быть криоконсервированы в качестве готового препарата Т-клеток, с последующей инфузией пациентам. Таким образом, этот подход может устранить необходимость в персонализированном производстве Т-клеток.

[00130] Для выделения үб Т-клеток в одном варианте осуществления үб Т-клетки могут быть получены от субъекта или из комплексного образца субъекта. В одном варианте осуществления сложный образец может представлять собой образец периферической крови, образец пуповинной крови, опухоль, стволовую клеткупредшественник, биоптат опухоли, ткань, лимфу или участки эпителия субъекта,

непосредственно контактирующие с внешней средой или полученные из стволовых клеток-предшественников. уб-Т-клетки могут быть выделены непосредственно из комплексного образца субъекта, например, путем сортировки уб-Т-клеток, которые экспрессируют один или несколько маркеров клеточной поверхности, с помощью методов проточной цитометрии. уб Т-клетки дикого типа могут экспонировать многочисленные антиген-распознающие, антиген-представляющие, костимулирующие и адгезивные молекулы, которые могут быть связаны с уб Тклетками. Для выделения уб Т-клеток дикого типа из комплексного образца могут быть использованы один или более маркеров клеточной поверхности, такие как специфические уб TCR. антиген-распознающие, антиген-представляющие молекулы, лиганды или костимулирующие молекулы. Для выделения уб Т-клеток из сложного образца могут быть использованы различные молекулы, связанные с уб Т-клетками или экспрессируемые ими. В другом варианте осуществления настоящее изобретение предлагает способы выделения смешанной популяции $V\delta 1+$, $V\delta 2+$, $V\delta 3+$ клеток или любой их комбинации.

[00131] Например, мононуклеарные клетки периферической крови могут быть взяты у субъекта, например, с помощью аппарата для афереза, включая систему FicoII-Paque™ PLUS (GE Healthcare), или другого подходящего устройства/системы. γδ Т-клетку(и) или желаемую субпопуляцию γδ Т-клетки(ок) можно выделить из взятого образца, например, с помощью методов проточной цитометрии. Клетки пуповинной крови также можно получить из пуповинной крови во время рождения субъекта.

[00132] Положительный и/или отрицательный отбор маркеров клеточной поверхности, экспрессированных на собранных уб-Т-клетках, можно использовать для непосредственного выделения уб-Т-клеток или популяции уб-Т-клеток, экспрессирующих одинаковые маркеры клеточной поверхности, из образца периферической крови, образца пуповинной крови, опухоли, биоптата опухоли, ткани, лимфы или образца эпителия субъекта. Например, уб Т-клетки могут быть выделены из комплексного образца на основе положительной или отрицательной экспрессии CD2, CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD44, Kit, TCR α , TCR β , TCR α , TCR δ , NKG2D, CD70, CD27, CD30, CD16, CD337 (NKp30), CD336 (NKp46), OX40, CD46, CCR7 и других подходящих маркеров клеточной поверхности.

[00133] В одном варианте осуществления γδ Т-клетки могут быть выделены из сложного образца, который был культивирован in vitro. В другом варианте осуществления может быть активирована и размножена вся популяция МКПК без предварительного удаления специфических клеточных популяций, таких как моноциты, αβ Т-клетки, В-клетки и NК-клетки. В другом варианте осуществления популяции обогащенных γδ Т-клеток могут быть получены до их специфической активации и размножения. В других вариантах осуществления активацию и размножение γδ Т-клеток можно проводить в отсутствие нативных или сконструированных АПК. В других вариантах осуществления выделение и размножение γδ Т-клеток из образцов опухоли можно проводить с использованием иммобилизованных γδ Т-клеточных митогенов, включая антитела, специфичные к γδ ТСR, и другие агенты, активирующие γδ TCR, включая лектины. В другом варианте осуществления выделение и размножение γδ Т-клеток из образцов опухоли можно проводить в отсутствие митогенов γδ Т-клеток, включая антитела, специфичные к γδ TCR, и других агентов, активирующих γδ TCR, включая лектины.

[00134] В одном варианте осуществления уб Т-клетки выделяют из продукта лейкафереза крови субъекта, например человека. В другом варианте осуществления γδ Т-клетки не выделяют из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК).

[00135] На ФИГ. 2 показано производство уб Т-клеток согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения. Этот 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 отделяет нужные компоненты крови и возвращает остальные в кровоток донора. Например, с помощью оборудования для афереза можно собрать лейкоциты, плазму и тромбоциты, а эритроциты и нейтрофилы вернуть в кровоток донора. В этом процессе можно использовать коммерчески доступные продукты лейкафереза. Другой способ получения лейкоцитов — это получение их из лейкоцитарной пленки. Для выделения лейкоцитарной пленки у донора берут цельную антикоагулированную кровь и центрифугируют. После центрифугирования кровь разделяют на плазму, эритроциты и лейкоцитарную пленку. Лейкоцитарная пленка представляет собой слой, расположенный между слоем плазмы И слоем эритроцитов. использованием лейкафереза можно добиться более высокой чистоты и

значительно более высокого содержания мононуклеарных клеток, чем при сборе лейкоцитарной пленки. Содержание мононуклеарных клеток, которое можно получить с использованием лейкафереза, обычно в 20 раз выше, чем можно получить из лейкоцитарной пленки. Для обогащения мононуклеарными клетками может потребоваться использование градиента фиколла для дальнейшего разделения.

[00136] Чтобы удалить αβ Т клетки из МКПК, можно отделить αβ ТСR-экспрессирующие клетки от МКПК с помощью магнитной сепарации, например с использованием магнитных гранул CliniMACS®, покрытых анти-αβ ТСR антителами, с последующим криоконсервированием МКПК с истощенной популяцией αβ ТСR-Т-клеток. Для производства готовых Т-клеточных продуктов криоконсервированные МКПК с истощенной популяцией αβ ТСR-Т-клеток, можно разморозить и активировать в малых/средних масштабах, например, в планшетах от 24 до 4-6 лунок или колбах Т75/Т175, или в больших объемах, например в мешках вместимостью 50 мл — 100 литров, в присутствии аминобисфосфоната и/или изопентенилпирофосфата (IPP), 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.

[00137] В одном варианте осуществления выделенные уб Т-клетки могут быстро размножаться в ответ на контакт с одним или несколькими антигенами. Некоторые $\gamma\delta$ Т-клетки, такие как $V\gamma9V\delta2+$ Т-клетки, могут быстро размножаться in vitro в ответ на контакт с некоторыми антигенами, такими как пренилпирофосфаты, алкиламины и метаболиты или микробные экстракты, во время культивирования ткани. Стимулированные γδ Т-клетки МОГУТ эксонировать многочисленные антигенпрезентующие, костимулирующие и адгезивные молекулы, которые могут облегчить выделение уб Т-клеток из комплексного образца. уб Т-клетки в комплексном образце можно стимулировать in vitro по меньшей мере одним антигеном в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или другого подходящего периода времени. Стимуляция уб Т-клеток подходящим антигеном может способствовать размножению уб Т-клеток in vitro.

[00138] Неограничивающие примеры антигенов, которые можно использовать для стимуляции размножения үб Т-клеток из комплексного образца in vitro, могут

включать пренилпирофосфаты, такие как изопентенилпирофосфат (IPP). метаболиты микробных патогенов человека, алкиламины, метаболиты комменсальных бактерий, метил-3-бутенил-1-пирофосфат (2М3В1РР), (Е)-4гидрокси-3-метилбут-2-енилпирофосфат (HMB-PP), этилпирофосфат (EPP), (FPP), (DMAP), фарнезилпирофосфат диметилаллилфосфат (DMAPP), диметилаллилпирофосфат этиаденозинтрифосфат (EPPPA), геранилпирофосфат (GPP). геранилгеранилпирофосфат (GGPP), изопентениладенозинтрифосфат (IPPPA), моноэтилфосфат (MEP), моноэтилпирофосфат (MEPP), 3-формил-1-бутилпирофосфат (TUBAg 1). Xпирофосфат (TUBAg 2), 3-формил-1-бутилуридинтрифосфат (TUBAg 3), 3-формил-1-бутилдезокситимидинтрифосфат (TUBAg 4), моноэтилалкиламины, аллилпирофосфат, кротоилпирофосфат, диметилаллил-у-уридинтрифосфат, кротоил-ү-уридинтрифосфат, аллил-ү-уридинтрифосфат, этиламин, изобутиламин, втор-бутиламин, изоамиламин и азотсодержащие бисфосфонаты.

[00139] Активацию γδ Т-клеток И размножение онжом проводить С использованием активирующих и костимулирующих агентов, описанных настоящем документе, для запуска специфической пролиферации и персистенции популяций уб Т-клеток. В одном варианте осуществления активация и размножение уб Т-клеток из разных культур могут привести к получению определенных клональных или смешанных поликлональных субпопуляций. В другом варианте осуществления могут быть использованы различные агенты-агонисты для идентификации агентов, которые обеспечивают специфические уб-активирующие сигналы. В другом варианте осуществления агенты, которые обеспечивают специфические уб-активирующие сигналы, могут представлять собой различные моноклональные антитела (MAb) против уб TCR. В другом варианте осуществления могут использоваться сопутствующие костимулирующие агенты для содействия в инициировании специфической пролиферации уб Т-клеток без индукции клеточной энергии и апоптоза. Эти костимулирующие агенты могут включать лиганды, связывающиеся с рецепторами, экспрессированными на уб-клетках, такие как NKG2D, CD161, CD70, JAML, вспомогательная молекула DNAX-1 (DNAM-1), ICOS, CD27, CD137, CD30, HVEM, SLAM, CD122, DAP и CD28. В другом варианте осуществления костимулирующие агенты могут представлять собой антитела, специфичные к уникальным эпитопам на молекулах CD2 и CD3. CD2 и CD3 могут иметь различную конформационную структуру при экспрессии на αβ или уδ Т-

клетках. В другом варианте осуществления специфические антитела к CD3 и CD2 могут приводить к выраженной активации уб Т-клеток.

[00140] В некоторых вариантах осуществления активацию и/или размножение уб Т-клеток можно проводить в присутствии питающей клетки, такой как опухолевая клетка, например клетка K562 или лимфобластоидная клетка (LCL). В некоторых вариантах осуществления питающую клетку модифицируют для экспрессии одного или нескольких костимулирующих агентов, таких как, например, CD86, 4-1BBL, ИЛ-15 и мембраносвязанный ИЛ-15 (mbIL-15). В некоторых вариантах осуществления питающая клетка может быть аутологичной клеткой, такой как моноцит или МКПК. Питающая клетка может быть облученной питающей клеткой, такой как облученная ү-лучами питающая клетка. В некоторых вариантах осуществления питающие клетки культивируют совместно с уб Т-клетками во время активации. В некоторых вариантах осуществления питающие клетки культивируют совместно с уб Т-клетками во время размножения, например, на одном или более этапах повторной стимуляции. Питающие клетки, используемые во время активации, могут быть такими же или отличными от питающих клеток, используемых во время размножения.

[00141] В некоторых вариантах осуществления уб Т-клетки и питающая клетка присутствуют в соотношении от примерно 1:1 до примерно 50:1 (питающие клетки: уб Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления уб Т-клетки и питающая клетка присутствуют в соотношении от примерно 1:1 до примерно 20:1 (питающие клетки: уб Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления размноженные уб Т-клетки и питающая клетка присутствуют в соотношении примерно 1:1, примерно 1,5:1, примерно 2:1, примерно 3:1, примерно 4:1, примерно 5: 1, примерно 6:1, примерно 7:1, примерно 8:1, примерно 9:1, примерно 10:1, примерно 11:1, примерно 12:1, примерно 13:1, примерно 14:1, примерно 15: 1, примерно 20:1, примерно 25:1, примерно 30:1, примерно 35:1, примерно 40:1, примерно 45:1 или примерно 50:1 (питающие клетки: размноженные уб Т-клетки).

[00142] Популяция уб Т-клеток может быть размножена ех vivo до процесса конструирования уб Т-клеток. Неограничивающие примеры реагентов, которые можно использовать для усиления размножения популяции уб Т-клеток in vitro, могут включать антитела к CD3 или к CD2, к CD27, к CD30, к CD70, к ОХ40, ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-9, ИЛ-33, ИЛ-18 или ИЛ-21, CD70 (лиганд CD27),

фитогемагглютинин (ФГА), конкавалин А (КонА), лаконос (PWM), агглютинин арахиса (PNA), агглютинин сои (SBA), агглютинин чечевицы пищевой (LCA), агглютинин зеленого горошка (PSA), агглютинин виноградной улитки (HPA), лектин vicia graminea (VGA) или другой подходящий митоген, способный стимулировать пролиферацию Т-клеток.

[00143] Способность уб Т-клеток распознавать широкий спектр антигенов может быть усилена с помощью конструирования уб Т-клеток. В одном варианте осуществления уб Т-клетка может быть сконструирована для проведения универсальной аллогенной терапии, которая распознает целевой антиген in vivo. Генная инженерия уб Т-клеток может включать стабильную интеграцию структуры, экспрессирующей фрагмент распознавания опухоли, такой как αβ TCR, уб TCR, антигенный рецептор (CAR), который сочетает в себе антигенсвязывающую, так и активирующую Т-клетки функции в едином рецепторе, его антигенсвязывающий фрагмент или домен активации лимфоцитов, в геном выделенных уб Т-клеток, цитокин (ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-21, ИЛ-18, ИЛ-19, ИЛ-33, ИЛ-4, ИЛ-9, ИЛ-23, ИЛ1β) для усиления пролиферации, выживания и функционирования Т-клеток ex vivo и in vivo. Генная инженерия выделенной уб Тклетки может также включать делецию гена или нарушение экспрессии гена у одного или нескольких эндогенных генов в геноме выделенной уб Т-клетки, таких как локус (локусы) МНС.

[00144] Способы производства Т-клеток, раскрытые в настоящем документе, могут использоваться для размножения Т-клеток, модифицированных для экспрессии высокоаффинных Т-клеточных рецепторов (сконструированных ТСR) или химерных антигенных рецепторов (САR) надежным и воспроизводимым образом. В одном варианте осуществления Т-клетка может быть генетически модифицирована для экспрессии одного или нескольких сконструированных ТСR или САR. В контексте настоящего документа Т-клетки могут быть αβ Т-клетками, γδ Т-клетками или естественными Т-клетками-киллерами.

[00145] Сконструированные TCR

[00146] Встречающиеся в природе Т-клеточные рецепторы состоят из двух субъединиц, α-субъединицы и β-субъединицы, каждая из которых представляет собой уникальный белок, продуцируемый в результате рекомбинации в геноме каждой Т-клетки. Можно проводить скрининг библиотек TCR на предмет их

селективности в отношении конкретных целевых антигенов. Таким образом, природные TCR, обладающие высокой авидностью и реактивностью по отношению к целевым антигенам, могут быть отобраны, клонированы и впоследствии введены в популяцию Т-клеток, используемых для адоптивной иммунотерапии.

[00147] В одном варианте осуществления Т-клетки можно модифицировать путем введения полинуклеотида, кодирующего субъединицу ТСР, который обладает способностью образовывать TCR, придающие Т-клеткам специфичность в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих целевой антиген. В конкретных вариантах осуществления эти субъединицы могут иметь одну или более аминокислотных замен, делеций, вставок или модификаций по сравнению с встречающейся в природе субъединицей, при условии, что эти субъединицы сохраняют способность образовывать ТСР, придающие трансфицированным Тклеткам способность направляться к клеткам-мишеням и участвовать в иммунологически значимой цитокиновой сигнализации. Сконструированные TCR предпочтительно также связывают клетки-мишени, экспонирующие релевантные ассоциированные с опухолью пептиды с высокой авидностью и, необязательно, опосредуют эффективное уничтожение клеток-мишеней, презентирующих соответствующий пептид, in vivo.

[00148] Нуклеиновые кислоты, кодирующие сконструированные TCR. предпочтительно могут быть выделены из их естественного окружения в (природной) хромосоме Т-клетки и могут быть включены в подходящие векторы, как описано в настоящем документе. Как нуклеиновые кислоты, так и содержащие их векторы могут быть эффективно перенесены в клетку, причем эта клетка может быть предпочтительно Т-клеткой, более предпочтительно уб-Т-клеткой. После этого модифицированные Т-клетки могут быть способны экспрессировать обе цепи TCR, кодируемые трансдуцированной нуклеиновой кислотой или нуклеиновыми: кислотами. В предпочтительных вариантах осуществления сконструированный TCR может представлять собой экзогенный TCR, поскольку он вводится в Т-клетки, которые в норме не экспрессируют этот конкретный ТСР. Важным свойством сконструированных TCR является то, что они могут иметь высокую авидность к опухолевому антигену, представленному главным комплексом гистосовместимости (MHC) или подобным иммунологическим компонентом. В отличие сконструированных TCR, CAR могут быть сконструированы для связывания целевых антигенов независимым от МНС образом.

[00149] В одном варианте осуществления сконструированные ТСR могут функционировать в $\gamma\delta$ Т-клетках независимым от CD8 (гетеродимер CD8 $\alpha\beta$ и/или гомодимер CD8 $\alpha\alpha$) образом. В другом варианте осуществления сконструированные ТСR могут функционировать в $\gamma\delta$ Т-клетках зависимым от CD8 (гетеродимер CD8 $\alpha\beta$ и/или гомодимер CD8 $\alpha\alpha$) образом. В последнем случае $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть модифицированы путем экспрессии экзогенных нуклеиновых кислот, кодирующих как TCR, так и CD8 (цепи CD8 α и CD8 β или цепь CD8 α). В одном варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть трансдуцированы или трансфицированы нуклеиновыми кислотами, кодирующими TCR и CD8 (цепи CD8 α и CD8 β или цепь CD8 α), которые могут находиться в одном векторе или в разных векторах.

[00150] Белок, кодируемый нуклеиновыми кислотами, может экспрессироваться с помощью дополнительных полипептидов, присоединенных к аминоконцевой или карбоксиконцевой части α- или β-цепи TCR, при условии, что присоединенный дополнительный полипептид не препятствует способности α- цепи или β-цепи образовывать функциональный Т-клеточный рецептор и МНС-зависимому распознаванию антигена.

[00151] Антигены, которые распознаются сконструированными ТСР, могут включать, среди прочего, раковые антигены, включая антигены как гематологического рака, так и солидных опухолей. Иллюстративные примеры антигенов включают, но не ограничиваются ими, рецептор фолата альфа, 5Т4, интегрин аvβ6, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, семейство EGFR, включая ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, фетальный AchR, FRα, GD2, GD3, *глипикан-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, ИЛ-11Rα, ИЛ-13Rα2, лямбда-цепь, Lewis-Y, каппа-цепь, мезотелин, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D-лиганды, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, RO R1, SSX, сурвивин, TAG72, TEM и VEGFR2.

[00152] В одном варианте осуществления Т-клетки по настоящему изобретению могут экспрессировать ТСR и антигенсвязывающие белки, описанные в публикации заявки на патент США № 2017/0267738; публикации заявки на патент США № 2017/0312350; публикации заявки на патент США № 2018/0051080; публикации заявки на патент США № 2018/0164315; публикации заявки на патент США №

2018/0161396; публикации заявки на патент США № 2018/0162922; публикации заявки на патент США № 2018/0273602; публикации заявки на патент США № 2019/0016801; публикации заявки на патент США № 2019/0002556; публикации заявки на патент США № 2019/0135914; патенте США № 10 538 573; патенте США № 10 626 160; публикации заявки на патент США № 2019/0321478; публикации заявки на патент США № 2019/0256572; патенте США № 10 550 182; патенте США № 10 526 407; публикации заявки на патент США № 2019/0284276; публикации заявки на патент США № 2019/0016802; публикации заявки на патент США № 2019/0016803; публикации заявки на патент США № 2019/0016804; патенте США № 10 583 573; публикации заявки на патент США № 2020/0339652; патенте США № 10 537 624; патенте США № 10 596 242; публикации заявки на патент США № 2020/0188497; патенте США № 10 800 845; публикации заявки на патент США № 2020/0385468; патент США № 10 527 623; патент США № 10 725 044; публикации заявки на патент США № 2020/0249233; патент США № 10 702 609; публикации заявки на патент США № 2020/0254106; патенте США № 10 800 832; публикации заявки на патент США № 2020/0123221; патенте США № 10 590 194; патенте США № 10 723 796; публикации заявки на патент США № 2020/0140540; патенте США № 10 618 956; публикации заявки на патент США № 2020/0207849; публикации заявки на патент США № 2020/0088726; и публикации заявки на патент США № публикаций 2020/0384028; содержание каждой ИЗ ЭТИХ СПИСКОВ последовательностей, описанных в них, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Т-клетки могут быть αβ Т-клетками, γδ Т-клетками или естественными Т-клетками-киллерами. В одном варианте осуществления ТСК, описанные в настоящем документе, могут быть одноцепочечными TCR или растворимыми TCR.

[00153] Химерные антигенные рецепторы (CAR)

[00154] Способы производства Т-клеток, раскрытые в настоящем документе, могут включать модификацию Т-клеток для экспрессии одного или нескольких САR. Т-клетки могут быть αβ Т-клетками, γδ Т-клетками или естественными Т-клетками-киллерами. В различных вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает Т-клетки, генетически сконструированные с помощью создания векторов для экспрессии САR, которые перенаправляют цитотоксичность на опухолевые клетки. САR представляют собой молекулы, которые сочетают основанную на антителах специфичность в отношении целевого антигена,

например опухолевого антигена, с внутриклеточным доменом, активирующим Т-клеточный рецептор, для создания химерного белка, который проявляет специфическую противоопухолевую клеточную иммунную активность. Используемый в данном документе термин «химерный» означает, что он состоит из частей различных белков или ДНК различного происхождения.

[00155] САК могут содержать внеклеточный домен, который связывается со специфическим целевым антигеном (также называемым связывающим доменом или антиген-специфическим связывающим доменом), трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Главной характеристикой САК может быть их способность перенаправлять специфичность иммунных эффекторных клеток, тем самым запуская пролиферацию, продукцию цитокинов, фагоцитоз или продукцию молекул, которые могут опосредовать гибель клетки, экспрессирующей целевой антиген, независимо от главного комплекса гистосовместимости (МНС), благодаря способности моноклональных антител, растворимых лигандов или клеточноспецифичных корецепторов нацеливаться на специфические клетки.

[00156] B конкретных вариантах осуществления CAR МОГУТ внеклеточный связывающий домен (включающий, помимо прочего, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, привязанный лиганд или внеклеточный домен корецептора), специфически связывающий целевой антиген, который опухолеассоциированный (TAA) представляет собой антиген или опухолеспецифический антиген (TSA). В некоторых вариантах осуществления ТАА или TSA могут быть экспрессированы на клетке рака крови. В другом варианте осуществления ТАА или TSA могут быть экспрессированы на клетке солидной опухоли. В конкретных вариантах осуществления солидная опухоль может представлять собой глиобластому, немелкоклеточный рак легкого, рак легкого, отличный от немелкоклеточного рака легкого, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак печени, рак толстой кишки, рак желудка, рак селезенки, рак кожи, рак головного мозга, отличный от глиобластомы, рак почки, рак щитовидной железы или т.п.

[00157] В конкретных вариантах осуществления ТАА или TSA могут быть выбраны из группы, состоящей из фолатного рецептора альфа, 5Т4, интегрина αvβ6, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR,

семейства EGFR, включая ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, фетального AchR, FRα, GD2, GD3, *глипикана-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2 NY-ESO-1, HLA-A3 NY-ESO -1, ИЛ-11Rα, ИЛ-13Rα2, лямбда-цепи, Lewis-Y, каппа-цепи, мезотелина, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D-лигандов, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, сурвивина, TAG72, TEM и VEGFR2.

[00158] В одном варианте осуществления пептиды опухолеассоциированного антигена (ТАА), которые можно использовать в способах и вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, включают, например, пептиды ТАА, описанные в заявке на патент США № 20160187351, в заявке на патент США № 20170165335, в заявке на патент США № 20170035807, в заявке на патент США № 20160280759, в заявке на патент США № 20160287687, в заявке на патент США № 20160346371, в заявке на патент США № 20160368965, в заявке на патент США № 20170022251, в заявке на патент США № 20170002055, в заявке на патент США № 20170029486. в заявке на патент США № 20170037089. в заявке на патент США № 20170136108, в заявке на патент США № 20170101473, в заявке на патент США № 20170096461, в заявке на патент США № 20170165337, в заявке на патент США № 20170189505, в заявке на патент США № 20170173132, в заявке на патент США № 20170296640, в заявке на патент США № 20170253633, в заявке на патент США № 20170260249, в заявке на патент США № 20180051080 и в заявке на патент США № 20180164315, полное содержание каждого из этих публикаций и списков последовательностей, описанных в них, включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00159] В одном варианте осуществления описанные в настоящем документе Т-клетки избирательно распознают клетки, которые представляют пептид ТАА, описанный в одном или более патентах и публикациях, описанных выше.

[00160] В другом варианте осуществления ТАА, которые можно использовать в способах и вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, включают по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы от SEQ ID NO: 6 до SEQ ID NO: 166. В одном варианте осуществления Т-клетки избирательно распознают клетки, которые представляют пептид ТАА, описанный в SEQ ID NO: 6–166 или в любом из описанных в настоящем документе патентов или заявок.

| SEQ | Последователь- | SEQ | Последователь- | SEQ | Последователь- |
|--------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|
| ID NO: | ность | ID NO: | ность | ID NO: | ность |
| | аминокислот | | аминокислот | | аминокислот |
| 6 | YLYDSETKNA | 59 | LLWGHPRVALA | 111 | VLLNEILEQV |
| 7 | HLMDQPLSV | 60 | VLDGKVAVV | 112 | SLLNQPKAV |
| 8 | GLLKKINSV | 61 | GLLGKVTSV | 113 | KMSELQTYV |
| 9 | FLVDGSSAL | 62 | KMISAIPTL | 114 | ALLEQTGDMSL |
| 10 | FLFDGSANLV | 63 | GLLETTGLLAT | 115 | VIIKGLEEITV |
| 11 | FLYKIIDEL | 64 | TLNTLDINL | 116 | KQFEGTVEI |
| 12 | FILDSAETTTL | 65 | VIIKGLEEI | 117 | KLQEEIPVL |
| 13 | SVDVSPPKV | 66 | YLEDGFAYV | 118 | GLAEFQENV |
| 14 | VADKIHSV | 67 | KIWEELSVLEV | 119 | NVAEIVIHI |
| 15 | IVDDLTINL | 68 | LLIPFTIFM | 120 | ALAGIVTNV |
| 16 | GLLEELVTV | 69 | ISLDEVAVSL | 121 | NLLIDDKGTIKL |
| 17 | TLDGAAVNQV | 70 | KISDFGLATV | 122 | VLMQDSRLYL |
| 18 | SVLEKEIYSI | 71 | KLIGNIHGNEV | 123 | KVLEHVVRV |
| 19 | LLDPKTIFL | 72 | ILLSVLHQL | 124 | LLWGNLPEI |
| 20 | YTFSGDVQL | 73 | LDSEALLTL | 125 | SLMEKNQSL |
| 21 | YLMDDFSSL | 74 | VLQENSSDYQS | 126 | KLLAVIHEL |
| | | | NL | | |
| 22 | KVWSDVTPL | 75 | HLLGEGAFAQV | 127 | ALGDKFLLRV |
| 23 | LLWGHPRVALA | 76 | SLVENIHVL | 128 | FLMKNSDLYGA |
| 24 | KIWEELSVLEV | 77 | YTFSGDVQL | 129 | KLIDHQGLYL |
| 25 | LLIPFTIFM | 78 | SLSEKSPEV | 130 | GPGIFPPPPPQP |
| 26 | FLIENLLAA | 79 | AMFPDTIPRV | 131 | ALNESLVEC |
| 27 | LLWGHPRVALA | 80 | FLIENLLAA | 132 | GLAALAVHL |

| 28 | FLLEREQLL | 81 | FTAEFLEKV | 133 | LLLEAVWHL |
|----|-------------|-----|-------------|-----|-------------|
| 29 | SLAETIFIV | 82 | ALYGNVQQV | 134 | SIIEYLPTL |
| 30 | TLLEGISRA | 83 | LFQSRIAGV | 135 | TLHDQVHLL |
| 31 | ILQDGQFLV | 84 | ILAEEPIYIRV | 136 | SLLMWITQC |
| 32 | VIFEGEPMYL | 85 | FLLEREQLL | 137 | FLLDKPQDLSI |
| 33 | SLFESLEYL | 86 | LLLPLELSLA | 138 | YLLDMPLWYL |
| 34 | SLLNQPKAV | 87 | SLAETIFIV | 139 | GLLDCPIFL |
| 35 | GLAEFQENV | 88 | AILNVDEKNQV | 140 | VLIEYNFSI |
| 36 | KLLAVIHEL | 89 | RLFEEVLGV | 141 | TLYNPERTITV |
| 37 | TLHDQVHLL | 90 | YLDEVAFML | 142 | AVPPPPSSV |
| 38 | TLYNPERTITV | 91 | KLIDEDEPLFL | 143 | KLQEELNKV |
| 39 | KLQEKIQEL | 92 | KLFEKSTGL | 144 | KLMDPGSLPPL |
| 40 | SVLEKEIYSI | 93 | SLLEVNEASSV | 145 | ALIVSLPYL |
| 41 | RVIDDSLVVGV | 94 | GVYDGREHTV | 146 | FLLDGSANV |
| 42 | VLFGELPAL | 95 | GLYPVTLVGV | 147 | ALDPSGNQLI |
| 43 | GLVDIMVHL | 96 | ALLSSVAEA | 148 | ILIKHLVKV |
| 44 | FLNAIETAL | 97 | TLLEGISRA | 149 | VLLDTILQL |
| 45 | ALLQALMEL | 98 | SLIEESEEL | 150 | HLIAEIHTA |
| 46 | ALSSSQAEV | 99 | ALYVQAPTV | 151 | SMNGGVFAV |
| 47 | SLITGQDLLSV | 100 | KLIYKDLVSV | 152 | MLAEKLLQA |
| 48 | QLIEKNWLL | 101 | ILQDGQFLV | 153 | YMLDIFHEV |
| 49 | LLDPKTIFL | 102 | SLLDYEVSI | 154 | ALWLPTDSATV |
| 50 | RLHDENILL | 103 | LLGDSSFFL | 155 | GLASRILDA |
| 51 | YTFSGDVQL | 104 | VIFEGEPMYL | 156 | ALSVLRLAL |
| 52 | GLPSATTTV | 105 | ALSYILPYL | 157 | SYVKVLHHL |
| 53 | GLLPSAESIKL | 106 | FLFVDPELV | 158 | VYLPKIPSW |

| 54 | KTASINQNV | 107 | SEWGSPHAAVP | 159 | NYEDHFPLL |
|----|-----------|-----|-------------|-----|--------------|
| 55 | SLLQHLIGL | 108 | ALSELERVL | 160 | VYIAELEKI |
| 56 | YLMDDFSSL | 109 | SLFESLEYL | 161 | VHFEDTGKTLLF |
| 57 | LMYPYIYHV | 110 | KVLEYVIKV | 162 | VLSPFILTL |
| 58 | KVWSDVTPL | | | 163 | HLLEGSVGV |
| | | | | 164 | ALREEEEGV |
| | | | | 165 | KEADPTGHSY |
| | | | | 166 | TLDEKVAEL |

[00161] Связывающие домены CAR

[00162] В конкретных вариантах осуществления САR, рассматриваемые в настоящем документе, содержат внеклеточный связывающий домен, который специфически связывается с целевым полипептидом, например целевым антигеном, экспрессируемым на опухолевой клетке. Используемые в настоящем документе термины «связывающий домен», «внеклеточный домен»,

[00163] «внеклеточный связывающий домен», «антиген-специфический связывающий домен» и «внеклеточный антиген-специфический связывающий домен» являются взаимозаменяемыми и обозначают CAR со способностью специфически связываться с представляющим интерес целевым антигеном. Связывающий домен может включать любой белок, полипептид, олигопептид или который обладает способностью специфически распознавать пептид, связываться с биологической молекулой (например, с рецептором клеточной поверхности или опухолевым белком, липидом, полисахаридом или другой целевой молекулой клеточной поверхности, или с их компонентом). Связывающий домен может включать любого встречающегося в природе, синтетического, полусинтетического или полученного рекомбинантным путем партнера для связывания представляющей интерес биологической молекулы.

[00164] В конкретных вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR может включать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Термин «антитело» относится к связывающему агенту, который представляет собой полипептид, содержащий по меньшей мере вариабельную область легкой

цепи или тяжелой цепи иммуноглобулина, которая специфически распознает и связывает эпитоп целевого антигена, такой как пептид, липид, полисахарид или нуклеиновая содержащая антигенную детерминанту, кислота, как распознаваемая иммунной клеткой. Антитела МОГУТ включать ИX антигенсвязывающие фрагменты. Этот термин также включает полученные методами генной инженерии формы, такие как химерные антитела (например, гуманизированные мышиные антитела), гетероконъюгатные антитела, например биспецифические антитела, и их антигенсвязывающие фрагменты. См. также Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997.

[00165] В конкретных вариантах осуществления целевой антиген может представлять собой эпитоп полипептида фолатного рецептора альфа, 5Т4, ανβ6-интегрина, ВСМА, В7-Н3, В7-Н6, САІХ, СD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44ν6, CD44ν7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, семейства EGFR, включая ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, фетального AchR, FRα, GD2, GD3, *глипикана-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, ИЛ-11Rα, ИЛ-13Rα2, лямбда-цепи, Lewis-Y, каппа-цепи, мезотелина, Мис1, Мис16, NCAM, NKG2D-лигандов, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, сурвивина, ТАG72, ТЕМ или VEGFR2.

[00166] Вариабельные области легкой и тяжелой цепи могут содержать «каркасную» область, прерываемую тремя гипервариабельными областями, также называемыми «определяющими комплементарность областями» или «CDR». CDR можно определять или идентифицировать с помощью традиционных способов, например с помощью последовательности по Kabat и др. (Wu, TT and Kabat, E.A., J Exp Med. 132(2):211-50, (1970); Borden, P. and Kabat E.A., PNAS, 84:2440-2443 (1987) (см. публикацию Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, которая включена в настоящий документ посредством ссылки) или с помощью структуры согласно Choithia et al (Choithia, C. and Lesk, A.M., J Mol. Biol, 196(4): 901-917 (1987), Choithia, C. et al. Nature, 342: 877-883 (1989)). Полное содержание вышеупомянутых публикаций включено В настоящий документ посредством Последовательности каркасных областей различных легких или тяжелых цепей могут быть относительно консервативными в пределах вида, такого как человек.

Каркасная область антитела, представляющая собой комбинированные каркасные области из составляющих – легкой и тяжелой цепей, может служить для позиционирования и выравнивания CDR в трехмерном пространстве. CDR в первую очередь могут отвечать за связывание с эпитопом антигена. CDR каждой CDR2 и CDR1, обычно обозначаются как CDR3. цепи последовательно, начиная с N-конца, и обычно идентифицируются с помощью которой расположен конкретный CDR. Таким образом. расположенные в вариабельном домене тяжелой цепи антитела, ΜΟΓΥΤ обозначаться как CDRH1, CDRH2 и CDRH3, тогда как CDR, расположенные в вариабельном домене легкой цепи антитела, обозначаются как CDRL1, CDRL2 и CDRL3. Антитела с различной специфичностью (т. е. с различными сайтами связывания для различных антигенов) могут иметь разные CDR. Несмотря на то, что именно CDR различаются от антитела к антителу, только ограниченное число аминокислотных положений в CDR непосредственно участвует в связывании антигена. Такие положения в пределах CDR называются определяющими специфичность остатками (SDR).

[00167] «VH» или «Vн» обозначают вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, включая вариабельную область антитела, Fv, scFv, dsFv, Fab или другого фрагмента антитела. «VL» или «V_L» обозначают вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, включая вариабельную область антитела, Fv, scFv, dsFv, Fab или другого фрагмента антитела.

[00168] «Моноклональное антитело» представляет собой антитело, продуцируемое одним клоном В-лимфоцитов или клеткой, в которую были трансфицированы гены легкой и тяжелой цепей одного антитела. Моноклональные антитела могут быть получены способами, известными специалистам в данной области, например созданием гибридных антителообразующих клеток путем слияния клеток миеломы с иммунными клетками селезенки. Моноклональные антитела могут включать гуманизированные моноклональные антитела.

[00169] «Химерное антитело» содержит каркасные остатки от одного вида, такого как человек, и CDR (которые обычно обеспечивают связывание антигена) от другого вида, такого как мышь. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления CAR, раскрытый в настоящем изобретении, может содержать

антигенспецифический связывающий домен, который представляет собой химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[00170] В некоторых вариантах осуществления антитело может представлять собой гуманизированное антитело (такое как гуманизированное моноклональное антитело), которое специфически связывается с поверхностным белком на клетке. «Гуманизированное» антитело собой опухолевой представляет иммуноглобулин, включающий человеческую каркасную область и один или CDR нечеловеческого (например, несколько мышиного, крысиного или синтетического) иммуноглобулина. Гуманизированные антитела могут быть сконструированы с помощью генной инженерии (см., например, патент США № 5 585 089, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки).

[00171] В вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен САR может содержать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включая, помимо прочего, верблюжий Ig (антитело верблюдовых (VHH)), Ig NAR, Fabфрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab)'2-фрагменты, F(ab)'3-фрагменты, Fv, одноцепочечное Fv-антитело ("scFv"), bis-scFv, (scFv)2, минитело, диатело, триатело, тетратело, стабилизированный дисульфидом белок Fv ("dsFv") и однодоменные антитела (sdAb, нанотело).

[00172] Термин «верблюжий Ig» или «VHH верблюдовых», используемый в настоящем документе, относится к наименьшей известной антигенсвязывающей единице антитела, состоящего из тяжелых цепей (публикация Koch-Nolte, et al., FASEB J., 21:3490-3498 (2007), полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки). Термин «антитело, состоящее из тяжелых цепей» или «антитело верблюдовых» относится к антителу, которое содержит два домена VH и не содержит легких цепей (публикация Riechmann L. et al., J. Immunol. Methods 231:25-38 (1999); международные патентные заявки WO 94/04678; W094/25591; патент США № 6 005 079; полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки).

[00173] Термин «IgNAR» или «новый иммуноглобулиновый антигенный рецептор» обозначает класс антител из иммунного репертуара акул, которые состоят из гомодимеров одного вариабельного домена нового антигенного

рецептора (VNAR) и пяти константных доменов нового антигенного рецептора (CNAR).

[00174] Расщепление антител папаином дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых «Fab»-фрагментами, каждый из которых имеет один антигенсвязывающий сайт, и остаточный «Fc»-фрагмент, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Fabфрагмент содержит вариабельные домены тяжелой и легкой цепи, а также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (СН1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на карбокси-конце домена СН1 тяжелой цепи, включая один или более цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH в настоящем документе обозначает Fab', в котором цистеиновый остаток (остатки) константных доменов имеет свободную тиольную группу. F(ab')2-фрагменты антитела первоначально были получены в виде пар Fab'-фрагментов, между которыми Также располагаются шарнирные цистеины. известны другие варианты химического связывания фрагментов антител.

[00175] «Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный антиген-связывающий сайт. В одноцепочечной молекуле Fv (scFv) один вариабельный домен тяжелой цепи и один вариабельный домен легкой цепи могут быть ковалентно связаны гибким пептидным линкером, благодаря чему легкая и тяжелая цепи могут связываться в «димерную» структуру, аналогичную таковой в двухцепочечной молекуле Fv.

[00176] Термин обозначает «диатела» фрагменты антитела двумя антигенсвязывающими сайтами, эти фрагменты содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (VL) в той же полипептидной цепи (VH-VL). При использовании линкера, который является слишком коротким, чтобы было возможно соединение между двумя доменами одной цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта. Диатела могут быть двухвалентными или биспецифическими. Диатела более полно описаны, например, в европейском патенте EP 404097; международной патентной заявке WO 1993/01161; публикациях Hudson et al, Nat. Med. 9:129-134 (2003); и Hollinger et al, PNAS USA 90: 6444-6448 (1993). Триатела и тетратела также описаны в публикации

Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003). Полное содержание вышеупомянутых публикаций включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00177] Термин «однодоменное антитело» или «sdAb», или «нанотело» обозначает фрагмент антитела, состоящий из вариабельной области тяжелой цепи антитела (домен VH) или вариабельной области легкой цепи антитела (домен (VL) (публикация Holt, L., et al, Trends in Biotechnology, 21(11): 484-490, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки).

[00178] «Одноцепочечные Fv» или «scFv»-фрагменты антитела содержат VH- и VL-домены антитела, где указанные домены присутствуют в одной полипептидной цепи и в любой ориентации (например, VL-VH или VH-VL). Как правило, полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv образовывать желаемую структуру для связывания антигена. Для ознакомления с scFv см., например, публикацию Pluckthun, в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00179] В одном варианте осуществления scFv связывает полипептид фолатного рецептора альфа, 5T4, αvβ6-интегрина, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, семейства EGFR, в том числе ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, фетального AchR, FRα, GD2, GD3, *глипикана-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, ИЛ-11Rα, ИЛ-13Rα2, лямбда-цепи, Lewis-Y, каппа-цепи, мезотелина, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D-лигандов, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, сурвивина, TAG72, ТЕМ или VEGFR2.

[00180] Линкеры CAR

[00181] В некоторых вариантах осуществления САR могут содержать линкерные остатки между различными доменами, например между доменами VH и VL, добавленные для обеспечения соответствующего пространства и конформации молекулы. САR могут содержать один, два, три, четыре или пять или более линкеров. В конкретных вариантах осуществления длина линкера может составлять от примерно 1 до примерно 25 аминокислот, от примерно 5 до примерно

20 аминокислот, или от примерно 10 до примерно 20 аминокислот, или любое промежуточное число аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер может состоять из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более аминокислот. Иллюстративные примеры линкеров включают глициновые полимеры (G)n; глицин-сериновые полимеры (Gi_sSi_5)n, где п представляет собой целое число, по меньшей мере из одного, двух, трех, четырех или пяти; глицин-аланиновые полимеры; аланин-сериновые полимеры; и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Глициновые и глицинсериновые полимеры являются относительно неструктурированными и, следовательно, могут служить нейтральными связующими блоками между доменами гибридных белков, таких как CAR.

Глицин может иметь доступ к значительно большему фи-пси-пространству, чем даже аланин, и может быть гораздо менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. публикацию Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992), полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки). Специалисту в данной области техники будет понятно, что структура CAR в конкретных вариантах осуществления может включать линкеры, которые могут быть полностью или частично гибкими, таким образом что линкер может включать гибкий линкер, а также одну или несколько частей, придающих меньшую гибкость структуре, чтобы обеспечить желаемую структуру CAR.

[00182] В конкретных вариантах осуществления САR может включать scFV, который может дополнительно содержать линкерную последовательность вариабельной области. «Линкерная последовательность вариабельной области» представляет собой аминокислотную последовательность, которая соединяет вариабельную область тяжелой цепи с вариабельной областью легкой цепи и обеспечивает спейсерную функцию, совместимую с взаимодействием двух связывающих субдоменов, вследствие чего полученный в результате этого полипептид сохраняет аффинность специфического связывания к той же целевой молекуле, что и у антитела, которое может содержать такие же вариабельные области легкой и тяжелой цепи. В одном варианте осуществления линкерная последовательность вариабельной области может состоять из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более аминокислот. осуществления конкретном варианте линкерная последовательность вариабельной области может содержать глицин-сериновый полимер (Gi_sSi_5)n,

где n представляет собой целое число из по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления линкерная последовательность вариабельной области содержит аминокислотный линкер (G₄C)₃.

[00183] Спейсерные домены CAR

[00184] В конкретных вариантах осуществления за связывающим доменом CAR может следовать один или несколько «спейсерных доменов», которыми называют область, которая отодвигает антигенсвязывающий домен от поверхности эффекторной клетки для обеспечения надлежащего межклеточного контакта, связывания и активации антигена (публикация Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки). Спейсерный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. В некоторых вариантах осуществления спейсерный собой домен может представлять часть иммуноглобулина, включая, помимо прочего, одну или несколько константных областей тяжелой цепи, например СН2 и СН3. Спейсерный домен может включать аминокислотную последовательность шарнирной области иммуноглобулина или шарнирной области измененного иммуноглобулина. В одном варианте осуществления спейсерный домен может включать CH2 и CH3 от IgG1.

[00185] Шарнирные домены CAR

[00186] За связывающим доменом САR обычно может следовать один или несколько «шарнирных доменов», которые могут играть роль в позиционировании антигенсвязывающего домена вдали от поверхности эффекторной клетки, чтобы обеспечить надлежащий межклеточный контакт, связывание и активацию антигена. САR как правило может включать один или несколько шарнирных доменов между связывающим доменом и трансмембранным доменом (ТМ). Шарнирный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. Шарнирный домен может включать аминокислотную последовательность шарнирной области природного иммуноглобулина или шарнирной области измененного иммуноглобулина. Иллюстративные шарнирные домены, подходящие для использования в САR, могут включать шарнирную область, полученную из внеклеточных областей мембранных белков типа 1, таких как CD8a, CD4, CD28 и CD7, которые могут представлять собой шарнирные области дикого типа из этих молекул или могут быть измененными. В другом

варианте осуществления шарнирный домен может включать шарнирную область $\mathsf{CD8}\alpha.$

[00187] Трансмембранные (ТМ) домены CAR

[00188] «Трансмембранный домен» может представлять собой часть CAR, которая может объединять внеклеточную связывающую часть и внутриклеточный сигнальный домен и привязывает CAR к плазматической мембране иммунной эффекторной клетки. ТМ-домен может быть получен ИЗ природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. Иллюстративные ТМ-домены могут быть получены из α-, β- или ζ-цепи Т-клеточного рецептора, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154 (включая, по меньшей мере, их трансмембранную(ые) область(и)). В одном варианте осуществления CAR могут содержать ТМ-домен, полученный из CD8a. В другом варианте осуществления CAR, рассматриваемый в настоящем документе, содержит ТМ-домен, полученный из CD8α, и короткий олиго- или полипептидный линкер длиной предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, который связывает ТМ-домен и внутриклеточный сигнальный домен САР. Глицин-сериновый линкер является особенно подходящим линкером.

[00189] Внутриклеточные сигнальные домены CAR

[00190] В конкретных вариантах осуществления САR могут содержать внутриклеточный сигнальный домен. Термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к той части САR, которая участвует в передаче сигнала об эффективном связывании САR с целевым антигеном во внутреннюю часть иммунной эффекторной клетки, чтобы запустить эффекторную функцию клетки, например активацию, продукцию цитокинов, пролиферацию и цитотоксическую активность, включая высвобождение цитотоксических факторов в связанную с CAR целевую клетку, или другие клеточные ответы, запускаемые связыванием антигена с внеклеточным доменом CAR.

[00191] Термин «эффекторная функция» обозначает специализированную функцию клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или содействие активности, включающую секрецию цитокина. Таким образом, термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к той части белка, которая может передавать сигнал эффекторной

функции и которая побуждает клетку на выполнение специализированной функции. Хотя обычно может быть использован весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости в использовании всего домена. В той мере, в какой может быть использована укороченная часть внутриклеточного сигнального домена, такую укороченную часть можно использовать вместо всего домена при условии, что она может передавать сигнал эффекторной функции. Термин «внутриклеточный сигнальный домен» может включать любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции.

[00192] Известно, что сигналов, генерируемых только через ТСР, недостаточно для полной активации Т-клетки и что может также потребоваться вторичный или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клеток опосредуется двумя различными классами внутриклеточных сигнальных доменов: первичными сигнальными доменами, которые инициируют антиген-зависимую **TCR** первичную активацию через (например, комплекс TCR/CD3). костимулирующими сигнальными доменами, которые действуют по антигеннезависимому пути обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала. В предпочтительных вариантах осуществления CAR может включать внутриклеточный сигнальный домен, который может содержать один или несколько «костимулирующих сигнальных доменов» и «первичный сигнальный домен». Первичные сигнальные домены могут регулировать первичную активацию комплекса TCR как стимулирующим, так и ингибирующим образом. Первичные сигнальные домены, которые действуют стимулирующим образом, содержать сигнальные мотивы, известные как «мотивы иммунорецепторов на основе тирозина» или ITAM. Иллюстративные примеры ІТАМ-содержащих первичных сигнальных доменов, которые особенно применимы в настоящем изобретении, могут включать таковые, полученные из ΤСRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления CAR может включать первичный сигнальный домен CD3ζ и один или несколько костимулирующих сигнальных доменов. Внутриклеточные первичные сигнальные и костимулирующие сигнальные домены могут быть связаны в любом порядке в тандеме с карбоксильным концом трансмембранного домена.

[00193] CAR могут содержать один или несколько костимулирующих сигнальных доменов для усиления эффективности и размножения Т-клеток, экспрессирующих CAR-рецепторы. Используемый В настоящем документе термин «костимулирующий сигнальный домен» или «костимулирующий домен» обозначает внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы. Иллюстративные примеры таких костимулирующих молекул могут включать CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), CTLA4, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, TRIM, LCK3, SLAM, DAP10, LAG3, HVEM и NKD2C и CD83. В одном варианте осуществления CAR может содержать один или несколько костимулирующих сигнальных доменов, выбранных из группы, состоящей из CD28, CD137 и CD134, а также первичный сигнальный домен CD3ζ.

[00194] В одном варианте осуществления САR может содержать scFv, который связывает полипептид фолатного рецептора альфа, 5T4, α v β 6-интегрина, BCMA, B7-H3, B7-H6, CALX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, семейства EGFR, включая ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, фетального AchR, FR α , GD2, GD3, *глипикана-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-AI+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, ИЛ-11R α , ИЛ-13R α 2, лямбда-цепи, Lewis-Y, каппа-цепи, мезотелина, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D-лигандов, NY-ESO-1, PRA ME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, сурвивина, TAG72, TEM или VEGFR2; трансмембранный домен, полученный из полипептида, выбранного из группы, состоящей из CD8 α ; CD4, CD45, PD1 и CD152; и один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов, выбранных из группы, состоящей из CD28, CD54, CD134, CD137, CD152, CD273, CD274 и CD278; и первичный сигнальный домен CD3 ζ .

[00195] В другом варианте осуществления САR может содержать scFv, который связывает полипептид фолатного рецептора альфа, 5T4, интегрина α v β 6, BCMA, B7-H3, B7-H6, CALX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, семейства EGFR, включая ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, фетального AchR, FR α , GD2, GD3, *глипикана-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, ИЛ-11R α , ИЛ-13R α 2, лямбда-цепи, Lewis-Y, каппа-цепи, мезотелина, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D-лигандов, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX,

сурвивина TAG72, TEM или VEGFR2; шарнирный домен, выбранный из группы, состоящей из шарнира/CH2/CH3 IgG1 и CD8 α , а также CD8 α ; трансмембранный домен, полученный из полипептида, выбранного из группы, состоящей из CD8 α ; CD4, CD45, PD1 и CD152; и один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов, выбранных из группы, состоящей из CD28, CD 134 и CD 137; и первичный сигнальный домен CD3 ζ .

[00196] В еще одном варианте осуществления САР может содержать scFv, дополнительно включающий линкер, который связывает полипептид фолатного рецептора альфа, 5T4, ανβ-интегрина, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD 19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, семейства EGFR, включая ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, фетального AchR, FRα, GD2, GD3, *глипикана-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA -A3+NY-ESO-1, ИЛ-11Rα, ИЛ-13Rα2, лямбда-цепи, Lewis-Y, каппа-цепи, мезотелина, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2Dлигандов, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, сурвивина, TAG72, TEM или VEGFR2; шарнирный домен, выбранный из группы, состоящей из шарнира/CH2/CH3 IgG1 и CD8α, а также CD8α; трансмембранный домен, содержащий ТМ-домен, полученный из полипептида, выбранного из группы, состоящей из CD8a; CD4, CD45, PD1 и CD 152, и короткий олиго- или полипептидный линкер, длиной предпочтительно от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, который связывает ТМ-домен с внутриклеточным сигнальным доменом CAR; и один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов, выбранных из группы, состоящей из CD28, CD134 и CD137; и первичный сигнальный домен CD3ζ.

[00197] В конкретном варианте осуществления САR может содержать scFv, который связывает полипептид фолатного рецептора альфа, 5T4, ανβ6-интегрина, ВСМА, В7-Н3, В7-Н6, САІХ, СD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, семейства EGFR, включая ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, фетального AchR, FRα, GD2, GD3, *глипикана-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, ИЛ-11Rα, ИЛ-13Rα2, лямбда-цепи, Lewis-Y, каппа-цепи, мезотелина, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D-лигандов, NY-ESO-1, PRAME, PSCA,

PSMA, ROR1, SSX, сурвивина, TAG72, TEM или VEGFR2; шарнирный домен, содержащий полипептид CD8α; трансмембранный домен CD8α, содержащий полипептидный линкер из приблизительно 3 аминокислот; один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов, выбранных из группы, состоящей из CD28, CD134 и CD137; и первичный сигнальный домен CD3ζ.

[00198] Вирусы

[00199] В одном варианте осуществления термин «вирусы» относится к встречающимся в природе вирусам, а также к искусственным вирусам. Вирусы в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения могут быть оболочечными или безоболочечными вирусами. Парвовирусы (такие как AAV) являются примерами безоболочечных вирусов. В предпочтительном варианте осуществления вирусы могут быть оболочечными вирусами. предпочтительных вариантах осуществления вирусы могут быть ретровирусами и, лентивирусами. Белки оболочки вирусов, которые способствовать вирусной инфекции эукариотических клеток, могут включать ВИЧ-1 лентивирусные векторы (LV), ИЗ псевдотипированные полученные гликопротеинами (GP) оболочки вируса везикулярного стоматита (VSV-G), модифицированного ретровируса эндогенного кошачьего (RD114TR) модифицированного вируса лейкоза гиббона (GALVTR). Эти белки оболочки могут способствовать эффективно проникновению других вирусов, таких как парвовирусы, включая адено-ассоциированные вирусы (AAV), демонстрируя тем самым свою широкую эффективность. Например, могут быть использованы другие белки вирусной оболочки, включая env MLV 4070 вируса мышиного лейкоза Молони (например, описанного в публикации Merten et al., J. Virol. 79: 834-840, 2005, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки), env RD114 (SEQ ID NO: 2), химерный белок оболочки RD114pro или RDpro (который представляет собой химеру RD114-HIV, которая была сконструирована путем замены последовательности расщепления R-пептида RD114 последовательностью расщепления матрицы/капсида ВИЧ-1 (MA/CA), например, как описано в публикации Bell et al. Experimental Biology and Medicine 2010; 235: 1269-1276, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки), env GP64 бакуловируса (например, как описано в публикации Wang et al. J. Virol. 81: 10869-10878, 2007, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки) или env GALV (например, как описано в

публикации Merten et al., J. Virol. 79: 834-840, 2005, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки), или их производные.

[00200] RD114TR

[00201] RD114TR представляет собой химерный гликопротеин оболочки, полученный из внеклеточного и трансмембранного доменов вируса лейкемии кошек RD114 и цитоплазматического хвоста (TR) оболочки амфотропного вируса лейкоза мышей. RD114TR-псевдотипированные векторы могут опосредовать эффективный перенос генов В человеческие гемопоэтические предшественники и репопулирующие клетки NOD/SCID (публикация Di Nunzio et al., Hum. Gene Ther: Sci., USA, 101 (2007): 9205-9210 (2004), полное содержание которой включено посредством ссылки. RD114-псевдотипированные векторы также могут опосредовать эффективный перенос генов в моделях крупных животных. (публикация Neff et al., Mal. Ther. 2:157-159 (2004); Hu et al., Mal. Ther. 611-617 (2003); и Kelly et al., *Blood Cells, Molecules, & Diseases* 30:132-143 (2003)), полное содержание каждой из этих публикаций включено посредством ссылки.

[00202] Настоящее изобретение 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 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 SEQ ID NO: 1 или NO: 5. Например, может быть использован вариант RD114TR (RD114TRv1 (SEQ ID NO: 5)), который по меньшей мере примерно на 95 %, по меньшей мере примерно на 96 %, по меньшей мере примерно на 97 %, по меньшей мере примерно на 98 % или по меньшей мере примерно на 99 % идентичен последовательности RD114TR (SEQ ID NO: 1). В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к вариантам RD114TR, содержащим аминокислотные модифицированные остатки. Модифицированный аминокислотный остаток может быть выбран из аминокислотной вставки, делеции или замены. В одном варианте осуществления замена, описанная в настоящем документе, представляет собой консервативную аминокислотную замену. То есть аминокислоты RD114TR могут быть заменены другими аминокислотами, имеющими сходные свойства (консервативные изменения, такие как аналогичная

гидрофобность, гидрофильность, антигенность, склонность к образованию или разрушению α-спиральных структур или β-листовых структур). В одном варианте осуществления RD114TR может иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций. В другом варианте осуществления RD114TR может иметь не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций. В еще одном варианте осуществления RD114TR может иметь по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций. Неограничивающие примеры консервативных замен можно найти, например, в публикации Creighton (1984). *Proteins*. WH Freeman and Company, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00203] В другом варианте осуществления настоящее изобретение может включать варианты, имеющие последовательности, 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 98 %, по меньшей мере примерно на 99 % или на 100 % идентичные аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 3, 4 или 5.

[00204] В одном из вариантов осуществления консервативные замены могут включать такие, которые описаны в публикации Dayhoff "The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5", Natl. Biomedical Research, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Например, в одном варианте осуществления аминокислоты, которые принадлежат к одной из следующих групп, могут быть заменены друг на друга, составляя таким образом 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), глутаминовая кислота (E).

[00205] В одном варианте осуществления консервативная аминокислотная замена может включать замену аминокислоты на другую аминокислоту 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 также могут быть выполнены следующим образом: (1) ароматические: Phe, Tyr, His; (2) доноры протона: Asn, Gln, Lys, Arg, His, Trp; и (3) акцепторы протона: Glu, Asp, Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln (см. патент США № 10106805).

[00206] В другом варианте осуществления консервативные замены могут быть выполнены в соответствии с таблицей А. Методы прогнозирования толерантности к модификации белка можно найти, например, в публикации Guo et al. Natl. Acad. Sci., USA, 101(25):9205-9210 (2004), полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00207] Таблица А

| | Соз Консервативные аминокислотные замены | |
|---------|--|---------|
| Amino . | Аминокислота 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 | |

[00208] В одном варианте осуществления экспрессия трансгена при использовании RD114TR-псевдотипированного ретровирусного вектора примерно через 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 варианте осуществления экспрессия трансгена при использовании RD114TR-псевдотипированного ретровирусного вектора на 10 день после трансдукции составляет от примерно 20 % до примерно 60 %, от примерно 30 % до

примерно 50 % или от примерно 35 % до примерно 45 %, в то время как экспрессия трансгена при использовании VSV- G-псевдотипированных векторов на 10-й день после трансдукции составляет примерно от 5 % до примерно 25 %, от примерно 2 % до примерно 20 %, от примерно 3 % до примерно 15 % или от примерно 5 % до примерно 12 %, в тех же условиях. В еще одном варианте осуществления экспрессия трансгена при использовании RD114TR-псевдотипированного ретровирусного вектора на 10-й день после трансдукции составляет около 40 %, в то время как экспрессия трансгена при использовании VSV-G-псевдотипированного вектора на 10-й день после трансдукции составляет около 3,6 %.

[00209] В еще одном варианте осуществления экспрессия трансгена при использовании RD114TR-псевдотипированного ретровирусного вектора примерно на 5-й 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 варианте осуществления экспрессия трансгена при использовании RD114TRпсевдотипированного ретровирусного вектора на 5-й день после трансдукции составляет от примерно 20 % до примерно 50 %, от примерно 15 % до примерно 30 % или от примерно 20 % до примерно 30 %, в то время как экспрессия трансгена при использовании VSV-G-псевдотипированных векторов на 5-й день после трансдукции составляет от примерно 10 % до примерно 20 %, от примерно 15 % до примерно 25 % или от примерно 17,5 % до примерно 20 % в тех же условиях. В еще варианте осуществления экспрессия трансгена при использовании RD114TR-псевдотипированного ретровирусного вектора на 5-й день после трансдукции составляет около 24 %, в то время как экспрессия трансгена при использовании VSV-G-псевдотипированных векторов на 5-й день после трансдукции составляет около 19 %.

[00210] В другом варианте осуществления экспрессия трансгена при использовании RD114TR-псевдотипированного ретровирусного вектора на 10-й 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 или более раз выше, чем экспрессия трансгена при использовании VSV-G-псевдотипированных векторов на 10-й день после трансдукции.

[00211] В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает способы использования ретровируса с псевдотипом RD114TR (например, SEQ ID

NO: 1, SEQ ID NO: 5 или их вариантов) для трансдукции Т-клеток. В другом варианте осуществления Т-клетки более эффективно подвергаются трансдукции ретровирусом с псевдотипом RD114TR (например, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5 или их варианты) по сравнению с ретровирусом с псевдотипом VSV-G (например, SEQ ID NO: 3). В другом варианте осуществления RD114TR-оболочка используется для псевдотипирования лентивектора, который затем используется для трансдукции Т-клеток с превосходной эффективностью.

[00212] Сконструированные уб Т-клетки можно получить различными способами. Например, полинуклеотид, кодирующий экспрессионную кассету, содержащую распознающий опухоль фрагмент или распознающий фрагмент другого типа, можно стабильно ввести в уб Т-клетку с помощью системы транспозон/транспозаза или вирусной системы переноса генов, такой как лентивирусная или ретровирусная способа, система, другого подходящего такого как трансфекция, или электропорация, трансдукция, липофекция, с использованием фосфата кальция (СаРО₄), наноинженерных веществ, таких как ормосил, вирусных способов доставки, включающих использование аденовирусов, ретровирусов, лентивирусов, аденоассоциированных вирусов, или другого подходящего способа. Многие способы с использованием вирусов использовались для генной терапии человека, например способы, описанные в международной патентной заявке WO 1993020221, полное содержание которой включено в настоящий документ. Неограничивающие примеры вирусных способов, которые можно использовать для конструирования уб Т-клеток, могут включать способы с использованием у-ретровируса, аденовируса, лентивируса, вируса простого герпеса, вируса коровьей оспы, вируса оспы или адено-ассоциированного вируса.

[00213] На ФИГ. 2 показано, что активированные Т-клетки МОГУТ быть путем сконструированы трансдукции вирусным вектором, таким RD114TR-вектор RD114TR-вектор, ретровирусный И лентивирусный экспрессирующим интересующие экзогенные гены, такие как αβ ТСR против специфического ракового антигена и CD8, в выделенные уб Т-клетки. Вирусные векторы могут также содержать посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE), такой как PRE сурка (WPRE), для усиления экспрессии трансгена за счет увеличения уровней как ядерной, так и цитоплазматической мРНК. Можно также использовать один или несколько регуляторных элементов, включая мышиный мотив RTE (RNA transport element), конститутивный транспортный элемент (СТЕ) ретровируса обезьян типа 1 (SRV-1) и 5'-нетранслируемую область человеческого белка теплового шока 70 (Hsp70 5' UTR), и/или их же в сочетании с WPRE для повышения экспрессии трансгена. Трансдукцию можно проводить один или несколько раз для достижения стабильной экспрессии трансгена, в небольшом масштабе, например на планшетах от 24 до 4–6 лунок, или в среднем/крупном масштабе в течение ½–5 дней, например 1 дня.

[00214] RD114TR представляет собой химерный гликопротеин, содержащий внеклеточный и трансмембранный домен эндогенного вируса кошек (RD114), слитый с цитоплазматическим хвостом (TR) вируса лейкемии мышей. В одном варианте осуществления экспрессия трансгена при использовании RD114TR-псевдотипированного ретровирусного вектора на 10-й день после трансдукции выше, чем при использовании VSV-G-псевдотипированных векторов.

[00215] Также могут быть использованы другие белки вирусной оболочки, такие как VSV-G env, MLV 4070 env, RD114 env, химерный белок оболочки RD114pro, бакуловирусный GP64 env или GALV env или их производные.

[00216] Невирусные векторы

[00217] Вектор является невирусным вектором, если он не основан на вирусе. Он не содержит каких-либо вирусных компонентов, необходимых для проникновения вектора в клетку. Невирусный вектор может быть выбран из плазмид, миниколец, космид, искусственных хромосом (например, ВАС), линейных ковалентно замкнутых (LCC) ДНК-векторов (например, миниколец, минивекторов и миниузлов), линейных ковалентно замкнутых (LCC) векторов (например, MIDGE, MiLV, мининить, миниплазмиды), мини-интронных плазмид, ДНК-плазмидных векторов экспрессии или генетического редактирования с помощью нуклеаз, например, нуклеаз с цинковыми пальцами (ZFN), подобных активаторам транскрипции эффекторных нуклеаз (TALEN), и коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR).

[00218] В некоторых вариантах осуществления невирусная векторная система для доставки нуклеиновых кислот может включать полимерный конъюгат, состоящий из полиэтиленгликоля (PEG), полиэтиленимина (PEI) и пептидных последовательностей с функциональностью PTD/CPP. Например, белок с доменами пептидной/белковой трансдукции (PTD), также называемые проникающими в клетку пептидами (CPP), может представлять собой ТАТ-пептид

или пептидную последовательность, родственную ТАТ-пептиду. Например, последовательность, родственная ТАТ-пептиду, может представлять собой декапептидную последовательность GRKKKRQRC (SEQ ID NO: 167). В качестве альтернативы можно использовать другие хорошо известные последовательности, родственные ТАТ-пептиду. В дополнение к стабильности в отношении внутриклеточных ферментов (например, в эндосомах, лизосомах) невирусная векторная система для доставки нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению также может быть очень стабильной во внеклеточной среде. Например, по сравнению с РЕІ стабильность ТАТ-РЕG-РЕІ-полиплексов может быть значительно выше в присутствии высоких концентраций гепарина, Alveofact®, BALF и DNase I.

[00219] В некоторых вариантах осуществления полипептиды, например ТСR и САR, описанные в настоящем документе, также могут быть введены в эффекторные клетки, такие как Т-клетки, с использованием невирусных систем доставки, таких как «Система транспозонов «Спящая красавица» (SB)», которая представляет собой систему синтетических ДНК-транспозонов для введения последовательностей ДНК в хромосомы позвоночных. Система описана, например, в патентах США №№ 6 489 458 и 8 227 432, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00220] Система транспозонов «Спящая красавица» может транспозазы «Спящая красавица» (SB) и транспозона SB. ДНК-транспозоны перемещаются из одного участка ДНК в другому простым способом «вырезки и вставки». Транспозиция может быть точным процессом, при котором определенный сегмент ДНК может быть вырезан из одной молекулы ДНК и перемещен в другой участок той же или другой молекулы ДНК или генома. Как и другие транспозазы типа Tc1/mariner, транспозаза SB вставляет транспозон в пару оснований TA динуклеотида в последовательности ДНК реципиента. Место вставки может находиться в другом месте той же молекулы ДНК или в другой молекуле ДНК (или хромосоме). В геномах млекопитающих, включая человека, насчитывается около 200 миллионов сайтов ТА. Сайт вставки ТА может дублироваться в процессе интеграции транспозона. Это дублирование последовательности ТА может быть признаком транспозиции и использоваться для выяснения механизма в некоторых экспериментах. Транспозаза может кодироваться либо внутри транспозона, либо транспозаза может поставляться из другого источника, и в этом случае транспозон становится неавтономным элементом. Неавтономные транспозоны могут быть

полезны в качестве генетических инструментов, поскольку после вставки они не могут независимо продолжать вырезание и повторную вставку. Транспозоны SB предполагается использовать в качестве невирусных векторов для введения генов в геномы позвоночных животных и для генной терапии.

[00221] Коротко говоря, система «Спящая красавица» (SB) (Hackett et al., Mol Ther 18:674-83, (2010)) была адаптирована для генетической модификации Т-клеток (Cooper et al., Blood 105:1622-31, (2005)). Этот процесс включал два этапа: (i) электроперенос плазмид ДНК, экспрессирующих транспозон SB (т. е. химерный антигенный рецептор (CAR) для перенаправления специфичности Т-клеток (Jin et al., Gene Ther 18:849-56, (2011); Kebriaei et al., Hum Gene Ther 23:444-50, (2012)] и транспозазу SB, и (ii) наращивание массы и размножение Т-клеток, стабильно экспрессирующих компоненты сконструированных на искусственных антигенпрезентирующих клетках (иАПК), полученных из клеточной линии K562 (также известных как AaPC (Activating and Propagating Cells, активирующие и размножающиеся клетки)). Полное содержание вышеуказанных публикаций включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления система транспозонов SB может включать кодирующую последовательность, кодирующую mbIL-15, клеточную метку и/или CAR. В одном варианте осуществления система транспозонов SB может включать кодирующую последовательность, кодирующую mbIL-15, клеточную метку и/или TCR. В другом варианте осуществления второй этап (іі) исключается, при этом генетически модифицированные Т-клетки могут быть криоконсервированы или немедленно введены пациенту инфузионно. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные Т-клетки могут не подвергаться криоконсервации перед инфузией пациенту. В некоторых вариантах осуществления транспозаза «Спящая красавица» может представлять собой SB11, SB100X или SB110.

[00222] Невирусная векторная система для доставки нуклеиновых кислот по настоящей заявке может быть введена пациенту в составе фармацевтически приемлемой композиции либо путем ингаляции, перорально, ректально, парентерально, внутривенно, внутримышечно либо подкожно, интрацистернально, интравагинально, внутрибрюшинно, внутрисосудисто, местно (порошок, мазь или капли), посредством внутритрахеальной интубации, внутритрахеальной инстилляции, либо в виде спрея.

[00223] B варианте осуществления сконструированные одном (или трансдуцированные) γδ Т-клетки могут быть размножены ex vivo без стимуляции антигенпрезентирующей клеткой или аминобисфосфонатом. Антиген-реактивные сконструированные Т-клетки по настоящему изобретению могут быть размножены ex vivo и in vivo. В другом варианте осуществления активная популяция сконструированных үб Т-клеток по настоящему изобретению может быть размножена ex vivo без антигенной стимуляции антигенпрезентирующей клеткой, антигенным пептидом, непептидной молекулой или низкомолекулярным соединением, таким как аминобисфосфонат, но с использованием определенных антител, цитокинов, митогенов или гибридных белков, таких как гибрид ИЛ-17-Fc. гибрид MICA-Fc и гибрид CD70-Fc. Примеры антител, которые быть использованы при размножении популяции γδ Т-клеток, могут включать анти-CD3, анти-CD27, анти-CD30, анти-CD70, анти-OX40, анти-NKG2D или анти-CD2 антитела, примеры цитокинов могут включать ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-21, ИЛ-18, ИЛ-9, ИЛ-7 и/или ИЛ-33, а примеры митогенов могут включать лиганд CD70 для CD27 человека, фитогемагглютинин (PHA), конкавалин A (ConA), митоген лакомы (PWM), агглютинин арахиса (PNA), агглютинин сои (SBA), агглютинин чечевицы пищевой (LCA), агглютинин зеленого горошка (PSA), агглютинин виноградной улитки (HPA), лектин vicia graminea (VGA) или другой подходящий митоген, способный стимулировать пролиферацию Т-клеток. В другом варианте осуществления популяция сконструированных үб Т-клеток может быть размножена менее чем за 60 дней, менее чем за 48 дней, 36 дней, менее чем за 24 дня, менее чем за 12 дней или менее чем за 6 дней.

[00224] В другом варианте осуществления настоящее изобретение предлагает способы размножения *ex vivo* популяции сконструированных уб Т-клеток для терапии адоптивного переноса. Сконструированные уб Т-клетки по настоящему изобретению могут быть размножены ex vivo. Сконструированные уб Т-клетки по настоящему изобретению могут быть размножены in vitro без активации с помощью АПК, или без совместного культивирования с АПК, и аминофосфатов.

[00225] В другом варианте осуществления популяция уб Т-клеток может быть размножена in vitro менее чем за 36 дней, менее чем за 35 дней, менее чем за 34 дня, менее чем за 33 дня, менее чем за 32 дня, менее чем за 31 день, менее чем за 30 дней, менее чем за 29 дней, менее чем за 28 дней, менее чем за 27 дней, менее чем за 26 дней, менее чем за 25 дней, менее чем за 24 дня, менее чем за

23 дня, менее чем за 22 дня, менее чем за 21 день, менее чем за 20 дней, менее чем за 19 дней, менее чем за 18 дней, менее чем за 17 дней, менее чем за 16 дней, менее чем за 15 дней, менее чем за 14 дней, менее чем за 13 дней, менее чем за 12 дней, менее чем за 11 дней, менее чем за 10 дней, менее чем за 9 дней, менее чем за 8 дней, менее чем за 7 дней, менее чем за 6 дней, менее чем за 5 дней, менее чем за 4 дня или менее чем за 3 дня.

[00226] На ФИГ. 2 показано, что размножение трансдуцированных или сконструированных уб Т-клеток можно проводить в присутствии цитокинов, например ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-18 и других, в небольших/средних масштабах, например в колбах/биореакторах G-Rex, или в больших масштабах, например в 50 мл-100-литровых мешках, в течение 7-35 дней, например 14-28 дней.

[00227] В некоторых вариантах осуществления популяция уб Т-клеток может повторно стимулирована один или несколько раз во время размножения. Например, сконструированная (или трансдуцированная) популяция уб Т-клеток может быть размножена *ех vivo* в течение некоторого периода времени, а затем повторно стимулирована путем контакта размноженных уб Т-клеток с питающей клеткой. Например, питающая клетка может представлять собой моноцит, МКПК или комбинацию моноцитов и МКПК. В других вариантах осуществления популяцию уб Т-клеток повторно не стимулируют во время размножения.

[00228] В некоторых вариантах осуществления питающая клетка является аутологичной для человека-субъекта. В одном варианте осуществления питающая клетка является аллогенной для человека-субъекта.

[00229] В некоторых вариантах осуществления питающая клетка обеднена αβ Т-клетками.

[00230] В некоторых вариантах осуществления питающую клетку активировали аминобисфосфонатом, таким как золедроновая кислота, перед добавлением к популяции уб Т-клеток.

[00231] В другом варианте осуществления питающая клетка может представлять собой клеточную линию, такую как линия опухолевых клеток или линия лимфобластоидных клеток. В другом варианте осуществления питающая клетка может быть опухолевой клеткой, такой как аутологичная опухолевая клетка. В одном варианте осуществления опухолевая клетка может представлять собой клетку K562. В некоторых вариантах осуществления питающая клетка

представляет собой сконструированную опухолевую клетку, содержащую по меньшей мере один рекомбинантный белок, такой как, например, цитокин. Цитокин может представлять собой, например, CD86, 4-1BBL, ИЛ-15 и любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления ИЛ-15 представляет собой связанный с мембраной ИЛ-15.

[00232] В некоторых вариантах осуществления питающая клетка представляет собой комбинацию любых питающих клеток, описанных в настоящем документе. Например, питающая клетка может представлять собой комбинацию двух или более питающих клеток, выбранных из аутологичных моноцитов, аллогенных моноцитов, аутологичных МКПК, аллогенных МКПК, опухолевой клетки, аутологичной опухолевой клетки, сконструированной опухолевой клетки, клетки К562, опухолевой клеточной линии и лимфобластоидной клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления питающая клетка представляет собой комбинацию МКПК и линии лимфобластоидных клеток.

[00233] В некоторых вариантах осуществления питающую клетку облучают, например у-лучами.

[00234] В некоторых вариантах осуществления размноженные уб Т-клетки и питающие клетки присутствуют в соотношении от примерно 1:1 до примерно 50:1 (питающие клетки: размноженные уб Т-клетки). Например, размноженные уб Т-клетки и питающая клетка присутствуют в соотношении примерно от 2:1 до примерно 20:1 (питающие клетки: размноженные уб Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления размноженные уб Т-клетки и питающая клетка присутствуют в соотношении примерно 1:1, примерно 1,5:1, примерно 2:1, примерно 3:1, примерно 4:1, примерно 5: 1, примерно 6:1, примерно 7:1, примерно 8:1, примерно 9:1, примерно 10:1, примерно 11:1, примерно 12:1, примерно 13:1, примерно 14:1, примерно 15: 1, примерно 20:1, примерно 25:1, примерно 30:1, примерно 35:1, примерно 40:1, примерно 45:1 или примерно 50:1 (питающие клетки: размноженные уб Т-клетки).

[00235] В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток по настоящему изобретению может быть повторно стимулирована с использованием определенных антител, цитокинов, митогенов или гибридных белков, таких как гибрид ИЛ-17 Fc, гибрид MICA-Fc и гибрид CD70-Fc. Примеры антител, которые могут быть использованы для повторной стимуляции

размноженной популяции үб Т-клеток, могут включать анти-CD3, анти-CD27, анти-CD30, анти-CD70, анти-OX40, анти-NKG2D или анти-CD2 антитела, примеры цитокинов могут включать ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-21, ИЛ-18, ИЛ-9, ИЛ-7 и/или ИЛ-33, а примеры митогенов могут включать лиганд CD70 для CD27 человека, фитогемагглютинин (PHA), конкавалин A (ConA), митоген лакомы (PWM), агглютинин арахиса (PNA), агглютинин сои (SBA), агглютинин чечевицы пищевой (LCA), агглютинин зеленого горошка (PSA), агглютинин виноградной улитки (HPA), лектин vicia graminea (VGA) или другой подходящий митоген, способный стимулировать пролиферацию Т-клеток.

[00236] Повторная стимуляция размноженных уб Т-клеток может быть осуществлена путем контактирования размноженных уб Т-клеток с любой комбинацией агентов повторной стимуляции, таких как питающие клетки, антитела, цитокины, митогены, гибридные белки и т.д., описанные в настоящем документе.

[00237] В некоторых вариантах осуществления размноженные уб Т-клетки повторно стимулируют один раз во время размножения. В других вариантах осуществления размноженные уб Т-клетки повторно стимулируют более одного раза во время размножения. Например, размноженные уб Т-клетки могут быть повторно стимулированы два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз или десять раз или более раз во время размножения. Специалист в данной области может легко оптимизировать число повторных стимуляций, выполняемых во время размножения, в зависимости от условий и продолжительности размножения.

[00238] В некоторых вариантах осуществления размноженные уб Т-клетки повторно стимулируют каждый день во время размножения. В некоторых вариантах осуществления размноженные уб Т-клетки повторно стимулируют более одного раза в день во время размножения. В других вариантах осуществления размноженные уб Т-клетки повторно стимулируют один раз каждые два дня, один раз каждые три дня, один раз каждые четыре дня, один раз каждые пять дней, один раз каждые шесть дней, один раз каждые семь дней, один раз каждые восемь дней, один раз каждые девять дней, один раз каждые десять дней, один раз каждые одиннадцать дней, один раз каждые тринадцать дней, один раз каждые четырнадцать дней и т. д. В других вариантах осуществления размноженные уб Т-клетки повторно стимулируют один раз в

неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю, пять раз в неделю, шесть раз в неделю и т. д. В других вариантах осуществления размноженные уб Т-клетки повторно стимулируют один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз каждые четыре недели и т. д. Специалист в данной области может легко оптимизировать продолжительность промежутка времени между повторными стимуляциями, выполняемыми во время размножения, в зависимости от условий и продолжительности размножения.

[00239] Следует понимать, что когда во время размножения выполняется несколько повторных стимуляций, каждая повторная стимуляция может быть идентичной или другой. Например, каждую повторную стимуляцию можно проводить с использованием любой комбинации агентов для повторной стимуляции, описанных в настоящем документе, в любом количестве. Конкретные используемые агенты для повторной стимуляции и их количества могут быть одинаковыми или разными для каждой повторной стимуляции.

[00240] Размноженные трансдуцированные Т-клеточные продукты затем могут быть подвергнуты криоконсервации в качестве готовых Т-клеточных продуктов для инфузии пациентам.

[00241] Способы лечения

[00242] Композиции, содержащие сконструированные уб Т-клетки, описанные в профилактического настоящем документе, можно вводить ДЛЯ и/или терапевтического лечения. В терапевтических целях фармацевтические композиции можно вводить субъекту, уже страдающему от заболевания или патологического состояния, в количестве, достаточном для излечения или, по меньшей мере, частичного купирования СИМПТОМОВ заболевания патологического состояния. Сконструированную үб Т-клетку также можно вводить ДЛЯ уменьшения вероятности развития, приобретения или ухудшения Эффективные патологического состояния. количества популяции сконструированных γδ Т-клеток для терапевтического применения ΜΟΓΥΤ варьироваться в зависимости от тяжести и течения заболевания патологического состояния, предшествующей терапии, состояния здоровья субъекта, веса и/или реакции на лекарственные средства и/или клинической оценки лечащим врачом.

[00243] Сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки по настоящему изобретению можно использовать для лечения субъекта, нуждающегося в лечении патологического состояния, например рака, инфекционного заболевания и/или иммунного заболевания, описанного в настоящем документе.

[00244] Способ лечения патологического состояния (например, болезненного состояния) у субъекта с помощью уб Т-клеток может включать введение субъекту терапевтически эффективного количества сконструированных уб Т-клеток. уб Тклетки по настоящему изобретению можно вводить по различным схемам (например, по времени, концентрации, дозировке, интервалам времени между введением доз и/или составу). Субъект также может быть предварительно подготовлен, например, химиотерапией, облучением или их комбинацией перед получением сконструированных уб Т-клеток по настоящему изобретению. Популяция сконструированных уб Т-клеток также может быть заморожена или криоконсервирована перед введением субъекту. Популяция сконструированных уб Т-клеток может включать две или более клеток, которые экспрессируют идентичные, разные или комбинацию идентичных и разных фрагментов распознавания опухоли. Например, популяция сконструированных үб Т-клеток может включать несколько различных сконструированных γδ предназначенных для распознавания разных антигенов или разных эпитопов одного и того же антигена.

[00245] уб Т-клетки по настоящему изобретению можно использовать для лечения различных патологических состояний. В одном варианте осуществления сконструированные уб Т-клетки по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения рака, включая солидные опухоли и гематологические злокачественные новообразования. Неограничивающие примеры рака включают острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, адренокортикальную карциному, СПИД-ассоциированный рак, СПИД-ассоциированную лимфому, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитомы, нейробластому, базальноклеточную карциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости, опухоли головного мозга, такие как астроцитома мозжечка, астроцитому головного мозга/злокачественная медуллобластому, глиому, эпендимому, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, зрительного пути и гипоталамуса, рак молочной железы, бронхиальные аденомы, лимфому Беркитта, карциному неизвестного первичного происхождения, лимфому

центральной нервной системы, астроцитому мозжечка, рак шейки матки, детский рак, хронический лимфолейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронические миелопролиферативные заболевания, рак толстой кишки, кожную Т-клеточную лимфому, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, саркому Юинга, герминогенные опухоли, рак желчного пузыря, рак желудка, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта, глиомы, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоцеллюлярный рак (печени), лимфому Ходжкина, рак гортаноглотки, внутриглазную меланому, островково-клеточную карциному, саркому Капоши, рак почки, рак гортани, рак губы и рак полости рта, липосаркому, рак печени, рак легкого, такой как немелкоклеточный лимфомы, лейкозы, макроглобулинемию, мелкоклеточный рак легкого, злокачественную фиброзную гистиоцитому кости/остеосаркому, медуллобластому, меланомы, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытым первичным раком, рак ротовой полости, множественный синдром эндокринной неоплазии, миелодиспластические синдромы, миелоидный лейкоз, рак полости носа и околоносовых пазух, карциному носоглотки, нейробластому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легкого, рак ротовой полости, рак ротоглотки, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, рак яичников, эпителиальный рак яичников. герминогенные опухоли яичников, рак поджелудочной железы, рак островковых клеток поджелудочной железы, рак околоносовых пазух и полости носа, рак паращитовидной железы, рак полового члена, рак глотки, феохромоцитому, астроцитому шишковидного тела, герминому шишковидного тела, аденому гипофиза, плевропульмональную бластому, неоплазию плазматических клеток, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечный клеточный рак, переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, саркомы, рак кожи, рак кожи из клеток Меркеля, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному, рак желудка, Т-клеточную лимфому, рак горла, тимома, карциному тимуса, рак щитовидной железы, трофобластическую опухоль (гестационную), рак неизвестной первичной локализации, рак уретры, саркому матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса.

[00246] В одном варианте осуществления сконструированные γδ Т-клетки по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения инфекционного заболевания, такого как вирусные или бактериальные инфекции, например лихорадка денге, лихорадка Эбола, вирус Марбург, туберкулез (ТБ), менингит или сифилис, предпочтительно способ используется для лечения устойчивых к антибиотикам штаммов инфекционных организмов, аутоиммунных заболеваний, паразитарных инфекций, таких как малярия, и других заболеваний, таких как рассеянный склероз и болезнь Паркинсона, при условии, что иммунный ответ является ответом МНС класса I.

[00247] В еще одном варианте осуществления сконструированные уб Т-клетки по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения иммунного заболевания, такого как аутоиммунное заболевание. Примерами аутоиммунных заболеваний (включая заболевания, официально не признанные аутоиммунными) являются артрит, хроническая обструктивная болезнь легких, анкилозирующий спондилит, болезнь Крона (один из двух типов идиопатического воспалительного заболевания кишечника «ВЗК»), дерматомиозит, сахарный диабет 1 типа, эндометриоз, синдром Гудпасчера, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре (СГБ), болезнь Хашимото, гнойный гидраденит, болезнь Кавасаки, IgA-нефропатия, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, интерстициальный красная волчанка, смешанное заболевание соединительной ткани, морфея, гравис, нарколепсия, нейромиотония, миастения вульгарная пузырчатка, пернициозная анемия, псориаз, псориатический артрит, полимиозит, первичный рецидивирующий полихондрит, ревматоидный артрит, билиарный цирроз, шизофрения, склеродермия, синдром Шегрена, синдром тугоподвижного человека, височный артериит (также известный как «гигантоклеточный артериит»), язвенный колит (один из двух типов идиопатического воспалительного заболевание кишечника «ВЗК»), васкулит, витилиго и гранулематоз Вегенера.

[00248] Лечение субъекта γδ Т-клетками по настоящему изобретению может быть проведено до, во время и после появления первых клинических симптомов патологического состояния. Лечение субъекта может быть проведено через 1 день, 1 неделю, 6 месяцев, 12 месяцев или 2 года после появления первых клинических симптомов заболевания. Лечение субъекта может продолжаться более 1 дня, 1 недели, 1 месяца, 6 месяцев, 12 месяцев, 2 лет, 3 лет, 4 лет, 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет, 10 лет или более после появления первых клинических симптомов

заболевания. Лечение субъекта может продолжаться менее 1 дня, 1 недели, 1 месяца, 6 месяцев, 12 месяцев или 2 лет после появления первых клинических симптомов заболевания. Лечение может также включать лечение человека в ходе клинических испытаний. Лечение может включать введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей сконструированные үб Т-клетки по настоящему изобретению.

[00249] В другом варианте осуществления введение субъекту сконструированных уб Т-клеток по настоящему изобретению может модулировать активность эндогенных лимфоцитов в организме субъекта. В другом варианте осуществления введение субъекту сконструированных уб Т-клеток может обеспечить антигеном эндогенную Т-клетку и может усилить иммунный ответ. В другом варианте осуществления Т-клетка памяти может представлять собой CD4+ Т-клетку. В другом варианте осуществления Т-клетка памяти может представлять собой CD8+ Т-клетку. В другом варианте осуществления введение субъекту сконструированных уб Т-клеток по настоящему изобретению может активировать цитотоксичность другой иммунной клетки. В другом варианте осуществления другая иммунная клетка может представлять собой CD8+ Т-клетку. другом варианте осуществления другая иммунная клетка может представлять собой естественную варианте осуществления Т-клетку-киллера. В другом введение сконструированных уб Т-клеток по настоящему изобретению может подавлять регуляторную Т-клетку. В другом варианте осуществления регуляторная Т-клетка может представлять собой FOX3+ Treg клетку. В другом варианте осуществления Т-клетка может представлять собой FOX3регуляторная Неограничивающие примеры клеток, активность может быть изменена с помощью сконструированных уб Т-клеток по настоящему изобретению, могут включать гемопоэтические стволовые клетки; B-клетки; CD4; CD8; красные кровяные клетки; белые кровяные клетки; дендритные клетки, включая антигенпрезентирующие клетки; лейкоциты; макрофаги; В-клетки памяти; Т-клетки памяти; моноциты; естественные клетки-киллеры; нейтрофильные гранулоциты; Тхелперы; и Т-киллеры.

[00250] Во время большинства трансплантаций костного мозга можно традиционно использовать комбинацию циклофосфамида с облучением всего тела для предотвращения отторжения иммунной системой субъекта гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в трансплантате. В одном варианте осуществления может

быть проведена инкубация донорского костного мозга с интерлейкином-2 (ИЛ-2) ех vivo для усиления образования лимфоцитов-киллеров в донорском костном мозге. Интерлейкин-2 (ИЛ-2) представляет собой цитокин, который может быть необходим для роста, пролиферации и дифференцировки лимфоцитов дикого типа. Текущие исследования адаптивного переноса уб Т-клеток человеку могут потребовать совместного введения уб Т-клеток и интерлейкина-2. Однако как низкие, так и дозы ИЛ-2 могут давать высокотоксичные побочные Токсичность ИЛ-2 может проявляться во многих органах/системах, особенно в сердце, легких, почках и центральной нервной системе. В другом варианте осуществления настоящее изобретение предлагает способ введения сконструированных уб Т-клеток субъекту без совместного введения нативного цитокина или его модифицированных версий, таких как ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-21. В другом варианте осуществления сконструированные уб Т-клетки могут быть введены субъекту без совместного введения ИЛ-2. В другом варианте осуществления сконструированные уб Т-клетки могут быть введены субъекту во время процедуры, такой как трансплантация костного мозга, без совместного введения ИЛ-2.

[00251] Способ введения

[00252] Одна или несколько популяций сконструированных уб Т-клеток могут быть введены субъекту в любом порядке или одновременно. Если одновременно, то несколько сконструированных уб Т-клеток могут быть введены в виде одной, объединенной формы, такой как внутривенная инъекция, или в виде нескольких форм, например в виде многократных внутривенных инфузий, подкожных инъекций или таблеток. Сконструированные үб Т-клетки могут быть упакованы вместе или по отдельности, в одной упаковке или во множестве упаковок. Одну или все сконструированные уб Т-клетки можно вводить в виде нескольких доз. Если не одновременно, то интервал времени между многократными дозами может варьироваться до такой большого значения как примерно неделя, месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или примерно год. В другом варианте осуществления сконструированные уб Т-клетки могут размножаться в организме субъекта in vivo после введения субъекту. Сконструированные үб Т-клетки можно заморозить, чтобы получить клетки для многократного одним лечения И тем же клеточным препаратом. Сконструированные уб Т-клетки по настоящему изобретению и содержащие их фармацевтические композиции могут быть упакованы в виде набора. Набор может включать инструкцию (например, письменную инструкцию) по применению сконструированных уб Т-клеток и содержащих их композиций.

[00253] В другом варианте осуществления способ лечения рака, инфекционного заболевания или иммунного заболевания включает введение терапевтически эффективного количества сконструированных уб Т-клеток, при этом таковое введение лечит рак, инфекционное заболевание или иммунное заболевание. В других вариантах осуществления терапевтически эффективное количество сконструированных уб Т-клеток может быть введено в течение по меньшей мере примерно 10 секунд, 30 секунд, 1 минуты, 10 минут, 30 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев или 1 года. В другом варианте осуществления терапевтически эффективное количество сконструированных уб Тклеток может быть введено в течение по меньшей мере одной недели. В другом эффективное варианте осуществления терапевтически количество сконструированных үб Т-клеток может быть введено в течение по меньшей мере двух недель.

[00254] Сконструированные уб Т-клетки, описанные в настоящем документе, могут быть введены до, во время или после возникновения заболевания или патологического состояния, и продолжительность введения фармацевтической композиции, содержащей сконструированные уб Т-клетки, может варьироваться. Например, сконструированные үб Т-клетки можно использовать в качестве профилактического средства, и их можно непрерывно вводить субъектам со склонностью к патологическим состояниям или заболеваниям, чтобы уменьшить вероятность возникновения заболевания или патологического состояния. Сконструированные уб Т-клетки можно вводить субъекту во время или как можно скорее после появления симптомов. Введение сконструированных уб Т-клеток можно начинать сразу же при появлении симптомов, в течение первых 3 часов с момента появления симптомов, в течение первых 6 часов с момента появления симптомов, в течение первых 24 часов с момента появления симптомов, в течение 48 часов с момента появления симптомов или в течение любого периода времени с момента появления симптомов. Первоначальное введение может быть осуществлено любым практическим путем, таким как любой путь, описанный в

настоящем документе, с использованием любой описанной здесь лекарственной формы. В другом варианте осуществления введение сконструированных уб Тклеток по настоящему изобретению может представлять собой внутривенное введение. Одна или несколько доз сконструированных уб Т-клеток могут быть введены настолько быстро, насколько это практически осуществимо, после возникновения рака, инфекционного заболевания, иммунного заболевания, сепсиса или вместе с трансплантатом костного мозга и в течение периода времени, необходимого для лечения иммунного заболевания, такого как, например, от примерно 24 часов до примерно 48 часов, от примерно 48 часов до примерно 1 недели, от примерно 1 недели до примерно 2 недель, от примерно 2 недель до примерно 1 месяца, от примерно от 1 месяца до примерно 3 месяцев. Для лечения рака может быть введена одна или несколько доз сконструированных уб Т-клеток спустя годы после возникновения рака, до или после других видов лечения. В другом варианте осуществления сконструированные уб Т-клетки могут быть введены в течение по меньшей мере примерно 10 минут, 30 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов, по меньшей мере 48 часов, по меньшей мере 72 часов, по меньшей мере 96 часов, по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 1 года, по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет, по меньшей мере 4 лет или по меньшей мере 5 лет. Продолжительность лечения может варьироваться для каждого субъекта.

[00255] Обеспечение сохранности

[00256] В одном варианте осуществления γδ Т-клетки могут быть приготовлены в среде для замораживания и помещены в криогенные хранилища, такие как морозильники с жидким азотом (-196°C) или сверхнизкотемпературные морозильники (-65°C, −80°C, −120°C, или -150°C) для длительного хранения в течение по меньшей мере примерно 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 3 лет или по меньшей мере 5 лет. Среда для замораживания может содержать диметилсульфоксид (ДМСО) и/или хлорид натрия (NaCI), и/или декстрозу, и/или декстрансульфат, и/или гидроксиэтилкрахмал

(HES) с буферными агентами физиологического рН для поддержания значения рН от примерно 6,0 до примерно 6,5, от примерно 6,5 до примерно 7,0, от примерно 7,0 до примерно 7,5, от примерно 7,5 до примерно 8,0 или от примерно 6,5 до примерно 7,5. Криоконсервированные уб Т-клетки могут быть разморожены и дополнительно обработаны путем стимуляции антителами, белками, пептидами и/или цитокинами, как описано в настоящем документе. Криоконсервированные уб Т-клетки могут быть разморожены и генетически модифицированы с помощью вирусных векторов (включая ретровирусные, аденоассоциированные вирусные (AAV) и лентивирусные векторы) или невирусных средств (включая РНК, ДНК, например, транспозоны и белки), как описано в настоящем документе. Модифицированные уб Т-клетки могут быть дополнительно подвергнуты криоконсервации для создания банков клеток, в количестве по меньшей мере примерно 1, 5, 10, 100, 150, 200, 500 флаконов, содержащих по меньшей мере примерно 1, 5, 10, 100, 150, 200, 500 ампул, содержащих по меньшей мере примерно 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или по меньшей мере 10^{10} клеток на мл в среде для замораживания. Криоконсервированные банки клеток могут свою функциональность, могут быть разморожены сохранять стимулированы и размножены. В другом варианте осуществления размороженные клетки могут быть стимулированы размножены в подходящих закрытых сосудах, таких как мешки для культивирования клеток и/или биореакторы, для получения достаточных количеств клеток в качестве аллогенного клеточного продукта. Криоконсервированные үб Т-клетки могут сохранять свои биологические функции по меньшей мере в течение около 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 13 месяцев, 15 месяцев, 18 месяцев, 20 месяцев, 24 месяцев, 30 месяцев, 36 месяцев, 40 месяцев, 50 месяцев или по меньшей мере около 60 месяцев в криогенных условиях хранения. В другом варианте осуществления в составе лекарственной формы могут не использоваться консерванты. Криоконсервированные уб Т-клетки могут быть разморожены и введены инфузионно нескольким пациентам в виде готового аллогенного клеточного продукта.

[00257] В одном варианте осуществления сконструированная $\gamma \delta$ Т-клетка, описанная в настоящем документе, может присутствовать в составе препарата в количестве по меньшей мере 1×10^3 клетки/мл, по меньшей мере 2×10^3 клеток/мл, по меньшей мере 4×10^3 клеток/мл, по меньшей

мере 5×10^3 клеток/мл, по меньшей мере 6×10^3 клеток/мл, по меньшей мере 7×10³ клеток/мл, 8×10³ клеток/мл, ПО меньшей мере ПО меньшей мере 9×10³ клеток/мл, 1×10⁴ клеток/мл, меньшей мере меньшей мере ПО ПО 2×10⁴ клеток/мл, 3×10⁴ клеток/мл, ПО меньшей мере ПО меньшей мере 4×10⁴ клеток/мл, меньшей 5×10⁴ клеток/мл, мере меньшей мере ПО ПО 6×10⁴ клеток/мл, 7×10⁴ клеток/мл, меньшей мере меньшей мере ПО ПО 8×10⁴ клеток/мл. 9×10⁴ клеток/мл. меньшей мере меньшей мере ПО ПО 1×10⁵ клеток/мл, 2×10⁵ клеток/мл, меньшей мере меньшей мере ПО ПО 3×10⁵ клеток/мл. 4×10⁵ клеток/мл. меньшей мере меньшей мере ПО ПО 5×10⁵ клеток/мл, 6×10⁵ клеток/мл, ПО меньшей мере ПО меньшей мере 7×10^{5} клеток/мл, 8×10⁵ клеток/мл, меньшей мере меньшей мере ПО ПО 9×10⁵ клеток/мл, ПО меньшей мере 1×10⁶ клеток/мл, ПО меньшей мере 3×10⁶ клеток/мл, 2×10⁶ клеток/мл, ПО меньшей мере ПО меньшей мере 4×10⁶ клеток/мл, меньшей 5×10⁶ клеток/мл, мере меньшей мере ПО ПО 6×10⁶ клеток/мл. 7×10⁶ клеток/мл. меньшей мере меньшей мере ПО ПО 8×10⁶ клеток/мл, меньшей мере 9×10⁶ клеток/мл, меньшей мере ПО ПО 1×10⁷ клеток/мл. 2×10⁷ клеток/мл. меньшей мере меньшей мере ПО ПО 3×10⁷ клеток/мл, меньшей мере 4×10⁷ клеток/мл, меньшей мере ПО ПО 5×10^7 клеток/мл, 6×10⁷ клеток/мл, меньшей мере меньшей мере ПО ПО 7×10^7 клеток/мл. меньшей 8×10⁷ клеток/мл. ПО мере ПО меньшей мере 9×10⁷ клеток/мл, 1×10⁸ клеток/мл, меньшей мере меньшей мере ПО ПО 2×10⁸ клеток/мл, 3×10⁸ клеток/мл, меньшей мере меньшей мере ПО ПО 4×10⁸ клеток/мл. 5×108 клеток/мл, ПО меньшей мере ПО меньшей мере 6×108 клеток/мл, 7×10⁸ клеток/мл, меньшей мере меньшей ПО мере ПО 8×10⁸ клеток/мл. 9×108 клеток/мл, ПО меньшей мере ПО меньшей мере 1×10^9 клеток/мл или более, примерно от 1×10^3 клеток/мл до примерно mbIL 1×10^{8} клеток/мл, примерно от 1×10^{5} клеток/мл до примерно mbIL 1×10^{8} клеток/мл или примерно от 1×10^6 клеток/мл до примерно mbIL 1×10^8 клеток/мл.

[00258] Для разработки жизнеспособных аллогенных Т-клеточных продуктов, например таких, сконструировать экспрессии TCR, которые можно для специфичного опухолевому антигену, химерного CD8a-К например CD4tm/внутриклеточного белка, варианты осуществления настоящего изобретения включают способы, которые МОГУТ максимизировать выход γδ Т-клеток, минимизируя присутствие остаточных $\alpha\beta$ Т-клеток в конечных аллогенных продуктах. Например, варианты осуществления настоящего изобретения могут включать способы размножения и активации γδ Т-клеток путем истощения αβ Т-клеток и добавления в ростовую культуру молекул, таких как амфотерицин В, N-ацетилцистеин (NAC) (или высокие дозы глутамина/глутамакса), ИЛ-2 и/или ИЛ-15.

[00259] В одном варианте осуществления способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для получения аутологичных или аллогенных продуктов в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00260] Настоящее изобретение может быть лучше понято со ссылкой на следующие примеры, которые не ограничивают объем формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

[00261] ПРИМЕР 1

[00262] Повторная стимуляция үб Т-клеток во время размножения с помощью аутологичных клеток приводит к усиленному и более продолжительному размножению.

[00263] На ФИГ. ЗА и ЗВ показано влияние повторной стимуляции аутологичными моноцитами на размножение уб Т-клеток. На ФИГ. ЗА показан процесс размножения, использованный для генерации данных, представленных на ФИГ. ЗВ. Коротко говоря, в день 0 мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), обедненные аβ-ТСR-экспрессирующими Т-клетками (включая CD4+ и CD8+ Т-клетки) («уб Т-клетки»), активировали в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-2 (100 Ед/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл). В день 3 активированные уб-Т-клетки подвергали имитации трансдукции. В день 4 имитационно-трансдуцированные клетки размножали. В день 7 размноженные клетки повторно стимулировали аутологичными моноцитами (полученными путем отбора CD14+ из МКПК (Miltenyi) и активированными с помощью ZOL (100 мкМ) в течение 4 часов) в соотношении 10 (моноциты): 1 (уб Т-клетки). Размноженные клетки в день 14 замораживали.

[00264] На ФИГ. ЗВ показано, что повторная стимуляция аутологичными моноцитами увеличивает кратность роста числа уб Т-клеток, полученных от двух доноров (D1 и D2), по сравнению с таковой без повторной стимуляции. Кратность размножения повторно стимулированных клеток уменьшается через 10 дней. Ко

дню 14 кратность роста числа повторно стимулированных клеток снижается до кратности, аналогичной таковой без повторной стимуляции.

[00265] На ФИГ. 4А и 4В показано влияние повторной стимуляции облученными аутологичными αβ-обедненными МКПК на размножение уδ Т-клеток. На ФИГ. 4А показан процесс размножения, использованный для генерации данных, представленных на ФИГ. 4В. Коротко говоря, в день 0 мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), обедненные αβ-ТСR-экспрессирующими Тклетками (включая CD4+ и CD8+ Т-клетки) («уб Т-клетки»), активировали в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-2 (100 Ед/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл). В день 2 активированные үб-Т-клетки подвергали имитации трансдукции. В день 3 имитационно-трансдуцированные клетки размножали. В день 7 размноженные клетки повторно стимулировали облученными (100 Гр) аутологичными МКПК, αβ-TCR-экспрессирующими Т-клетками (активированными обедненными помощью ZOL (100 мкМ) в течение 4 часов) в соотношении 5:1 или 10:1 (αβобедненные МКПК: уб Т-клетки).

[00266] На ФИГ. 4В показано, что повторная стимуляция αβ-обедненными МКПК в соотношениях 5:1 и 10:1 увеличивает кратность роста числа γδ Т-клеток, полученных от двух доноров (D1 и D2), по сравнению с таковой без повторной стимуляции.

[00267] На ФИГ. 5–11 показано влияние многократных повторных стимуляций аутологичными моноцитами или облученными аутологичными $\alpha\beta$ -обедненными МКПК на размножение $\gamma\delta$ Т-клеток.

[00268] На ФИГ. 5 показан процесс размножения, использованный для генерации данных, представленных на ФИГ. 6-11. Коротко говоря, в день 0 мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), обедненные аβ-ТСR-экспрессирующими Тклетками (включая CD4+ и CD8+ Т-клетки) («уб Т-клетки»), активировали в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-2 (100 Ед/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл). В день 2 активированные уб-Т-клетки подвергали имитации трансдукции. В день 7 и 3 имитационно-трансдуцированные размножали. В клетки день 14 размноженные клетки повторно стимулировали либо 1) аутологичными моноцитами (полученными путем отбора CD14+ из МКПК (Miltenyi) и активированными с помощью ZOL (100 мкМ) в течение 4 часов) в соотношении 1:1, 5:1 или 10:1 (моноциты: үб Т-клетки), либо 2) облученными (100 Гр) аутологичными МКПК, обедненными $\alpha\beta$ -ТСR-экспрессирующими Т-клетками (активированными с помощью ZOL (100 мкМ) в течение 4 часов), в соотношении 10: 1 или 20:1 ($\alpha\beta$ - обедненные МКПК: $\gamma\delta$ Т-клетки).

[00269] На ФИГ. 6А и 6В показано влияние многократных повторных стимуляций аутологичными моноцитами или облученными аутологичными $\alpha\beta$ -обедненными МКПК на размножение $\gamma\delta$ Т-клеток от двух доноров. На ФИГ. 6А показаны данные для донора 1. В контрольных образцах и при более низких соотношениях моноцитов: $\gamma\delta$ Т-клеток размножение стабилизировалось примерно ко дню 14. Однако повторная стимуляция $\gamma\delta$ Т-клеток моноцитами в соотношении 10:1 (моноциты: $\gamma\delta$ Т-клетки) или облученными $\alpha\beta$ -обедненными МКПК в соотношении 20:1 ($\alpha\beta$ -обедненные МКПК: $\gamma\delta$ Т-клетки) в дни 7 и 14 предотвратила выход на это плато, значительно усилив размножение в течение по меньшей мере 17 дней. Например, δ 2-клетки достигли 2498-кратного размножения в день 17 при повторной стимуляции облученными $\alpha\beta$ -обедненными МКПК в соотношении 20:1 ($\alpha\beta$ -обедненные МКПК: $\gamma\delta$ -Т-клетки) в дни 7 и 14 без достижения плато.

[00270] На ФИГ. 6В показано влияние многократных повторных стимуляций аутологичными моноцитами или облученными аутологичными $\alpha\beta$ -обедненными МКПК на размножение $\gamma\delta$ Т-клеток от второго донора. Подобно данным, показанным на ФИГ. 5В, размножение стабилизировалось примерно ко дню 14 в контрольных образцах и при более низких соотношениях моноцитов: $\gamma\delta$ Т-клеток. Однако повторная стимуляция $\gamma\delta$ Т-клеток моноцитами в соотношении 5:1 или 10:1 (моноциты: $\gamma\delta$ Т-клетки) или облученными $\alpha\beta$ -обедненными МКПК в соотношении 10:1 или 20:1 ($\alpha\beta$ -обедненные МКПК: $\gamma\delta$ Т-клетки) на 7-й и 14-й дни предотвратила это плато, значительно усилив размножение в течение mbIL 17 дней. Например, δ 2-клетки достигли 305-кратного размножения в день 17 при повторной стимуляции облученными $\alpha\beta$ -обедненными МКПК в соотношении 20:1 ($\alpha\beta$ -обедненные МКПК: $\gamma\delta$ -Т-клетки) в дни 7 и 14 без достижения плато.

[00271] На ФИГ. 7А-С и 8А-С показано влияние многократных повторных стимуляций аутологичными моноцитами или облученными аутологичными $\alpha\beta$ -

обедненными МКПК на размножение γδ Т-клеток от двух доноров. Эти данные также обобщены в таблице 1 далее.

Таблица 1. Кратность изменения при размножении по сравнению с контрольными условиями в день 21.

| Донор | Питающая клетка | все үб Т-клетки | δ2 Т клетки |
|-------|-----------------|-----------------|-------------|
| D1 | моноциты 10:1 | 1,2 | 1,2 |
| | моноциты 5:1 | 0,5 | 0,5 |
| | моноциты 1:1 | 0,4 | 0,4 |
| | МКПК 20:1 | 12,2 | 13,2 |
| | МКПК 10:1 | - | - |
| D2 | моноциты 10:1 | 5,5 | 5,6 |
| | моноциты 5:1 | 2,6 | 2,6 |
| | моноциты 1:1 | 1,7 | 1,7 |
| | МКПК 20:1 | 18,8 | 19,2 |
| | МКПК 10:1 | 15,6 | 67,8 |

[00272] Как видно из таблицы 1 и ФИГ. 7А-С, кратность роста числа была ниже у донора 1 по сравнению с донором 2 (см. ФИГ. 8А-С). Этот результат можно объяснить внезапным усилением размножения контрольных образцов, наблюдаемым в день 21. Несмотря на это, ясно, что повторная стимуляция облученными аутологичными αβ-обедненными РМВС приводит к более высокой кратности увеличения общего числа γδ Т-клеток по сравнению с повторной стимуляцией аутологичными моноцитами в случае обоих доноров. Этот эффект, по-видимому, в первую очередь связан с увеличением количества δ2 Т-клеток.

[00273] На ФИГ. 9 и 10 показано, что многократные повторные стимуляции аутологичными моноцитами или облученными аутологичными αβ-обедненными МКПК существенно не меняют фенотип памяти размноженных γδ Т-клеток.

Небольшое увеличение экспрессии CD27 было обнаружено в размноженных γδ Тклетках, повторно стимулированных моноцитами 10:1, у обоих доноров.

[00274] На ФИГ. 11А и 11В показано влияние многократных повторных стимуляций аутологичными моноцитами или облученными аутологичными αβ-обедненными МКПК на жизнеспособность размноженных γδ Т-клеток. Снижение жизнеспособности размноженных γδ Т-клеток наблюдалось в условиях повторной стимуляции. Этот эффект был наиболее выражен в γδ Т-клетках, повторно стимулированных облученными аутологичными αβ-обедненными МКПК (20 МКПК: 1 γδ Т-клетка). Жизнеспособность имеет тенденцию к снижению после повторной стимуляции и восстановлению в течение недели.

[00275] ПРИМЕР 2

[00276] Стимуляция үб Т-клеток клетками опухолевого происхождения усиливает размножение и увеличивает его продолжительность.

[00277] На ФИГ. 12А и 12В показано влияние совместного культивирования со сконструированными клетками опухолевого происхождения на γδ Т-клетки. Коротко говоря, в день 0 мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), обедненные αβ-TCR-экспрессирующими Т-клетками (включая CD4+ и CD8+ Т-клетки) («γδ Т-клетки»), активировали в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-2 (100 Ед/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл). К некоторым образцам добавляли облученные клетки опухолевого происхождения (К562) в соотношении 2:1 (клетки опухолевого происхождения: γδ Т-клетки). Другие образцы культивировали на планшетах, покрытых моноклональными антителами против CD28 или CD27. В день 3 активированные γδ-Т-клетки подвергали имитации трансдукции. На 4-й день имитационно-трансдуцированные клетки размножали. Размноженные клетки замораживали в день 21 день.

[00278] На ФИГ. 12А и 12В показано, что үб Т-клетки, полученные от двух доноров (D1 (ФИГ. 12А) и D2 (ФИГ. 12В)), стимулированные облученными клетками опухолевого происхождения +/- ZOL демонстрируют более высокую кратность

роста числа, чем такие клетки, стимулированные анти-CD28 антителом + ZOL, анти-CD27 антителом + ZOL и только ZOL (контроль).

[00279] ПРИМЕР 3

[00280] Стимуляция уб Т-клеток клетками опухолевого происхождения с повторной стимуляцией усиливает размножение уб Т-клеток и увеличивает его продолжительность.

[00281] В таблице 2 обобщены условия проведения этого эксперимента. Коротко говоря, уб Т-клетки, полученные от двух доноров, активировали в день 0 в присутствии ИЛ-2 (100 Ед/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл) +/- золедроната (ZOL) (5 мкМ) +/клеток опухолевого происхождения (2 клетки опухолевого происхождения: 1 Тклетка) +/- повторно стимулировали следующим образом: а) в отсутствие клеток опухолевого происхождения (контроль); b) с облученными клетками опухолевого происхождения дикого типа (K562 WT); с) с облученными модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 2 К562) в отсутствие ZOL; сповторная стимуляция) облученными модифицированными опухолевого происхождения (вариант 2 К562) в отсутствие ZOL с повторной стимуляцией на 7-й и 14-й день; d) с облученными модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 2 K562); и e) облученными модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 1 К562). Клетки подвергали имитационной трансдукции в день 2 и размножали в день 3.

Клетки питали в дни 7, 10, 14 и 17 и необязательно повторно стимулировали в дни 7 и 14. Клетки замораживали в день 21.

Таблица 2.

| Донор | Образец № | Питающая клетка (день 0) | Золедронат (5 мкМ; день 0) | Повторная стимуляция (день 7) | Повторная стимуляция (день 14) |
|-------|---------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| D1 | 1a | н/п | + | - | - |
| | 1b | K562 WT | + | - | - |
| | 1c | К562 вариант 2 | - | - | - |
| | 1с_повто рная стимуляц ия | К562 вариант 2 | - | К562 вариант 2 | К562 вариант 2 |
| | 1d | К562 вариант 2 | + | - | - |
| | 1e | К562 вариант 1 | + | - | - |
| D2 | 2a | н/п | + | - | - |
| | 2b | K562 WT | + | - | - |
| | 2c | К562 вариант 2 | - | - | - |
| | 2с_повто рная стимуляц ия | К562 вариант 2 | - | К562 вариант 2 | К562 вариант 2 |
| | 2 сут. | К562 вариант 2 | + | - | - |
| | 2e | К562 вариант 1 | + | - | - |

[00282] На ФИГ. 13А-С показаны результаты совместного культивирования с различными клетками опухолевого происхождения во время активации уб Т-клеток. На ФИГ. 13А показана кратность роста числа уб Т-клеток, полученных от двух доноров (D1 (левая панель) и D2 (правая панель)), активированных в день 0 в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-2 (100 Ед/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл): 1) в отсутствие клеток опухолевого происхождения (контроль); 2) с облученными опухолевыми клетками дикого типа (K562 WT); 3) с облученными

модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 1 К562); 4) с облученными модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 2 К562); 5) с облученными модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 2 К562) в отсутствие ZOL; и 6) с облученными модифицированными клетками опухолевого происхождения (вариант 2 К562) в отсутствие ZOL с повторной стимуляцией в дни 7 и 14.

[00283] На ФИГ. 13В и 13С показано размножение как б1 (левая панель), так и б2 (правая панель) Т-клеток от донора 1 (ФИГ. 13В) и донора 2 (ФИГ. 13С).

[00284] На ФИГ. 14А и 14В показан процент уб Т-клеток, присутствующих во всей популяции живых клеток в случае донора 1 (ФИГ. 14А) и донора 2 (ФИГ. 14В).

[00285] На ФИГ. 15 показано, что отсутствие золедроната в культуре приводит к формированию поликлональной популяции (как δ 1, так и δ 2 ү δ Т-клеток) по сравнению с условиями, когда золедронат присутствовал в культуре. Клетки собирали в день 21 и анализировали с помощью проточной цитометрии для определения популяций δ 1 и δ 2.

[00286] На ФИГ. 16 показано, что совместное культивирование с клетками опухолевого происхождения не меняет фенотип памяти размноженных уб Т-клеток. Клетки собирали в день 21 и анализировали с помощью проточной цитометрии для определения фенотипа памяти путем обнаружения CD45, CD27 и CCR7 на клеточной поверхности.

[00287] ПРИМЕР 4

[00288] Повторная стимуляция уб Т-клеток аллогенными клетками во время размножения приводит к усиленному и более продолжительному размножению.

[00289] На ФИГ. 17А и 17В показано влияние повторной стимуляции облученными аллогенными МКПК на размножение γδ Т-клеток. Коротко говоря, в день 0 мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), обедненные αβ-ТСR-экспрессирующими Т-клетками (включая CD4+ и CD8+ Т-клетки) («γδ Т-клетки»), активировали в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-2 (100 Ед/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл). В день 2 активированные γδ-Т-клетки подвергали имитации трансдукции. В день 3 имитационно-трансдуцированные клетки размножали. В день 7 размноженные γδ Т-клетки разделили на пять отдельных групп для изучения

эффекта повторной стимуляции аллогенными питающими клетками. Конкретно, в каждую группу обработки поместили 2×10^6 размноженных $\gamma \delta$ Т-клеток. Группы обработки были следующими: 1) ИЛ-2 + ИЛ-15 (контроль); 2) МКПК + LCL + ОКТЗ ИЛ-2; 3) МКПК + ИЛ-2; 4) LCL + ИЛ-2; 5) ОКТЗ + ИЛ-2. Для каждой группы, МКПК = аллогенные МКПК, объединенные от 2-3 доноров, облученные и добавленные в количестве 25×10^6 клеток. LCL = облученные лимфобластоидные клетки, добавленные в количестве 5×10^6 клеток. ОКТЗ = растворимое ОКТЗ, активирующее анти-CD3 антитело, добавленное в количестве 30 нг/мл. ИЛ-2 добавляли в количестве 50 ед./мл.

[00290] Каждую повторную стимуляцию повторяли в день 14 и клетки собирали в день 21 и анализировали.

[00291] На ФИГ. 17А-В показано, что повторная стимуляция аллогенными МКПК и/или LCL увеличивает, без достижения плато, кратность роста числа уб Т-клеток, полученных от двух доноров (D1 и D2), по сравнению с таковой без повторной стимуляции.

[00292] На ФИГ. 18А-С показано, что повторная стимуляция аллогенными МКПК и/или LCL дает поликлональную популяцию (как δ 1, так и δ 2 ү δ Т-клетки). На ФИГ. 18А и 18В показано количество δ 1 клеток в виде процентной доли от живых клеток для двух доноров. Эти данные показывают, что количество δ 1 клеток зависит от донора. На ФИГ. 18С показаны результаты контрольной обработки (ИЛ-2, ИЛ-15) и обработки МКПК + LCL + ОКТЗ (в присутствии ИЛ-2) в день 21, для этих двух доноров.

[00293] На ФИГ. 19А-В показан фенотип памяти размноженных популяций үб Т-клеток после повторной стимуляции с помощью МКПК и/или LCL. Фенотипы памяти измеряли в день 14 вместо дня 21 и, таким образом, повторно стимулировали только один раз в день 7. Размноженные популяции үб Т-клеток анализировали с помощью проточной цитометрии для определения фенотипа памяти путем обнаружения CD45, CD27 и CCR7 на клеточной поверхности. На ФИГ. 19А представлены результаты определения CD27 в размноженных популяциях үб Т-клеток. Наблюдается небольшое снижение процентного содержания CD27 в размноженных үб Т-клетках, повторно стимулированных МКПК + LCL + ОКТ3. На ФИГ. 19В представлена экспрессия CD45 и CCR7. Повышенный процент

ССR7 наблюдается в размноженных уб Т-клетках, повторно стимулированных с помощью МКПК и МКПК+LCL+OKT3.

[00294] ПРИМЕР 5

[00295] Получение аллогенных МКПК, обработанных золедронатом для активации уб Т-клеток.

[00296] Как показано выше в ПРИМЕРЕ 1, свежие аутологичные МКПК, активированные золедронатом (ZOL), а затем облученные, могут быть использованы для повторной стимуляции уб Т-клеток в день 7 и, необязательно, на дополнительных этапах повторной стимуляции (например, в день 14 и т. д.). Однако этот метод требует проведения нескольких сборов донорского материала от клинического донора.

[00297] Чтобы избежать необходимости многократных сборов, можно создать аллогенные банки МКПК, которые активируют с помощью ZOL, для использования в одной или нескольких повторных стимуляциях. Эти аллогенные банки МКПК были созданы следующим образом: замороженные аллогенные МКПК (включая аβ Тклетки), полученные от донора, размораживали и активировали с помощью 100 мкМ ZOL в течение 4 часов. Эти обработанные ZOL аллогенные МКПК затем промывали и замораживали. Замороженные флаконы, содержащие аллогенные МКПК, обработанные ZOL, облучали дозой 50 Гр и хранили для будущего использования. Эти облученные обработанные ZOL аллогенные МКПК размораживали для повторной стимуляции в день 7 производственного процесса.

[00298] ПРИМЕР 6

[00299] Пептид-специфическая киллерная активность трансдуцированных $\gamma\delta$ Т-клеток

[00300] Трансдуцированные $\gamma \delta$ Т-клетки получали способами размножения, показанными в таблице 3.

Таблица 3

| Процесс 1 | Процесс 2 | Процесс 3 | Контроль |
|-----------|-----------|-----------|----------|
| | | | |

| Питающие | Облученные | Активированны | Объединенные | Нет |
|---------------|----------------------|---------------------|---------------------|-------------|
| клетки | K562-41BBL- | e | облученные | |
| | mbIL15 (т.е. | золендронатом | аллогенные | |
| | клетки К 562, | облученные | МКПК (2- | |
| | экспрессирующи | аллогенные | 3 донора) + | |
| | е связанный с | МКПК | LCLs + OKT3 | |
| | мембраной | | | |
| | ИЛ15 и лиганд 4- | | | |
| | 1 BB) | | | |
| Питающие | день 0 | день 7 и день | день 7 и день | Нет |
| клетки | день О | день 7 и день 14 | день / и день 14 | i i le i |
| добавлены в | | 14 | 14 | |
| культуру в | | | | |
| культуру в | | | | |
| Соотношени | Соотношение | Соотношение | Соотношение | Нет |
| е | «2 K562: 1 всех | «20 ΜΚΠΚ: 1 γδ | «1 γδ Т-клетка: | |
| «питающие | клеток (МКПК + | Т-клетки» | 2,5 LCL: | |
| клетки: γδ Т- | γδ Т-клетки)» | | 12,5 МКПК» | |
| клетки» | | | | |
| Цитокины | Клетки, | Клетки, | Клетки, | Клетки, |
| | выращенные в | выращенные в | выращенные в | выращенны |
| | присутствии | присутствии | присутствии | е в |
| | ИЛ15 + ИЛ2 в | ИЛ15+ ИЛ2в | ИЛ15+ ИЛ2 в | присутствии |
| | течение 21 дня | течение 21 дня | течение | ИЛ15 + |
| | производства | производства | первых 7 дней, | ИЛ2 в |
| | | | а затем | течение |
| | | | переведенные | 21 дня |
| | | | только на | производств |
| | | | ИЛ2 после дня | а |
| | | | 7 по день | |
| | | | 21 производств | |
| | | | а | |
| | | | | |

[00301] C использованием вышеупомянутых процессов получали 6.8 % пептид/MHC-специфических TCR-трансдуцированных γδ T (Tet+) клеток с помощью процесса 1; 21,9 % Tet+ клеток с помощью процесса 2; 47,4 % Tet+ клеток с помощью процесса 3 и 28,8 % Tet+ клеток в контроле. Для определения пептидспецифической киллерной активности $\gamma\delta$ Т-клеток, трансдуцированных TCR (TCR-T), эффекторные Т-клетки, т.е. $\gamma\delta$ Т-клетки, размноженные с помощью процесса 1, 2, 3 или контрольного процесса, культивировали совместно с опухолевыми клетками (например, пептид-положительными клетками U2OS, которые могут представлять около 242 копий на клетку, и пептид-отрицательными клетками МСГ-7) в соотношении 3:1 (эффекторная клетка: опухолевая клетка). Нетрансдуцированные $\gamma\delta$ Т-клетки (NT) служат отрицательным контролем. Выживаемость/гибель опухолевых клеток анализировали в режиме реального времени с использованием системы анализа живых клеток Incucyte. На ФИГ. 20А показано, что киллерная активность в отношении пептид-положительных клеток U2OS у $\gamma\delta$ Т-клеток (TCR-T), размноженных с помощью процесса 3, значительно выше, чем таковая у $\gamma\delta$ Т клеток, размноженных с помощью процесса 1 или с помощью процесса 2, и аналогична таковой у $\gamma\delta$ Т клеток, размноженных с помощью контрольного процесса (TCR-T). $\gamma\delta$ TCR-T-клетки размноженные с помощью процесса 2, с помощью процесса 3 и с помощью контрольного процесса, показывают более высокую киллерную активность, чем их соответствующие $\gamma\delta$ NT клетки. По-видимому, нет существенной разницы между киллерной активностью $\gamma\delta$ TCR-Т-клеток и γδ NT клеток, размноженных с помощью процесса 1. На ФИГ. 20В показано, что киллерная активность в отношении пептид-отрицательных клеток MCF-7 у $\gamma\delta$ Т-клеток (TCR-T), размноженных с помощью различных процессов, аналогична таковой у соответствующих нетрансдуцированных $\gamma\delta$ Т-клеток (NT клеток). Эти результаты свидетельствуют о том, что TCR-трансдуцированные $\gamma\delta$ Tклетки, размноженные с помощью процесса 2, процесса 3 и контрольного процесса, могут распознавать и уничтожать опухолевые клетки пептид-специфическим образом.

[00302] ПРИМЕР 7

[00303] Оптимизация производства уб Т-клеток

[00304] На ФИГ. 21 показан процесс производства уб Т-клеток, в т.ч. контрольный процесс и процессы 1-3 (таблица 3), в которых клетки могут быть разморожены,

активированы и/или размножены в присутствии питающих клеток и/или агонистов I или II, например анти-CD3, анти-CD28, анти-41BB, анти-ICOS, анти-CD40 и анти-ОX40 антител. Питающие клетки добавляли в день 0 (процесс 1) или в день 7 (повторная стимуляция) и в день 14 (повторная стимуляция) (процесс 2 и процесс 3). На ФИГ. 22А-22D показано, что плато роста, наблюдаемое у үб Т-клеток, полученных с помощью контрольного процесса (без питающей клетки) (ФИГ. 22А), было преодолено путем стимуляции питающими клетками (например, процесс 1 (ФИГ. 22B), процесс 2 (ФИГ. 22C) и процесс 3 (фиг. 22D)). Потеря үб Т-клеток после активации, наблюдаемая в клетках, полученных с помощью контрольного процесса, процесса 2 и процесса 3, была ниже в клетках, полученных с помощью процесса 2 и процесса 1. С другой стороны, үб Т-клетки, полученные с помощью процесса 2 и процесса 3, демонстрируют более высокую кратность роста числа, чем клетки, полученные с помощью процесса 3, достигли по меньшей мере 10 000-кратного размножения.

[00305] үб Т-клетки, полученные с помощью процесса 3, демонстрируют «более молодой» фенотип Т-клеток.

[00306] Были проанализированы фенотипы үб Т-клеток, полученных с помощью контрольного процесса и процессов 1–3. На ФИГ. 23А показано, что үб-Т-клетки, полученные с помощью процесса 3, в день 14 и день 21 содержат более высокий % үб-Т-клеток, проявляющих фенотип Тст, например CD27+CD45RA-, чем үб-Т-клетки, полученные с помощью с помощью контрольного процесса, процесса 1 или процесса 2. Соответственно, үб-Т-клетки, полученные с помощью процесса 3, в день 14 и день 21 содержат более высокий % үб-Т-клеток, проявляющих фенотип Тст, например CD62L+ (ФИГ. 23B), и меньший % үб-Т-клеток, проявляющих фенотип, отличный от Тст, например CD57+ (ФИГ. 23C), чем үб-Т-клетки, полученные с помощью контрольного процесса, процесса 1 и процесса 2. (π =4; среднее + SD; ANOVA с апостериорным анализом Тьюки по сравнению с контролем; ***** p<0,0001; ***p<0,001; *p<0,01; *p<0,5)

[00307] Влияние на экспрессию белков иммунных контрольных точек в уб Т-клетках, полученных с помощью различных процессов

[00308] Для определения экспрессии белка иммунной контрольной точки в үб Т-клетках, полученных с помощью различных процессов, определяли % PD1+ (ФИГ. 24A), LAG3+ (ФИГ. 24B), TIM3+ (ФИГ. 24C) и TIGIT+ (ФИГ. 24D) үб Т-клеток. На ФИГ.

24А показано, что в день 14 % PD1+ $\gamma\delta$ T-клеток, полученных с помощью процессов 1-3, снижается по сравнению с % таких клеток, полученных с помощью контрольного процесса (C). С другой стороны, % PD1+ $\gamma\delta$ T-клеток, полученных с помощью процесса 1, увеличивается с дня 14 по день 21. % PD1+ $\gamma\delta$ T-клеток, полученных с помощью процесса 2 и процесса 3, является сопоставимым с дня 14 по день 21. На ФИГ. 24В показано, что в день 14 % LAG3+ $\gamma\delta$ T-клеток, полученных с помощью процессов 2 и 3, увеличивается по сравнению с % таких клеток, полученных с помощью контрольного процесса (C). В то время как % LAG3+ $\gamma\delta$ T-клеток, полученных с помощью процессов 2 и 3, сопоставим с дня 14 по день 21, % LAG3+ $\gamma\delta$ T-клеток, полученных с помощью процесса 1, увеличивается с дня 14 по день 21. На ФИГ. 24С показано, что % TIM3+ $\gamma\delta$ T-клеток, полученных с помощью процессов 1–3, снижается с дня 14 по день 21. На ФИГ. 24D показано, что % TIGIT+ $\gamma\delta$ T-клеток, полученных с помощью процессов 1-3, снижается с 14-го по 21-й день.

[00309] Влияние на трансгенную экспрессию үб Т-клеток, полученных с помощью различных процессов

[00310] уб Т-клетки, полученные с помощью процессов 1-3 и контрольного процесса (С), трансдуцировали вирусным вектором, кодирующим СD8αβ и TCRαβ (PTE.CD8.TCR.WPRE), с последующим окрашиванием тетрамера (Tet) пептидамишени (PRAME)/MHC. На ФИГ. 25A показано, что в день 14 после первой повторной стимуляции % Tet+ уб Т-клеток, трансдуцированных с помощью PTE.CD8.TCR.WPRE, полученных с помощью процесса 3, выше, чем % таких клеток, полученных с помощью процесса 1, процесса 2 и контрольного процесса. Нетрансдуцированные (NT) клетки служат отрицательным контролем. γδ Т-клетки, трансдуцированные с помощью PTE.CD8.TCR.WPRE, полученные с помощью процесса 3, произвели больше CD8+PRAME Tet+ уб Т-клеток (39 %, ФИГ. 26C), чем такие клетки, полученные с помощью контрольного процесса (18,4 %, ФИГ. 26А) и с помощью процесса 2 (12,1 %, ФИГ. 26В). Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) аналогична во всех условиях трансдукции. На ФИГ. 25В показано, что число копий трансгена, включенных в уб Т-клетки, полученных с помощью процесса 3, составляет около 2 копий на клетку, что сравнимо с числом копий в случае использования контрольного процесса, и выше, числа копий в случае использования процессов 1 и 2.

[00311] Влияние начальной стимуляции клетками К562 при использовании процесса 1 на трансдукцию и размножение

[00312] Чтобы определить влияние начальной стимуляции клетками К562 на продукты γδ Т-клеток, полученные с помощью процесса 1, как показано на ФИГ. 27А, уб Т-клетки стимулировали в день 0 перед трансдукцией с помощью РТЕ.CD8.TCR.WPRE в день 2 либо уб Т-клетки стимулировали в день 4 после трансдукции с помощью PTE.CD8.TCR.WPRE в день 2. На ФИГ. 27В показано, что кратность роста числа уб Т-клеток, стимулированных в день 4 с трансдукцией или без нее, ниже, чем при стимуляции в день 0. На ФИГ. 28А-28С показано, что в случае уб Т-клеток, стимулированных клетками К562 в день 0, уб Т-клетки, трансдуцированные с помощью 60 мкл, 120 мкл и 240 мкл РТЕ.CD8.TCR.WPRE, давали 8,62 %, 17,5 % и 31,1 % CD8+PRAME Tet+ клеток соответственно. На ФИГ. 28D показано число копий интегрированного трансгена. Хотя уб Т-клетки, трансдуцированные с помощью 240 мкл PTE.CD8.TCR.WPRE, давали 31,1 % CD8+PRAME Tet+ клеток (ФИГ. 28C), число копий интегрированного трансгена составляет 7,53 копии на клетку, что выше предела безопасности 5 копий на клетку. Напротив, на ФИГ. 28Е показано, что уб Т-клетки, трансдуцированные с помощью 60 мкл PTE.CD8.TCR.WPRE с последующей стимуляцией клетками K562 в день 4, давали 31,8 % D8+PRAME Tet+ клеток с числом копий встроенного трансгена 1,71 копий на клетку. Эти данные свидетельствуют о том, что хотя стимуляция клетками K562 на 4-й день после трансдукции может обеспечить достаточную трансдукцию, приводящую к лучшим и более безопасным продуктам Т-клеток, чем стимуляция в 0-й день перед трансдукцией, она может ограничивать размножение.

[00313] Влияние повторной стимуляции на экспрессию трансгена

[00314] На ФИГ. 29 показана экспрессия трансгена (PTE.CD8.TCR.WPRE), например % CD8+PRAME Tet+ $\gamma\delta$ клеток (1) увеличивается с дня 14 по день 21 для клеток, полученных с помощью процесса 1 (n = 2) при стимуляции в день 4; (2) уменьшается с дня 7 по день 21 для клеток, полученных с помощью процесса 2 (n = 4) с повторной стимуляцией в день 7 и день 14; и (3) увеличивается с дня 7 по день 14, а затем уменьшается с дня 14 по день 21 для клеток, полученных с помощью процесса 3 (n = 4) с повторной стимуляцией в день 7 и день 14. Экспрессия трансгена остается на том же уровне для клеток, полученных с помощью контрольного процесса.

[00315] Влияние на функции уб Т-клеток, полученных с помощью различных процессов

На ФИГ. 30 показана функциональная оценка, выполненная в день 14 после первой повторной стимуляции в день 7. уб Т-клетки, полученные с помощью процессов 2 и 3 и контрольного процесса (C), трансдуцировали с помощью PTE.CD8.TCR.WPRE (2-T, 3-T и C-T соответственно) или оставляли без трансдукции (2-NT, 3- NT и C-NT соответственно). CD8+ $\alpha\beta$ Т-клетки, трансдуцированные тем же TCR или не (Р-Т и трансдуцированные, служат положительными контролями Приготовленные таким образом клетки инкубировали с целевыми клетками, например UACC257 (~1081 целевой пептид на клетку), U2OS (~242 целевых пептида на клетку), А375 (~51 целевой пептид на клетку) и МСГ-7 (0 целевых пептидов на клетку) при соотношении эффектор/мишень 3:1, с последующим анализом цитотоксичности. Эффекторные клетки были нормализованы по эффективности трансдукции. На ФИГ. 31А-31С показано, что после первой повторной стимуляции цитолитическая активность уб Т-клеток, полученных с помощью процесса 2 (2-Т) и процесса 3 (3-Т), ниже, чем активность С-Т и Р-Т против клеток UACC257, U2OS и A375 соответственно. ФИГ. 31D демонстрирует минимальную цитолитическую активность уб Т-клеток, полученных с помощью процесса 2 (2-T) и процесса 3 (3-T) против нецелевых клеток MCF7. (ANOVA с апостериорным анализом Тьюки по сравнению с контролем; n = 4 донора; **p<0,01; *p<0,5)

[00316] На ФИГ. 32А и 32В показано, что после первой повторной стимуляции IFNу-секреция уб Т-клетками, полученными с помощью процесса 2 (2) и процесса 3 (3), сравнима с таковой уб Т-клетками, полученными с помощью контрольного процесса (C), против клеток UACC257 и U2OS, соответственно, при соотношении эффектор/мишень 3:1. Эффекторные клетки были нормализованы эффективности трансдукции. ФИГ. 32С демонстрирует минимальную IFNусекрецию уб Т-клетками, полученными с помощью процесса 2 (2) и процесса 3 (3), против нецелевых клеток MCF7. Нетрансдуцированные (NT) клетки служат отрицательным контролем. CD8+ $\alpha\beta$ T-клетки, трансдуцированные тем же TCR, служат положительным контролем (P). (n = 2 донора; 2 технических повтора на донора).

[00317] На ФИГ. 33А и 33В показано, что после первой повторной стимуляции $TNF\alpha$ -секреция $\gamma\delta$ T-клетками, полученными с помощью процесса 2 (2) и процесса 3 (3), снижается по сравнению таковой $\gamma\delta$ T-клетками, полученными с помощью контрольного процесса (C), против клеток UACC257 и U2OS, соответственно, при соотношении эффектор/мишень 3:1. Эффекторные клетки были нормализованы по эффективности трансдукции. ФИГ. 33С демонстрирует минимальную $TNF\alpha$ -секрецию $\gamma\delta$ T-клетками, полученными с помощью процесса 2 (2) и процесса 3 (3), против нецелевых клеток MCF7. Нетрансдуцированные (NT) клетки служат отрицательным контролем. $CD8+\alpha\beta$ T-клетки, трансдуцированные тем же TCR, служат положительным контролем (P). (n = 2 донора; 2 технических повтора на донора).

[00318] На ФИГ. 34A показано, что после первой повторной стимуляции GM-CSFсекреция уб Т-клетками, полученными с помощью процесса 3 (3), увеличивается по сравнению с таковой Т-клетками, полученными помощью процесса 2 (2) и контрольного процесса (С), против UACC257 при соотношении эффектор/мишень 3:1. Эффекторные клетки были нормализованы по эффективности трансдукции. На ФИГ. 34В показано, что это увеличение GM-CSF не наблюдалось против клеток U2OS, которые экспрессируют меньшее число целевого пептида. ФИГ. 34C демонстрирует минимальную GM-CSF-секрецию үб Т-клетками полученными с помощью процесса 2 (2) и процесса 3 (3), против нецелевых клеток МСГ-7. Нетрансдуцированные (NT) клетки служат отрицательным контролем. CD8+ αβ Tклетки, трансдуцированные тем же TCR, служат положительным контролем (Р). (п = 2 донора; 2 технических повтора на донора). Кроме того, не наблюдалось между нетрансдуцированными клетками и трансдуцированными различий клетками в уровнях экспрессии ИЛ-6, перфорина и гранзима В. Другие протестированные аналиты, содержание которых, однако, ниже предела обнаружения, включают ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-12р70 и ИЛ-17а.

[00319] Уничтожение опухолевых клеток үб Т-клетками, полученными с помощью различных процессов

[00320] Анализы уничтожения опухолевых клеток проводили для соотношения эффектор/мишень 5:1. Эффекторные клетки нормализовали по эффективности трансдукции с использованием клеток UACC257 (~1081 целевой пептид на клетку). Клетки UACC257 добавляли к пробам в три разных момента времени, как указано.

На ФИГ. 35А показано, что рост опухолевых клеток UACC257 ингибируется $\gamma\delta$ Т-клетками от донора 1, полученными с помощью процесса 1 (стимуляция на в день 4), процесса 2 и контрольного процесса. CD8+ $\alpha\beta$ Т-клетки, трансдуцированные тем же TCR, служат положительным контролем (Р). На ФИГ. 35В показано, что рост опухолевых клеток UACC257 ингибируется $\gamma\delta$ Т-клетками от донора 2, полученными с помощью процесса 2, процесса 3 и контрольного процесса. CD8+ $\alpha\beta$ Т-клетки, трансдуцированные тем же TCR, служат положительным контролем (Р).

[00321] Была определена экспрессия молекул иммунных контрольных точек, например LAG3, PD-1, TIGIT и TIM3, в трансдуцированных с помощью PTE.CD8.TCR.WPRE $\gamma\delta$ T-клетках, полученных с помощью различных процессов после проведения до 3 опухолевых стимуляций (1, 2 и 3). На ФИГ. 36 показано, что экспрессия LAG3, PD-1, TIGIT и TIM3 сопоставима у $\gamma\delta$ T-клеток, полученных с помощью процесса 1, процесса 2 и контрольного процесса. CD8+ $\alpha\beta$ T-клетки, трансдуцированные тем же TCR, служат в качестве положительного контроля (Положительный).

[00322] ПРИМЕР 8

[00323] Влияние ингибиторов гистондеацетилазы (HDACi) и ИЛ-21 на производство уб Т-клеток

[00324] Wang et.al. показали, что HDACi и ИЛ-21 могут действовать совместно для перепрограммирования эффекторных CD8+ Т-клеток человека в Т-клетки памяти (публикация Cancer Immunol Res June 1 2020 (8) (6) 794-805, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки). Например, предварительная обработка инфильтрирующих опухоль лимфоцитов с помощью HDACi, например субероиланилида гидроксамовой кислоты (SAHA) или панобиностата (Pano), в присутствии ИЛ-21 может увеличить количество аработка температирования.

[00325] Чтобы протестировать влияние HDACi + ИЛ-21 на продукты Т-клеток, полученных с помощью процесса 3 с питающими клетками, на ФИГ. 37 показан план эксперимента, например в Условиях 4 γ δ Т-клетки могут быть активированы в присутствии золедроната + ИЛ-2 + ИЛ-15 в день 0, размножены в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15 с дня 0 по день 6 с последующей повторной стимуляцией питающими клетками по процессу 3 в отсутствие цитокинов в день 7, с последующим

размножением в присутствии HDACi + ИЛ-21 + ИЛ-2 + ИЛ-15 с дня 8 по день 14. При Условиях 5 $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть активированы в присутствии золедроната + ИЛ-2 + ИЛ-15 в день 0, размножены в присутствии HDACi + ИЛ-21 + ИЛ-2 + ИЛ-15 с 0-го по 6-й день с последующей повторной стимуляцией питающими клетками по процессу 3 в отсутствие цитокинов на 7-й день, с последующим размножением в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15 с 8-го по 14-й день.

[00326] На ФИГ. 38 показано, что в отсутствие HDACi и ИЛ-21 повторная стимуляция питающими клетками по процессу 3 (объединенные облученные аллогенные МКПК + LCL + ОКТ3) в день 7 и день 14 приводила к большему количеству CD28+CD62L+ $\gamma\delta$ T-клеток в день 14 и день 21 по сравнению с повторной стимуляцией питающими клетками по процессу 1 (облученные K562-41BBL-mbIL15), питающими клетками по процессу 2 (активированные золедронатом облученные аллогенные МКПК) и с контрольным процессом (без питающих клеток). Количество CD28+CD62L+ $\gamma\delta$ T-клеток снижается после второй повторной стимуляции в день 14 в случае всех процессов. (n = 4; среднее+SD; ANOVA с множественными сравнениями с контролем; ***p<0,0005; *p<0,5)

[00327] Кратность размножения $\gamma\delta$ Т-клеток в Условиях 4 (ИЛ-21 + HDACi (w2)) и Условиях 5 (ИЛ-21 + HDACi (w1)) после первой повторной стимуляции питающими клетками по процессу 3 (объединенные облученные аллогенные МКПК + LCL + OКТ3) определяли в день 7. На ФИГ. 39А-39С показана кратность роста числа $\gamma\delta$ Т-клеток от 3 разных доноров (SD01004687 (ФИГ. 39A), D155410 (ФИГ. 39B) и SD01000256 (ФИГ. 39C), обработанных контролем (без ИЛ-21 + HDACi), ИЛ- 21 + HDACi в течение первой недели (w1) (Условия 5) и ИЛ-21 + HDACi в течение второй недели (w2) (Условия 4). Результаты показывают, что кратность роста числа $\gamma\delta$ Т-клеток, приготовленных с использованием ИЛ-21+ HDACi в течение первой недели (w1) (Условия 5), меньше, чем кратность роста числа $\gamma\delta$ Т-клеток, приготовленных с использованием ИЛ-21 + HDACi, в течение второй недели (w2) (Условия 4) и приготовленных с помощью контрольного процесса. Однако это снижение преодолевается в день 14 после размножения клеток в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15. (** обозначает повторную стимуляцию питающими клетками по процессу 3)

[00328] Были определены количества δ2 и δ1 Т-клеток, полученных в Условиях 4 (ИЛ-21 + HDACi (w2)) и Условиях 5 (ИЛ-21 + HDACi (w1)) после первой повторной стимуляции питающими клетками по процессу 3 на 7-й день. На ФИГ. 40А-40С

показан % живых $\delta 2$ и $\delta 1$ Т-клеток, полученных с помощью контрольного процесса (ФИГ. 40A), ИЛ-21 + HDACi (w1) (ФИГ. 40B) и ИЛ-21 + HDACi (w2) (ФИГ. 40C). ФИГ. 40B демонстрирует уменьшение количества $\delta 2$ Т-клеток в течение первой недели культивирования в присутствии HDACi + ИЛ21 (ИЛ-21 + HDACi (w1)) по сравнению с количеством, полученным с помощью контрольного процесса (ФИГ. 40A). На ФИГ. 40C показано, что количество $\delta 2$ и $\delta 1$ Т-клеток в течение второй недели культивирования в присутствии HDACi + ИЛ21 (ИЛ-21 + HDACi (w2)) сравнимо с количеством, полученным в контрольном процессе (ФИГ. 40A). (** обозначает повторную стимуляцию питающими клетками по процессу 3)

[00329] На ФИГ. 41А показано, что использование HDACi + ИЛ-21 в течение первой недели культивирования (ИЛ-21 + HDACi (w1)) (Условия 5) с переходом на ИЛ-2 + ИЛ-15 в течение второй недели приводило к снижению количества CD28+ CD62L+ $\gamma\delta$ Т-клеток с фенотипом Тст. С другой стороны, использование ИЛ-2 + ИЛ-15 в течение первой недели культивирования с переходом на ИЛ-21 + HDACi (w2) (Условия 4) в течение второй недели приводило к увеличению количества CD28+ CD62L+ $\gamma\delta$ Т-клеток с фенотипом Тст. (n = 3; среднее+SD; ANOVA с множественными сравнениями по сравнению с контролем; ****p<0,0001, **p<0,005)

[00330] Аналогичным образом, на ФИГ. 41В показано, что использование HDACi + ИЛ-21 в течение первой недели культивирования (ИЛ-21 + HDACi (w1)) (Условия 5) с переходом на ИЛ-2 + ИЛ-15 в течение второй недели приводило к снижению количества CD27+ CD45RA $\gamma\delta$ Т-клеток с фенотипом Тст. С другой стороны, использование ИЛ-2 + ИЛ-15 в течение первой недели культивирования с переходом на ИЛ-21 + HDACi (w2) (Условия 4) в течение второй недели приводило к увеличению количества CD27+ CD45RA-Tcm в $\gamma\delta$ Т-клетках. (n = 3; среднее+SD; ANOVA с множественными сравнениями по сравнению с контролем; ****p<0,0001, ***p<0,005)

[00331] На ФИГ. 41С показано, что использование HDACi + ИЛ-21 в течение первой недели культивирования (ИЛ-21 + HDACi (w1)) (Условия 5) или в течение второй недели культивирования (ИЛ-21 + HDACi (w2)) (Условия 4) мало влияет на количество CD57+ $\gamma\delta$ T-клеток. (n = 3; среднее+SD; ANOVA с множественными сравнениями с контролем; **p<0,0005; *p<0,5)

[00332] Таким образом, использование HDACi + ИЛ-21 может стимулировать накопление Тст в уб Т-клетках. Однако количество этого фенотипа Тст может

снизиться после удаления HDACi + ИЛ-21. Кроме того, использование HDACi + ИЛ-21 может влиять на размножение и процент подмножеств δ 1 и δ 2 Т-клеток, если HDACi + ИЛ-21 используется в течение первой недели культивирования (день 0 – день 7).

[00333] Пример 9

[00334] Влияние повторной стимуляции в присутствии ИЛ-12 и ИЛ-18 на производство уб Т-клеток

[00335] На ФИГ. 42 показано, что в день 0 из МКПК удаляли Т-клетки, экспрессирующие αβТСR, с последующей активацией в присутствии золедроната (ZOL) (5 мкМ), ИЛ-2 и ИЛ-15. Затем клетки размножали в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15. В день 7 клетки либо продолжали размножать в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15, либо размножали в присутствии ИЛ-12 и ИЛ-18 и в отсутствие ИЛ-2 и ИЛ-15 с дня 7 по 14 (цитокиновое переключение). Цитокиновое переключение снижало размножение γδ Т-клеток, что говорит о том, что длительное культивирование с ИЛ-12 и ИЛ-18 может оказывать негативное влияние на рост уб Т-клеток. % уб Т-клеток, экспрессирующих ИЛ-2-рецепторы (например, ИЛ-2Rα, ИЛ-2Rβ и ИЛ-2γ), ИЛ-7рецептор (например ИЛ-7Rα) и ИЛ-21-рецептор (ИЛ-21R), определяли в день 0, 7, 10 и 14. Результаты показывают, что цитокиновое переключение с ИЛ-2 + ИЛ-15 на ИЛ-12 + ИЛ-18 в отсутствие ИЛ-2 и ИЛ-15 с 7-го по 14-й день увеличивает % уб Тклеток, экспрессирующих ИЛ-2Ra, ИЛ-2Ry, и ИЛ-21R в клетках, полученных от двух доноров (D155410 (ФИГ. 43A) и SD010004867 (ФИГ. 43B). Пунктирные линии показывают условия использованием ИЛ-12 + ИЛ-18 (цитокиновое С переключение). Цитокиновое переключение мало влияет на % уб Т-клеток, экспрессирующих ИЛ-2Rβ и ИЛ-7Ra.

[00336] Чтобы проверить влияние на размножение уб Т-клеток Условий 3 (примирование с помощью ИЛ-12 + ИЛ-18 при повторной стимуляции на 7-й день и ИЛ-2 + ИЛ-15 после повторной стимуляции), сравнивали кратность роста числа клеток в Условиях 1 (контроль), Условиях 2 (ИЛ-2 + ИЛ-15) и Условиях 3, как показано на ФИГ. 37. Примирование с помощью ИЛ-12 + ИЛ-18 (Условия 3) мало влияет на размножение уб Т-клеток по сравнению контролем и Условиями 2 (ИЛ-2 + ИЛ-15). Нет существенной разницы в кратности размножения уб Т-клеток с примированием с помощью ИЛ-12 + ИЛ-18 и без примирования с помощью ИЛ-12 + ИЛ-18 (ИЛ-2 + ИЛ-15) для клеток, полученных от 3 доноров (SD01004687 (ФИГ. 44A),

D155410 (ФИГ. 44B) и SD010000256 (ФИГ. 44C)). Кроме того, нет существенной разницы между % б1 Т-клеток и % б2 Т-клеток, полученных с примированием с помощью ИЛ-12 + ИЛ-18 (ФИГ. 45А) и без примирования с помощью ИЛ-12 + ИЛ-18 (ИЛ-2 + ИЛ-15) (ФИГ. 45В), по сравнению с контролем (ФИГ. 45С). Фенотип δ2 Тклеток, полученных в Условиях 1 (контроль), Условиях 2 (ИЛ-2, ИЛ-15) и Условиях 3 (примирование с помощью ИЛ-12 + ИЛ-18), как показано на ФИГ. 37, оценивали на 14-й день (7 дней после примирования с помощью ИЛ-12 + ИЛ-18), n = 3 донора. На РИС, 46А показано, что количество уб Т-клеток с фенотипом Тст, например CD27+ CD45RA-, полученных с использованием примирования с помощью ИЛ-12 + ИЛ-18, значительно снижено по сравнению с контрольными условиями и обработкой ИЛ-2 + ИЛ-15. На ФИГ. 46В показано, что количество уб Т-клеток с фенотипом Tcm, например CD28+ CD62L+, полученных с использованием ИЛ-2 + ИЛ-15, значительно снижено по сравнению контрольными условиями примированием с помощью ИЛ-2 + ИЛ-15. На ФИГ. 46С показано, что количество уб Т-клеток с фенотипом, отличным от Tcm, например CD57+, минимально в клетках, полученных в контрольных условиях, с использованием ИЛ-2 + ИЛ-15 и с использованием примирования с помощью ИЛ-12 + ИЛ-18.

[00337] В целом, цитокиновое переключение или примирование с помощью ИЛ-12 + ИЛ-18 может не влиять на размножение или процентное содержание подмножеств б1 и б2 Т-клеток. Цитокиновое переключение или примирование с помощью ИЛ-12 + ИЛ-18 может снижать количество үб Т-клеток с фенотипом Тст к 14-му дню по сравнению с контрольным методом.

[00338] ПРИМЕР 10

[00339] Влияние начальной стимуляции с использованием K562 дикого типа (WT) по сравнению с K562-41BBL-mbIL15 на производство уб Т-клеток

[00340] Таблица 4

| Донор | Процесс | Питающая | Золендронат | Повторная | Повторная |
|---------|---------|------------|-------------|--------------|--------------|
| | | клетка | (5 мкМ) | стимуляция в | стимуляция в |
| | | начальной | начальной | день 7 | день 14 |
| | | стимуляции | стимуляции | | |
| | | | | | |
| D148960 | а | нет | Да | нет | нет |
| | b | K562 WT | Да | нет | нет |

| | С | K562-41BB- mbIL15 | Нет | нет | нет |
|------------|---|----------------------|-----|----------------------|----------------------|
| | d | K562-41BB- mbIL15 | Нет | K562-41BB- mblL15 | K562-41BB- mblL15 |
| | е | K562-41BB- mbIL15 | Да | нет | нет |
| | f | K562-CD86 | Да | нет | нет |
| SD01000723 | а | нет | Да | нет | нет |
| | b | K562 WT | Да | нет | нет |
| | С | K562-41BB- mbIL15 | Нет | нет | нет |
| | d | K562-41BB- mbIL15 | Нет | K562-41BB- mblL15 | K562-41BB- mblL15 |
| | е | K562-41BB- mbIL15 | Да | нет | нет |
| | f | K562-CD86 | Да | нет | нет |

[00341] γδ Т-клетки, взятые от двух доноров (D148960 и SD01000723), приготавливали с использованием начальной стимуляции питающими клетками K562 WT, K562-41BB-mbIL15 или K562-CD86 (клетками K562, сконструированными для экспрессии CD86) в соответствии процессами, показанными в таблице 4.

[00342] Результаты показывают, что, как правило, кратность роста числа всех $\gamma\delta$ Т-клеток, взятых от двух доноров (D148960 (ФИГ. 47А) и SD01000723 (ФИГ. 47В)), приготовленных с помощью процессов b-f, выше, чем у приготовленных с помощью процесса а (контроль). Начальная стимуляция с помощью K562 WT (процесс b) или K562-41BB-mblL15 (процессы c, d и e) дает сопоставимые результаты. В целом, кратность роста числа Т-клеток субпопуляций δ 1 и δ 2, взятых у двух доноров (D148960 (ФИГ. 48А и 48В) и SD01000723 (ФИГ. 49А и 49В), приготовленных с помощью процессов b-f, выше, чем у приготовленных с помощью процесса а (контроль).

[00343] Все публикации, приведенные в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы каждая публикация была конкретно и отдельно указана как включенная посредством ссылки. Ссылка на любую из публикаций предназначена для ее раскрытия до даты подачи заявки и не должна рассматриваться как признание того, что настоящее изобретение не может иметь приоритет перед такой публикацией на основании предшествующего раскрытия.

[00344] Следует понимать, что каждый из элементов, описанных выше, или два или более вместе могут также найти полезное применение в других типах способов, ОТЛИЧНЫХ ОТ типа, описанного выше. Без дальнейшего анализа, вышеизложенное настолько полно раскрывает суть настоящего изобретения, что иные лица могут, с использованием современных знаний, легко адаптировать его для различных приложений, не упуская признаков, которые, с точки зрения предшествующего уровня техники, справедливо составляют сущность общих или частных аспектов настоящего изобретения, как излагается в прилагаемой формуле изобретения. Вышеприведенные варианты осуществления представлены только в качестве примера; объем настоящего изобретения ограничен только следующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1. Способ получения уб Т-клеток, включающий выделение уб Т-клеток из образца крови человека-субъекта, активацию выделенных уб Т-клеток в присутствии питающей клетки и по меньшей мере одного цитокина, необязательно выбранного из группы, состоящей из интерлейкина (ИЛ)-1, ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18, ИЛ- 21, интерферона (IFN)- α и IFN- β , введение в активированные уб Т-клетки вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую Т-клеточный рецептор (TCR) или химерный антигенный рецептор (CAR), и размножение полученных в результате такого введения уб Т-клеток.
- 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что образец крови представляет собой продукт лейкафереза.
- 3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что образец крови представляет собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).
- 4. Способ по любому из пп. 1–3, отличающийся тем, что активация осуществляется дополнительно в присутствии аминобисфосфоната.
- 5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что аминобисфосфонат представляет собой памидроновую кислоту, алендроновую кислоту, золедроновую кислоту, ризедроновую кислоту, ибандроновую кислоту, инкадроновую кислоту, их соль и/или их гидрат.
- 6. Способ, по пункту 4 или 5 отличающийся тем, что аминобисфосфонат представляет собой золедроновую кислоту.
- 7. Способ по любому из пп. 1–6, отличающийся тем, что по меньшей мере один цитокин представляет собой ИЛ-2 и ИЛ-15.
- 8. Способ по любому из пп. 1–7, отличающийся тем, что выделение заключается в приведении образца крови в контакт с антителами к α и β -T-клеточному рецептору (TCR) и удалении α и/или β -TCR-положительных клеток из образца крови.
- 9. Способ по любому из пп. 1–8, отличающийся тем, что питающая клетка представляет собой человеческую клетку, нечеловеческую клетку, инфицированную

вирусом клетку, не инфицированную вирусом клетку, клеточный экстракт, частицу, гранулу, нить или их комбинацию.

- 10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что клетка человека представляет собой клетку К562.
- 11. Способ по п. 9 или п. 10, отличающийся тем, что клетка человека представляет собой сконструированную опухолевую клетку, содержащую по меньшей мере один рекомбинантный белок.
- 12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что по меньшей мере один рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из CD86, 4-1BBL, ИЛ-15 и любой их комбинации.
- 13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что ИЛ-15 представляет собой связанный с мембраной ИЛ-15.
- 14. Способ по любому из пп. 1–13, отличающийся тем, что питающая клетка является облученной.
- 15. Способ по любому из пп. 1–14, отличающийся тем, что выделенные $\gamma \delta$ -Т-клетки и питающую клетку смешивают в соотношении от примерно 1:1 до примерно 50:1 (питающая клетка: выделенные $\gamma \delta$ -Т-клетки).
- 16. Способ по любому из пп. 1–15, отличающийся тем, что вектор представляет собой вирусный вектор или невирусный вектор.
- 17. Способ по любому из пп. 1–16, отличающийся тем, что размножение происходит в отсутствие аминобисфосфоната и в присутствии по меньшей мере одного цитокина.
- 18. Способ по любому из пп. 1–17, дополнительно включающий повторную стимуляцию размноженных γδ Т-клеток.
- 19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что повторная стимуляция включает контактирование размноженных уб Т-клеток с дополнительной питающей клеткой.
- 20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что дополнительная питающая клетка может быть такой же или отличной от питающей клетки.

- 21. Способ по п. 19 или п. 20, отличающийся тем, что размноженные уб Т-клетки и дополнительную питающую клетку смешивают в соотношении от примерно 1:1 до примерно 50:1 (дополнительная питающая клетка: размноженные уб Т-клетки).
- 22. Способ по любому из пп. 19–21, отличающийся тем, что дополнительная питающая клетка выбрана из группы, состоящей из моноцитов, МКПК и их комбинаций.
- 23. Способ по любому из пп. 19–22, отличающийся тем, что дополнительная питающая клетка является аутологичной для человека-субъекта.
- 24. Способ по любому из пп. 19–23, отличающийся тем, что дополнительная питающая клетка является аллогенной для человека-субъекта.
- 25. Способ по любому из пп. 19–24, отличающийся тем, что дополнительная питающая клетка обеднена αβ Т-клетками.
- 26. Способ по любому из пп. 19–25, отличающийся тем, что дополнительную питающую клетку приводят в контакт с аминобисфосфонатом.
- 27. Способ по пункту 26 отличающийся тем, аминобисфосфонат представляет собой золедроновую кислоту.
- 28. Способ по п. 19, отличающийся тем, что дополнительная питающая клетка представляет собой человеческую клетку, нечеловеческую клетку, инфицированную вирусом клетку, не инфицированную вирусом клетку, клеточный экстракт, частицу, гранулу, нить или их сочетание.
- 29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что клетка человека представляет собой клетку К562.
- 30. Способ по п. 28 или п. 29, отличающийся тем, что клетка человека представляет собой сконструированную опухолевую клетку, содержащую по меньшей мере один рекомбинантный белок.
- 31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что по меньшей мере один рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из CD86, 4-1BBL, ИЛ-15 и любой их комбинации.

- 32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что ИЛ-15 представляет собой связанный с мембраной ИЛ-15.
- 33. Способ по любому из пп. 19–32, отличающийся тем, что дополнительная питающая клетка является облученной.
- 34. Способ размножения γδ Т-клеток *in vitro*, включающий выделение γδ Т-клеток из образца крови человека-субъекта, активацию выделенных γδ Т-клеток в присутствии по меньшей мере одного цитокина, необязательно выбранного из группы, состоящей из интерлейкина (ИЛ)-1, ИЛ- 2, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18, ИЛ-21, интерферона (IFN)-α и IFN-β, и одного или более аминобисфосфонатов или питающией клетки, размножение активированных уδ Т-клеток и повторное стимулирование размноженных уб Т-клеток.
- 35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что образец крови представляет собой продукт лейкафереза.
- 36. Способ по п. 34 или 35, отличающийся тем, что образец крови представляет собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).
- 37. Способ по любому из пп. 34–36, отличающийся тем, что аминобисфосфонат присутствует и представляет собой памидроновую кислоту, алендроновую кислоту, золедроновую кислоту, ризедроновую кислоту, ибандроновую кислоту, их соль и/или их гидрат.
- 38. Способ по любому из пп. 34–37, отличающийся тем, что аминобисфосфонат присутствует и представляет собой золедроновую кислоту.
- 39. Способ по любому из пп. 34–38, отличающийся тем, что по меньшей мере один цитокин представляет собой ИЛ-2 и ИЛ-15.
- 40. Способ по любому из пп. 34–39, отличающийся тем, что выделение заключается в приведении образца крови в контакт с антителами к α- и β-Т-клеточному рецептору (TCR) и удалении α- и/или β-TCR-положительных клеток из образца крови.
- 41. Способ по любому из пп. 34–40, отличающийся тем, что питающая клетка присутствует и представляет собой человеческую клетку, нечеловеческую клетку,

инфицированную вирусом клетку, не инфицированную вирусом клетку, клеточный экстракт, частицу, микросферу, нить или их комбинацию.

- 42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что клетка человека представляет собой клетку K562.
- 43. Способ по п. 41 или п. 42, отличающийся тем, что клетка человека представляет собой сконструированную опухолевую клетку, содержащую по меньшей мере один рекомбинантный белок.
- 44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что по меньшей мере один рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из CD86, 4-1BBL, ИЛ-15 и любой их комбинации.
- 45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что ИЛ-15 представляет собой связанный с мембраной ИЛ-15.
- 46. Способ по любому из пп. 41–45, отличающийся тем, что питающая клетка является облученной.
- 47. Способ по любому из пп. 41–46, отличающийся тем, что выделенные γδ-Т-клетки и питающую клетку смешивают в соотношении от примерно 1:1 до примерно 50:1 (питающая клетка: выделенные γδ-Т-клетки).
- 48. Способ по любому из пп. 34–47, дополнительно включающий трансдукцию активированных γδ Т-клеток рекомбинантным вирусным вектором перед проведением размножения.
- 49. Способ по любому из пп. 34–48, отличающийся тем, что размножение происходит в отсутствие аминобисфосфоната и в присутствии по меньшей мере одного цитокина.
- 50. Способ по любому из пп. 34–49, отличающийся тем, что повторная стимуляция представляет собой контакт размноженных $\gamma \delta$ Т-клеток с дополнительной питающей клеткой.
- 51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что дополнительная питающая клетка может быть такой же или отличной от питающей клетки.

- 52. Способ по п. 50 или п. 51, отличающийся тем, что размноженные уб Т-клетки и дополнительную питающую клетку смешивают в соотношении от примерно 1:1 до примерно 50:1 (дополнительная питающая клетка: размноженные уб Т-клетки).
- 53. Способ по любому из пп. 50–52, отличающийся тем, что дополнительная питающая клетка выбрана из группы, состоящей из моноцитов, МКПК и их комбинаций.
- 54. Способ по любому из пп. 50–53, отличающийся тем, что дополнительная питающая клетка является аутологичной для человека-субъекта.
- 55. Способ по любому из пп. 50–54, отличающийся тем, что дополнительная питающая клетка является аллогенной для человека-субъекта.
- 56. Способ по любому из пп. 50–55, отличающийся тем, что дополнительная питающая клетка обеднена αβ Т-клетками.
- 57. Способ по любому из пп. 50–56, отличающийся тем, что дополнительную питающую клетку приводят в контакт с аминобисфосфонатом.
- 58. Способ по пункту 57 отличающийся тем, аминобисфосфонат представляет собой золедроновую кислоту.
- 59. Способ по п. 50, отличающийся тем, что дополнительная питающая клетка представляет собой человеческую клетку, нечеловеческую клетку, инфицированную вирусом клетку, не инфицированную вирусом клетку, клеточный экстракт, частицу, гранулу, нить или их сочетание.
- 60. Способ по п. 59, отличающийся тем, что клетка человека представляет собой клетку К562.
- 61. Способ по п. 59 или п. 60, отличающийся тем, что клетка человека представляет собой сконструированную опухолевую клетку, содержащую по меньшей мере один рекомбинантный белок.
- 62. Способ по п. 61, отличающийся тем, что по меньшей мере один рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из CD86, 4-1BBL, ИЛ-15 и любой их комбинации.

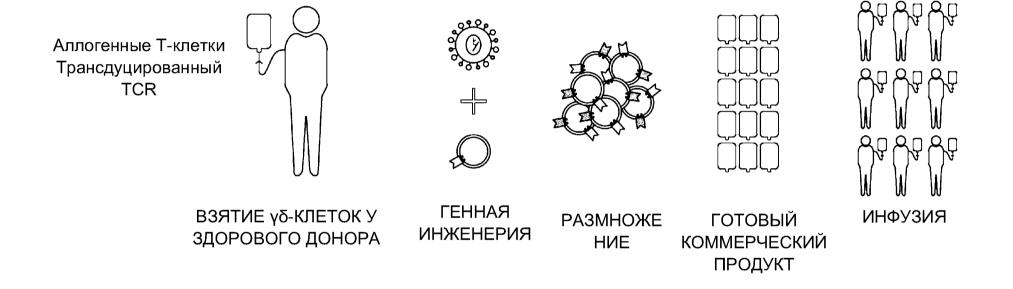
- 63. Способ по п. 62, отличающийся тем, что ИЛ-15 представляет собой связанный с мембраной ИЛ-15.
- 64. Способ по любому из пп. 50–63, отличающийся тем, что дополнительная питающая клетка является облученной.
- 65. Популяция размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, полученная способом по любому из пп. 1-64, в которой плотность размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток составляет по меньшей мере примерно 1×10^5 клеток/мл, по меньшей мере примерно 1×10^6 клеток/мл, по меньшей мере примерно 1×10^8 клеток/мл, по меньшей мере примерно 1×10^8 клеток/мл или по меньшей мере примерно 1×10^9 клеток/мл.
- 66. Способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества размноженных уб Т-клеток, полученных способом по любому из пп. 1–64, или популяции размноженных уб Т-клеток по п. 65.
- 67. Способ по п. 66, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из острого лимфобластного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, адренокортикальной карциномы, СПИД-ассоциированного рака, СПИД-ассоциированной лимфомы, рака анального канала, рака аппендикса, астроцитом, нейробластомы, базально-клеточной карциномы, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, рака кости, опухолей таких как астроцитома мозжечка, астроцитома мозга/злокачественная глиома, эпендимома, медуллобластома, супратенториальные нейроэктодермальные опухоли, примитивные глиома зрительного ПУТИ гипоталамуса, рака молочной железы, бронхиальных аденом, лимфомы Беркитта, карциномы неизвестного первичного происхождения, лимфомы ЦНС, астроцитомы мозжечка, ракы шейки матки, детского рака, хронического лимфолейкоза, лейкоза, хронического миелогенного хронических миелопролиферативных заболеваний, рака толстой кишки, кожной Т-клеточной лимфомы, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, рака эндометрия, эпендимомы, рака пищевода, саркомы Юинга, герминогенных опухолей, рака желчного пузыря, рака желудка, карциноидной опухоли желудочно-кишечного стромальной тракта, опухоли желудочно-кишечного тракта, глиом, волосатоклеточного лейкоза, рака головы и шеи, рака сердца, гепатоцеллюлярного рака (печени), лимфомы Ходжкина,

гортаноглотки, внутриглазной меланомы, карциномы островковых клеток, саркомы Капоши, рака почки, рака гортани, рака губы и полости рта, липосаркомы, рака печени, рака легкого, такого как немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легкого, лимфом, лейкозов. макроглобулинемии, злокачественной фиброзной кости/остеосаркомы, медуллобластомы, меланом, мезотелиомы, метастатического плоскоклеточного рака шеи с неизвестным первичным очагом, рака ротовой полости, синдрома множественной эндокринной неоплазии, миелодиспластических синдромов, миелоидного лейкоза, рака полости носа и околоносовых пазух, карциномы носоглотки, нейробластомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легкого, рака ротовой полости, рака ротоглотки, остеосаркомы/злокачественной фиброзной гистиоцитомы кости, рака яичников, эпителиального рака яичников, герминогенной опухоли яичников, рака поджелудочной железы, рака островковых клеток поджелудочной железы, рака придаточных пазух носа и полости носа, рака паращитовидной железы, рака полового члена, рака глотки, феохромоцитомы, астроцитомы пинеальной области, герминомы пинеальной области, аденомы гипофиза, плевропульмональной бластомы, плазмоклеточной неоплазии, первичной лимфомы центральной нервной системы, рака предстательной железы, рака прямой кишки, почечно-клеточной карциномы, переходно-клеточного рака почечной лоханки и мочеточника, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, рака слюнных желез, сарком, рака кожи, рака кожи из клеток Меркеля, рака тонкой кишки, саркомы мягких тканей, плоскоклеточной карциномы, рака желудка, Т-клеточной лимфомы, рака горла, тимомы, карциномы тимуса, рака щитовидной железы, трофобластной опухоли (гестационной), рака неизвестной первичной локализации, рака уретры, саркомы матки, рака влагалища, рака вульвы, макроглобулинемии Вальденстрема и опухоли Вильмса.

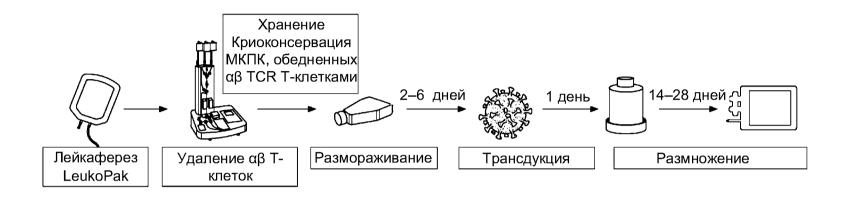
- 68. Способ, по пункту 67 отличающийся тем, что рак представляет собой меланому.
- 69. Способ лечения инфекционного заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества размноженных уб Т-клеток, полученных способом по любому из пп. 1–64, или популяции размноженных уб Т-клеток по п. 65.

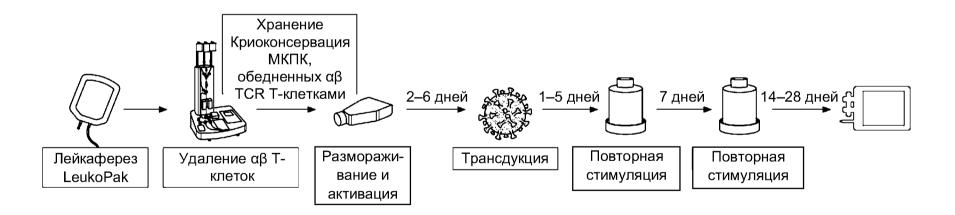
- 70. Способ по п. 69, отличающийся тем, что инфекционное заболевание выбрано из группы, состоящей из лихорадки денге, лихорадки Эбола, вируса Марбург, туберкулеза (ТБ), менингита и сифилиса.
- 71. Способ лечения аутоиммунного заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества размноженных уб Т-клеток, полученных способом по любому из пп. 1–64, или популяции размноженных уб Т-клеток по п. 65.
- 72. Способ по п. 71, отличающийся тем, что аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из артрита, хронической обструктивной болезни легких, анкилозирующего спондилита, болезни Крона (одного из двух типов идиопатического воспалительного заболевания кишечника «ВЗК»), дерматомиозита, сахарного диабета 1-го типа, эндометриоз, синдрома Гудпасчера, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре (СГБ), болезни Хашимото, гнойного гидраденита, болезни Кавасаки, IgAнефропатии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, интерстициального цистита, красной волчанки, смешанного заболевания соединительной ткани, морфеи, миастении гравис, нарколепсии, нейромиотонии, вульгарной пернициозной анемии, псориаза, псориатического артрита, полимиозита, первичного билиарного цирроза, рецидивирующего полихондрита, ревматоидного артрита, шизофрении, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома тугоподвижного человека, височного артериита (также известного как «гигантоклеточный артериит»), язвенного колита (одного из двух типов идиопатического воспалительного заболевания кишечника «ВЗК»), васкулита, витилиго и гранулематоза Вегенера.
- 73. Способ получения уб Т-клеток, включающий выделение уб Т-клеток из образца крови человека-субъекта, активацию выделенных уб Т-клеток в отсутствие питающий клетки, введение вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую Т-клеточный рецептор (TCR) или химерный антигенный рецептор (CAR), в активированные уб Т-клетки и размножение трансдуцированных уб Т-клеток в присутствии питающей клетки.
- 74. Способ по п. 73, отличающийся тем, что активацию, трансдукцию и/или размножение осуществляют в присутствии по меньшей мере одного цитокина,

- выбранного из группы, состоящей из интерлейкина (ИЛ)-1, ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18, ИЛ-21, интерферона (IFN)-α и IFN-β.
- 75. Способ по п. 73 или 74, отличающийся тем, что питающая клетка представляет собой человеческую клетку, нечеловеческую клетку, инфицированную вирусом клетку, не инфицированную вирусом клетку, клеточный экстракт, частицу, микросферу, нить или их комбинацию.
- 76. Способ по любому из пп. 73–75, отличающийся тем, что питающая клетка представляет собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и/или лимфобластоидные клетки (LCL).
- 77. Способ по любому из пп. 73–76, отличающийся тем, что активацию, трансдукцию и/или размножение осуществляют в присутствии ОКТ3.
- 78. Способ по любому из пп. 73–77, отличающийся тем, что вектор представляет собой вирусный вектор или невирусный вектор.
- 79. Способ по любому из пп. 1–64, отличающийся тем, что размноженные γδ Т-клетки представляют собой δ1 и/или δ2 Т-клетки.
- 80. Способ по любому из пп. 1–64 и 73–79, отличающийся тем, что вектор включает собой нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CD8αβ или CD8α.



ФИГ. 1





ФИГ. 2

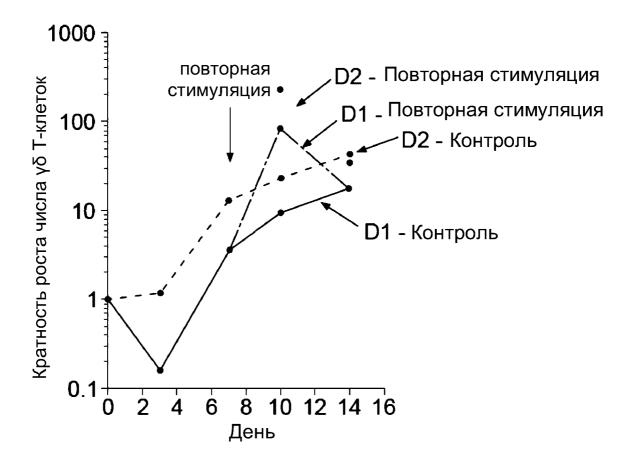
День 0 — Активация αβ-обедненные РВМС 5 мкм ZOL (непрерывно), ИЛ-2 (100 Ед/мл), ИЛ-15 (100 нг/мл) День 3 — имитационная трансдукция

День 4 — размножение

День 7 — ПОВТОРНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ Аутологичные моноциты (отбор CD14+; Miltenyi) Обработка 100 мкМ ZOL в течение 4 часов Совместное культивирование 10 моноцитов: 1 «γδ Т-клетка»

День 14 — Замораживание

ФИГ. ЗА



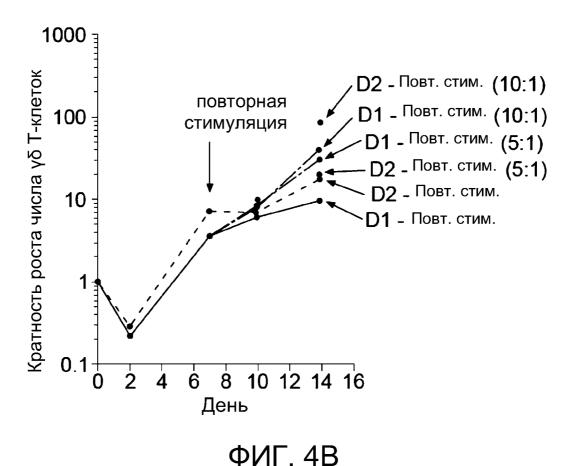
ФИГ. 3В

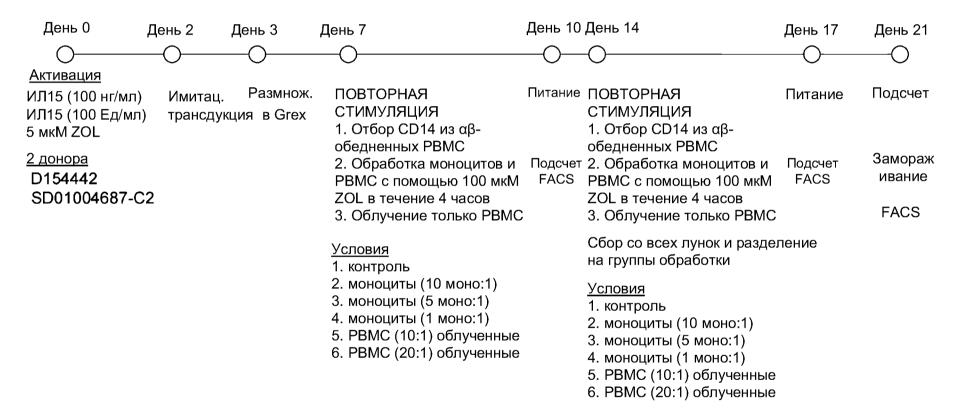
День 0 — Активация αβ-обедненные РВМС 5 мкм ZOL (непрерывно), ИЛ-2 (100 Ед/мл), ИЛ-15 (100 нг/мл) День 2 — имитационная трансдукция

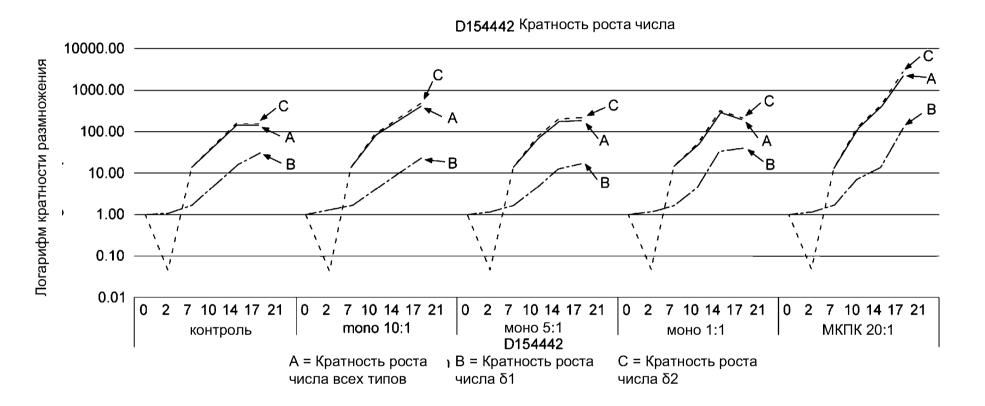
День 3 — Размножение

День 7 — ПОВТОРНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ Аутологичные αβ-обедненные РВМС Активация с помощью 100 мкМ ZOL в течение 4 часов Совместное культивирование 5:1 и 10:1 (РВМС:γδ Т-клетка)

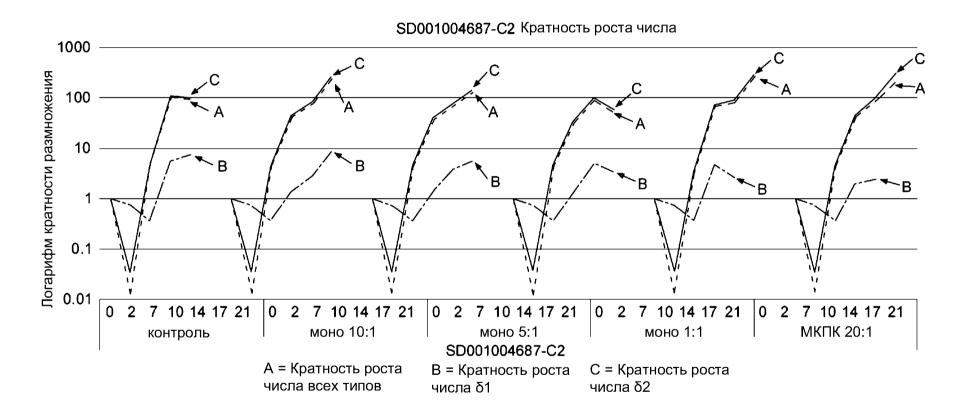
ФИГ. 4А



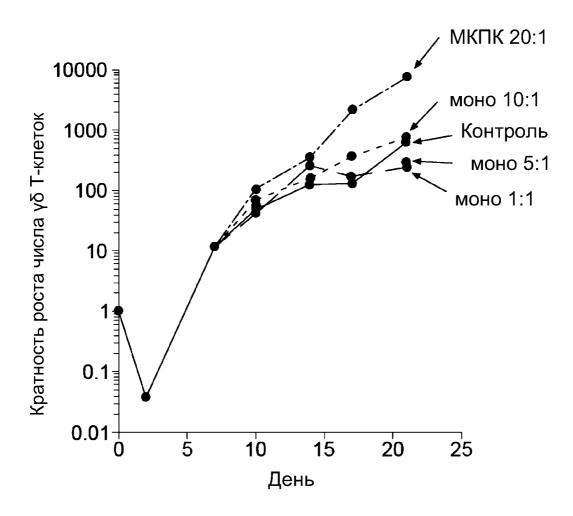




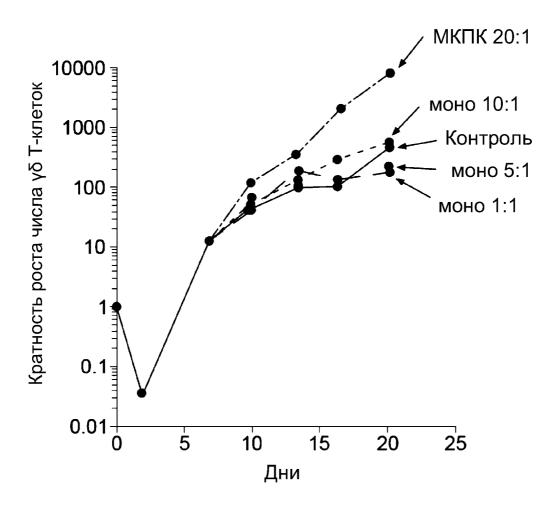
ФИГ. 6А



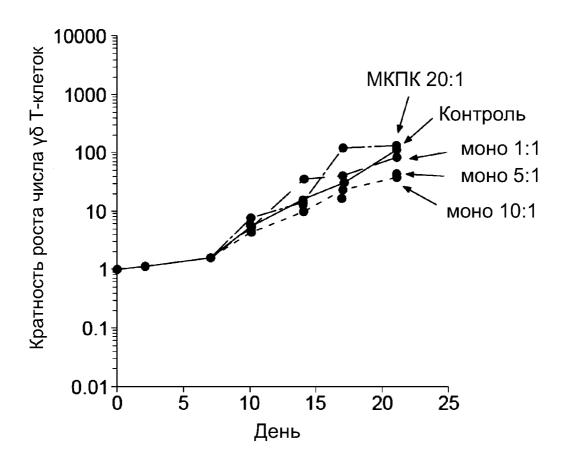
ФИГ. 6В



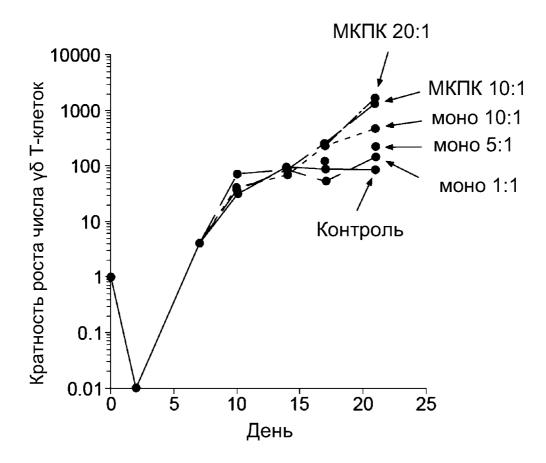
ФИГ. 7А

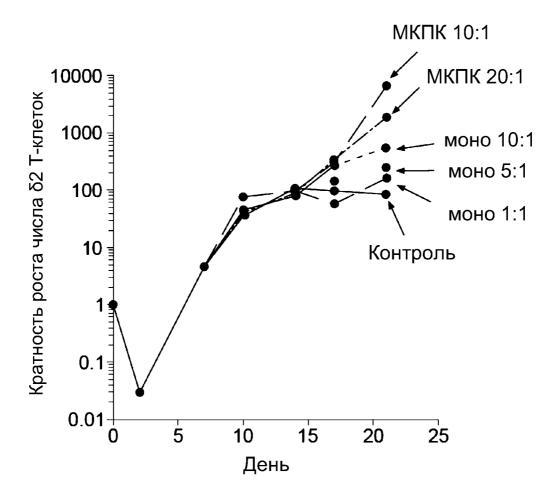


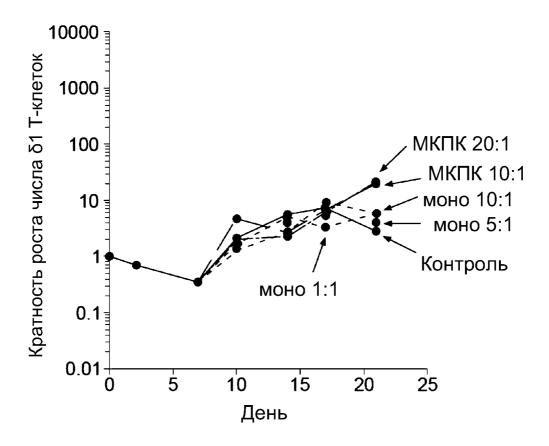
ФИГ. 7В

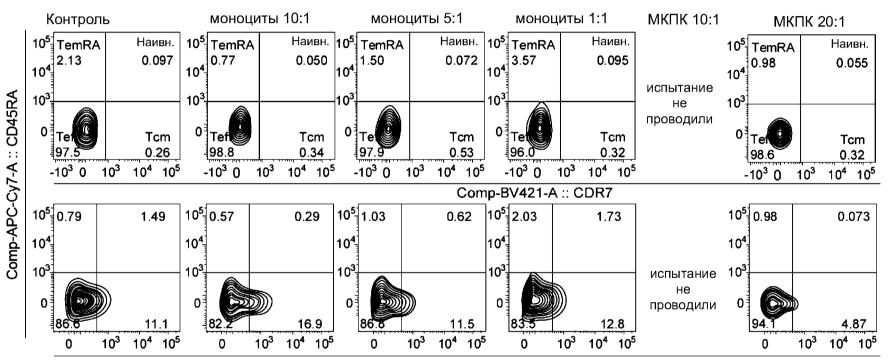


ФИГ. 7С



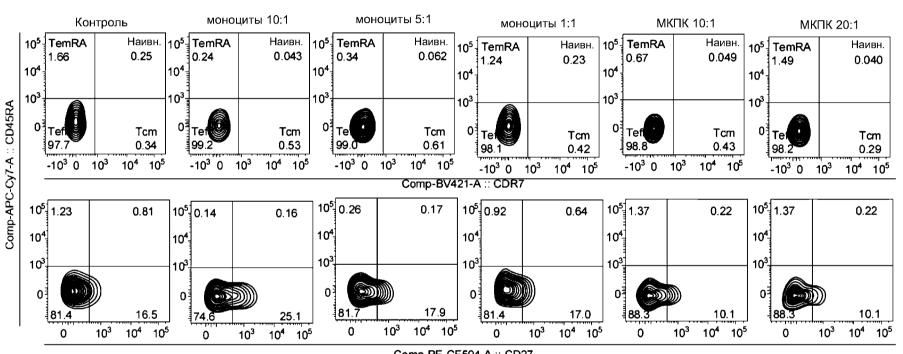






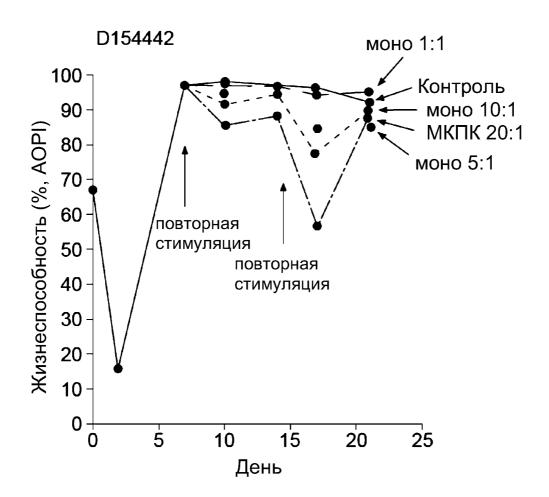
Comp-PE-CF594-A:: CD27

ФИГ. 9

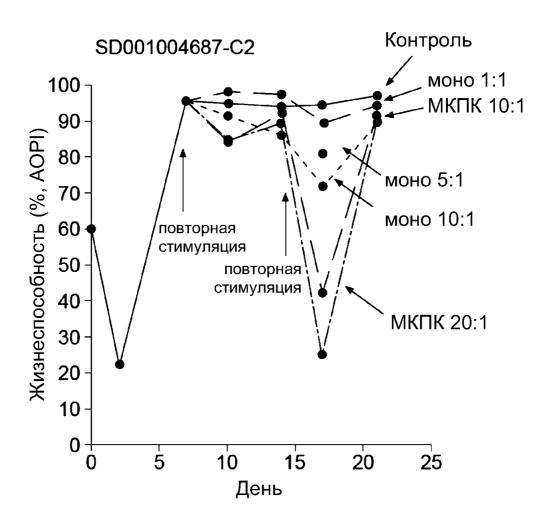


Comp-PE-CF594-A:: CD27

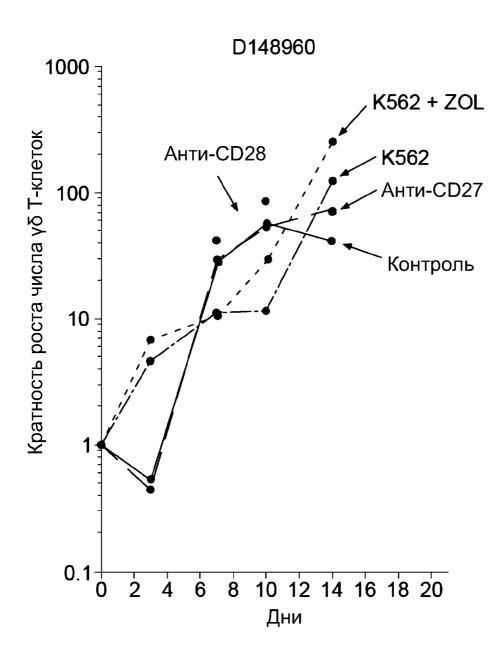
ФИГ. 10



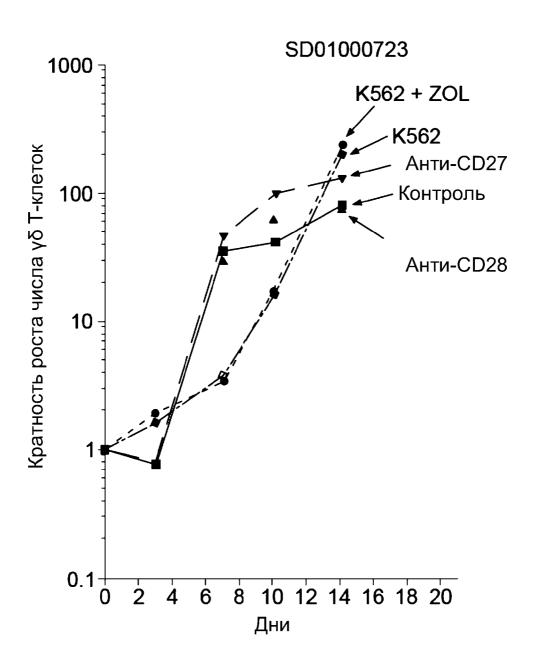
ФИГ. 11А



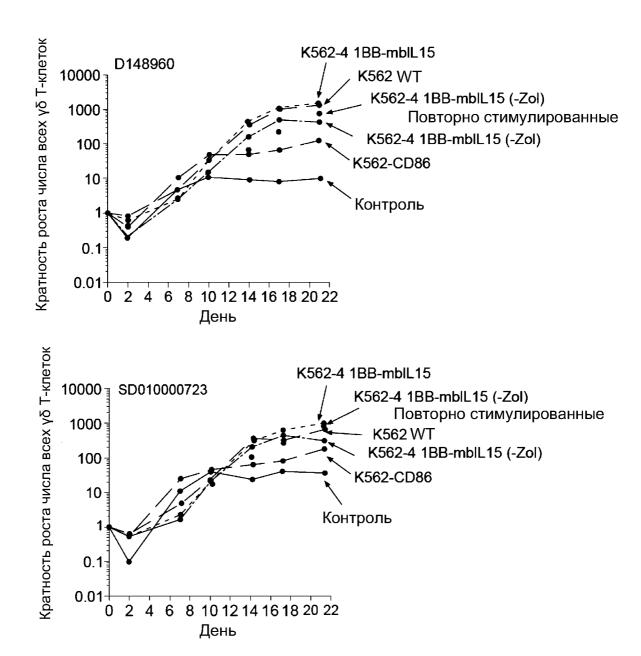
ФИГ. 11В



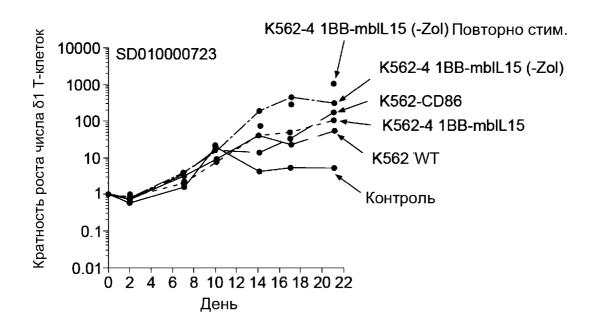
ФИГ. 12 А

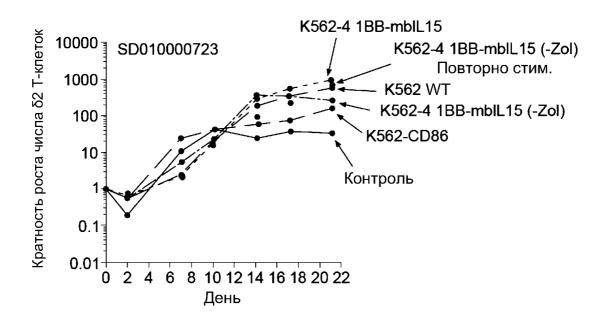


ФИГ. 12В

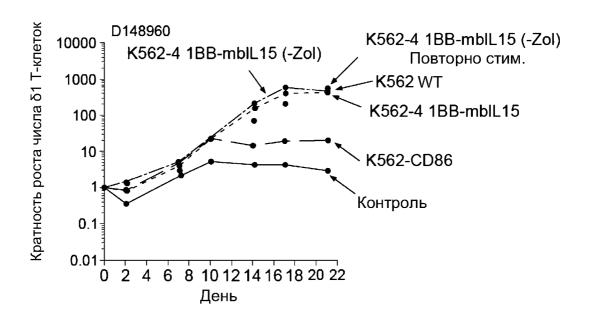


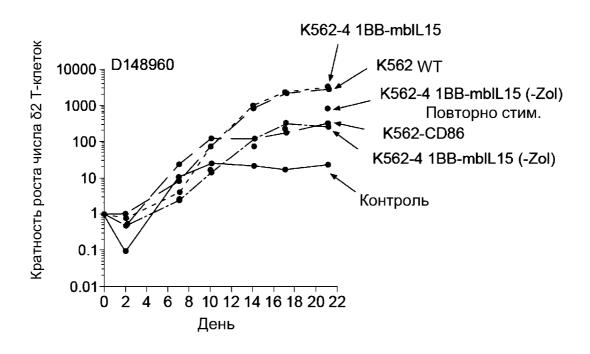
ФИГ. 13А



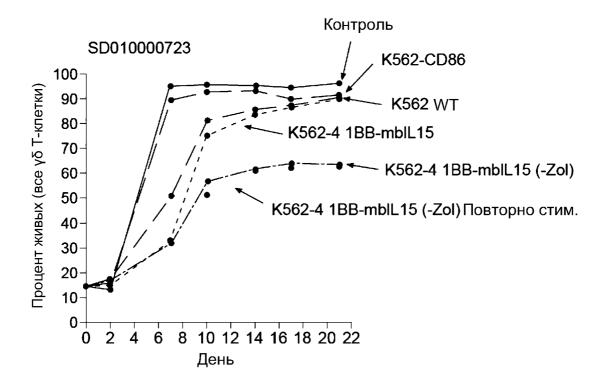


ФИГ. 13В

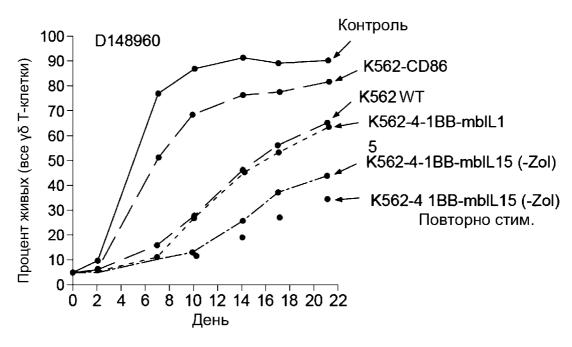




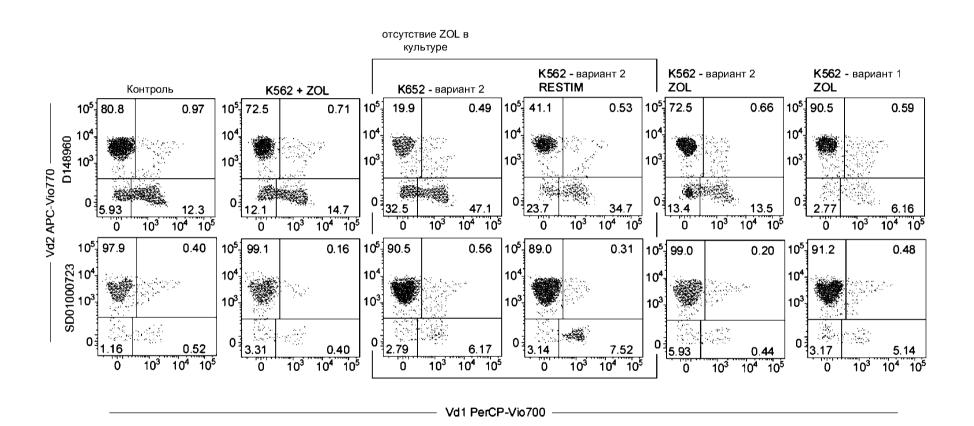
ФИГ. 13С



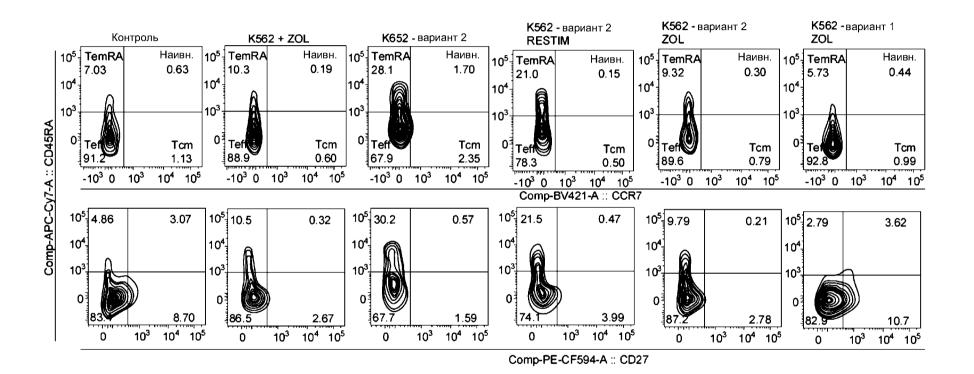
ФИГ. 14А



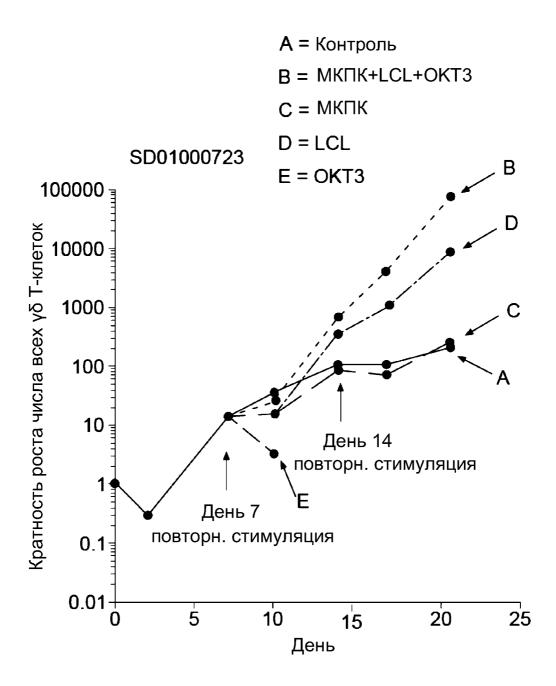
ФИГ. 14В



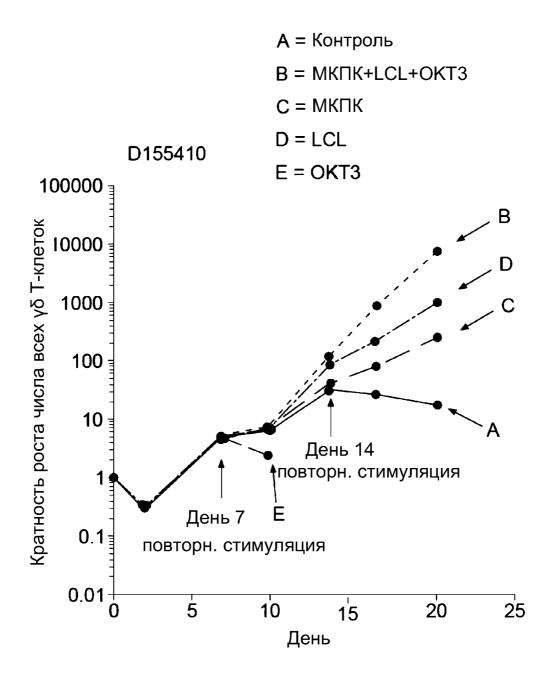
ФИГ. 15



ФИГ. 16

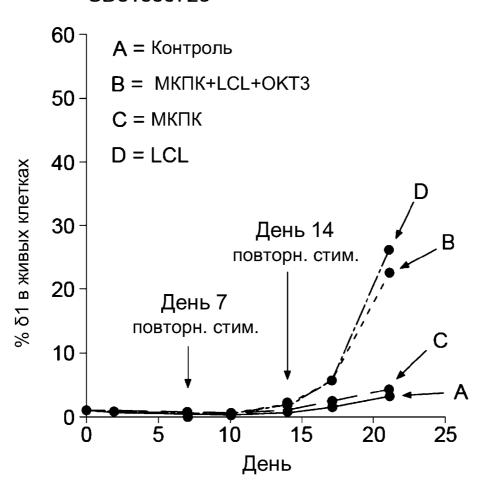


ФИГ. 17А

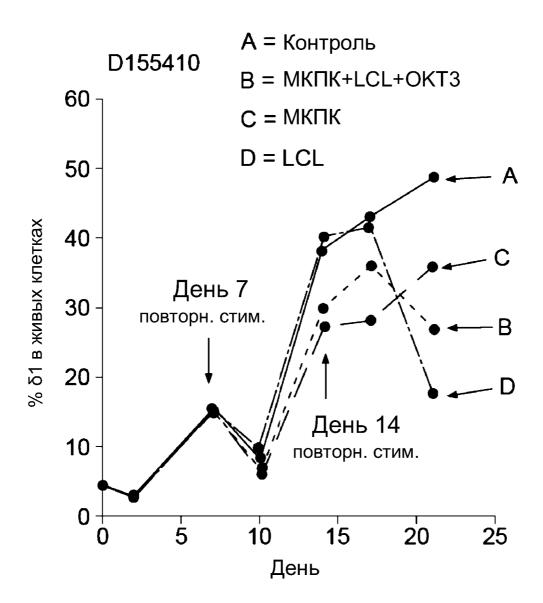


ФИГ. 17В

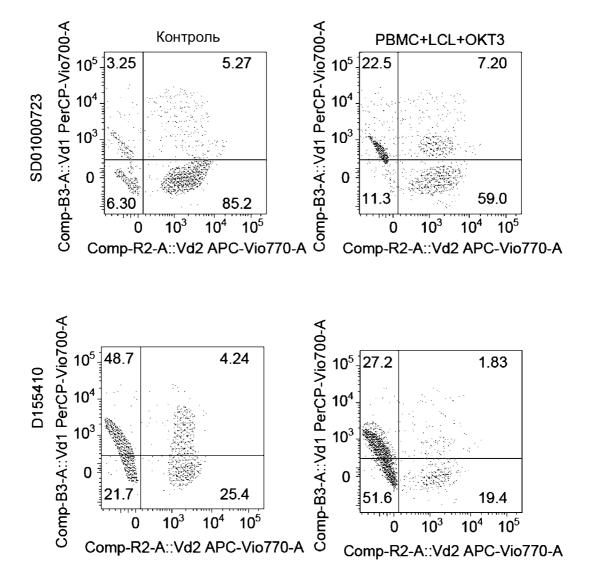
SD01000723

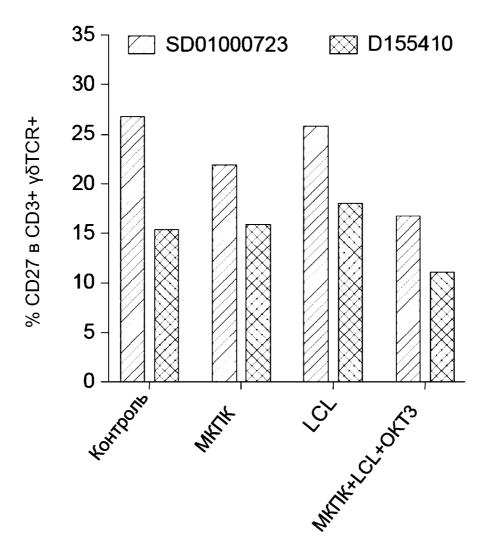


ФИГ. 18А

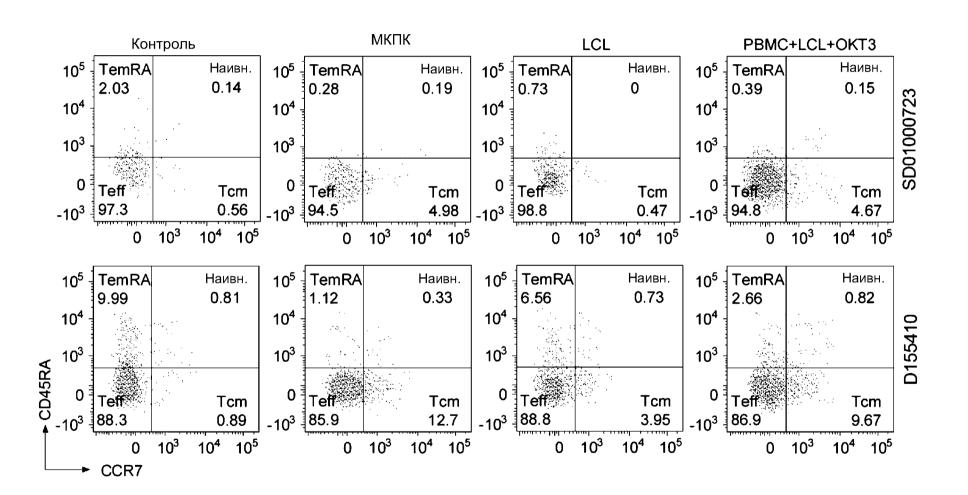


ФИГ. 18В

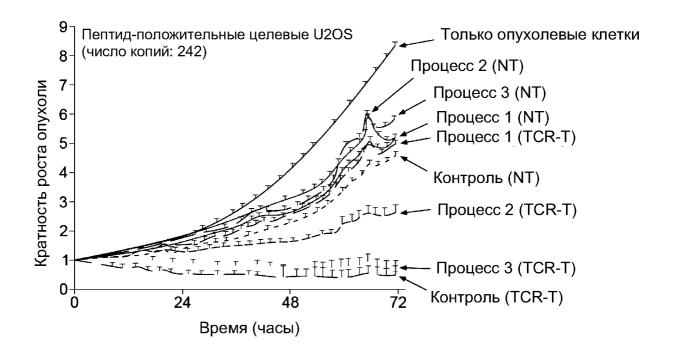




ФИГ. 19А

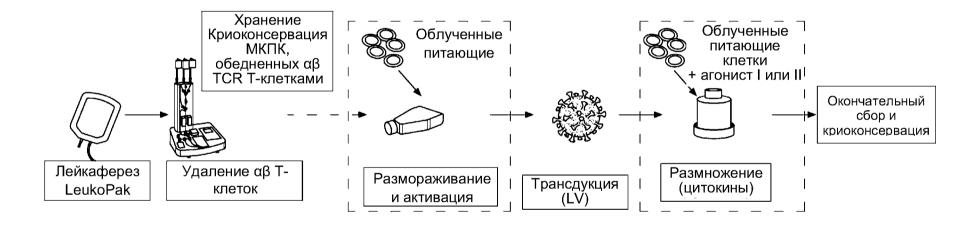


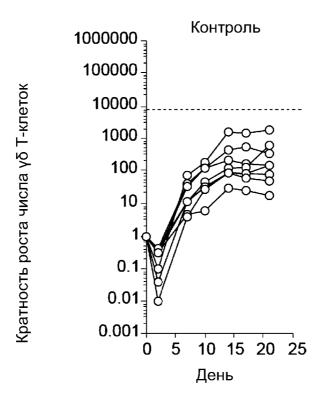
ФИГ. 19В



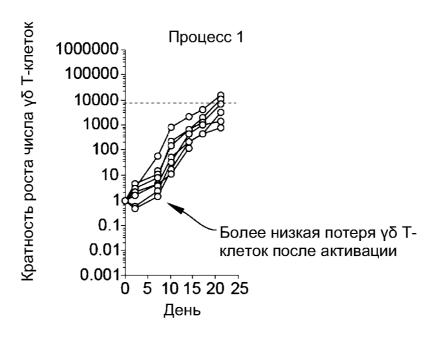
ФИГ. 20А







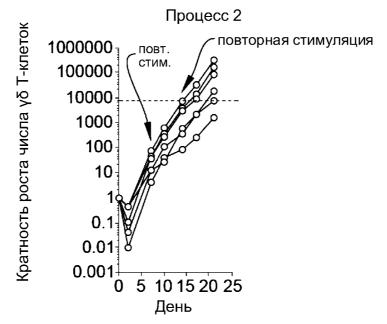
ФИГ. 22А



K562, экспрессирующие 41BBL и mblL15

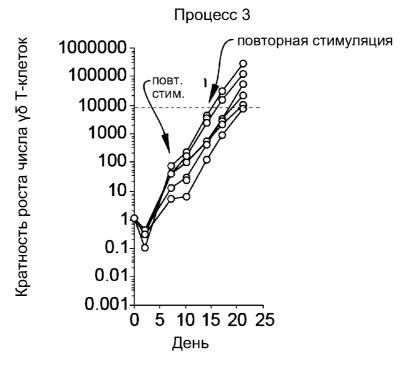
ФИГ. 22В

37/86



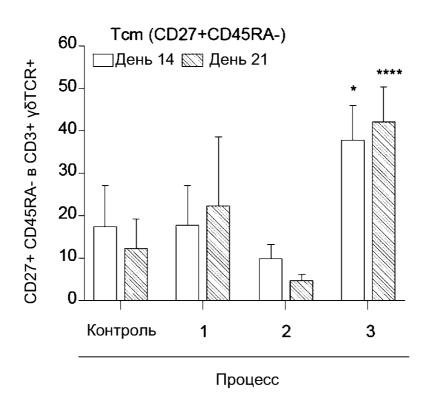
Аллогенные PBMC активируют с помощью ZOL

ФИГ. 22С

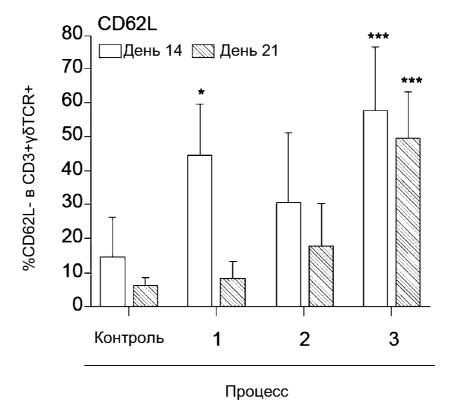


Объединенные облученные аллогенные PBMC (3 донора) + LCL + OKT3

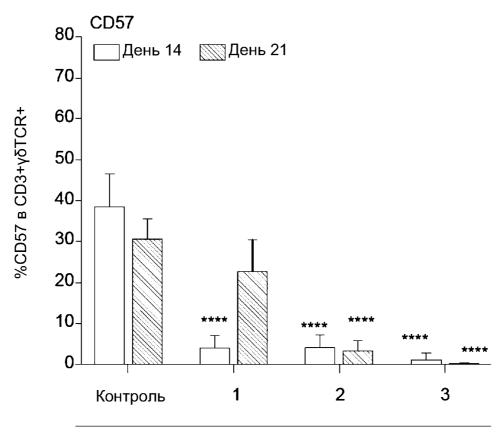
ФИГ. 22D



ФИГ. 23А



ФИГ. 23В



Процесс

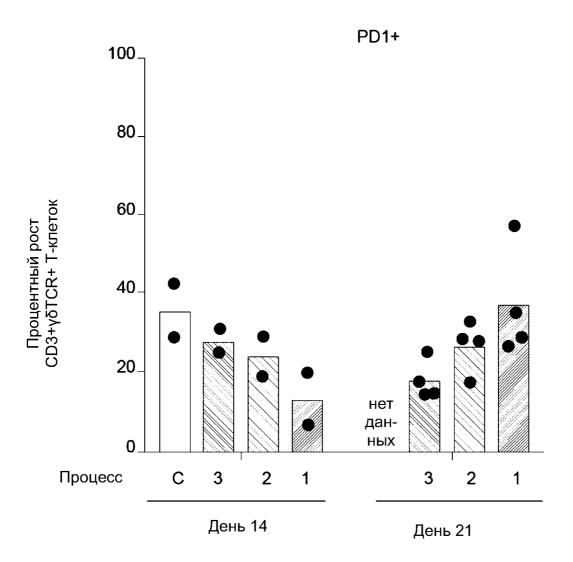
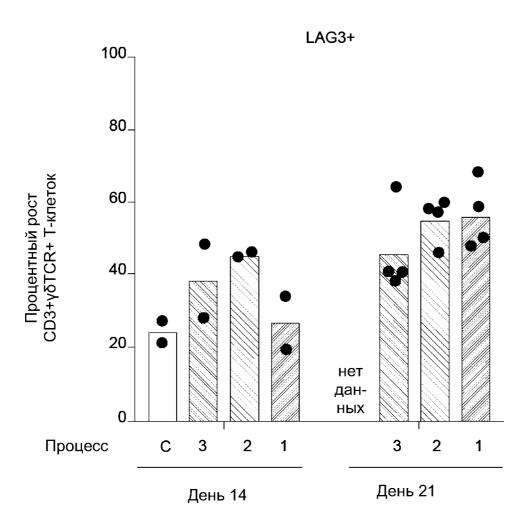
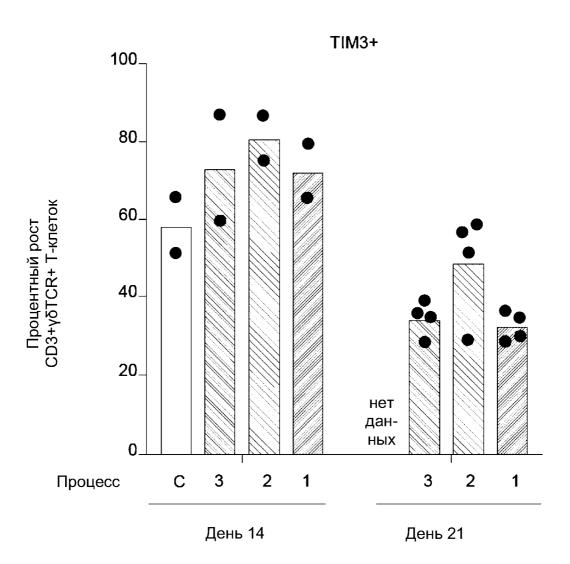


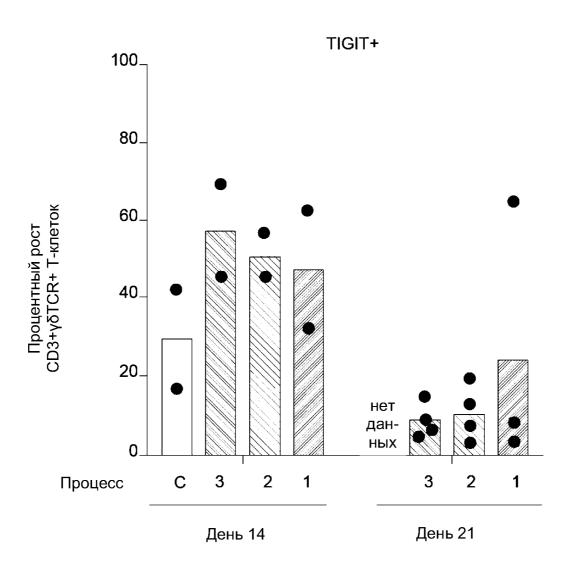
Рис. 24А



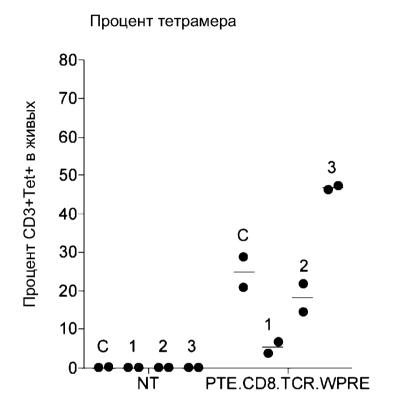
ФИГ. 24В

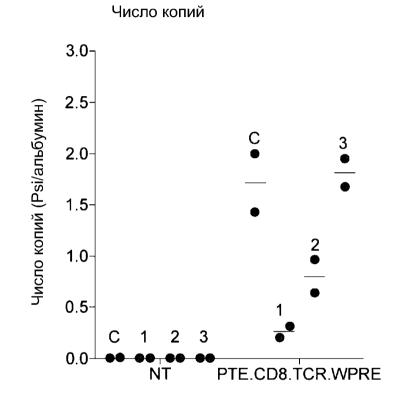


ФИГ. 24С



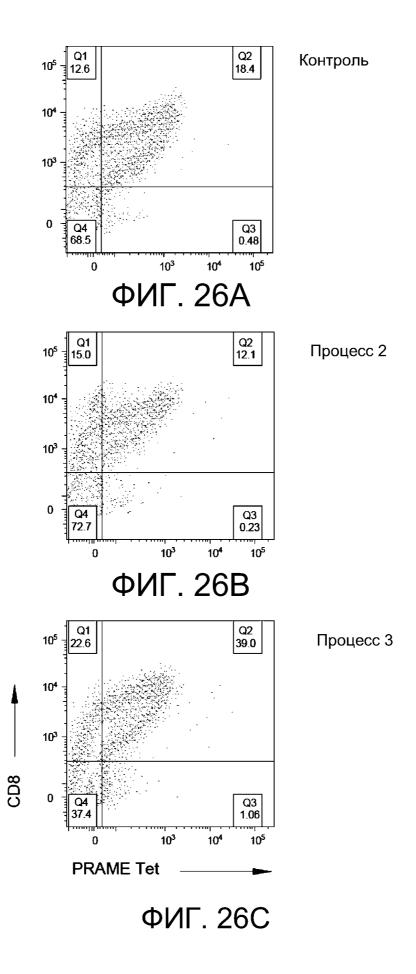
ФИГ. 24D

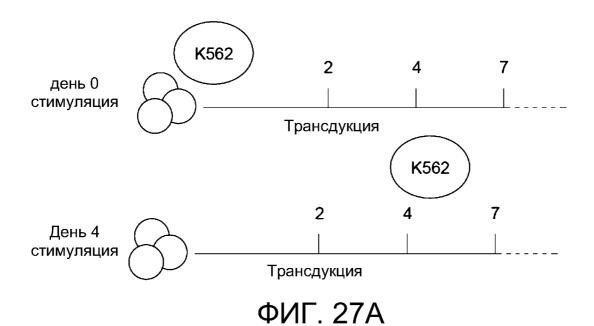


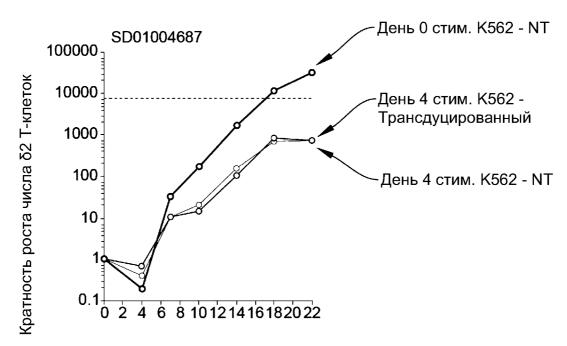


ФИГ. 25А

ФИГ. 25В



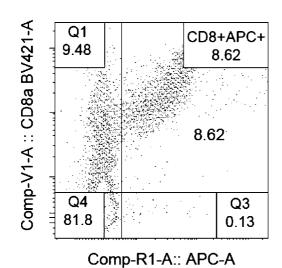




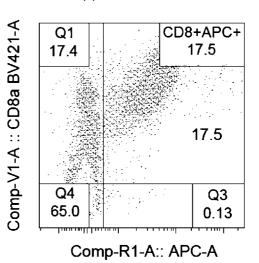
ФИГ. 27В

47/86

День 0 - 60 мкл



День 0 - 120 мкл



ФИГ. 28А.

ФИГ. 28В

День 0 - 240 мкл

| /421-A | |
|-----------|---|
| 窗 | |
| CD8a | |
| :: | |
| Comp-V1-A | • |

| | 31.1 |
|------------|-------------|
| Q4 42.7 | Q3 0.094 |

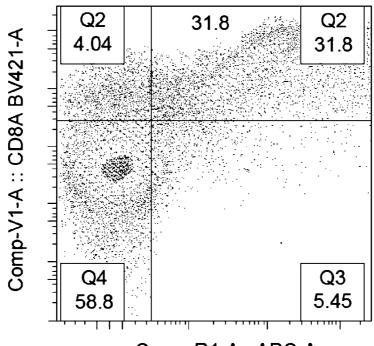
Comp-R1-A:: APC-A

ФИГ. 28С

| Образец | Число копий | |
|---------|-------------|--|
| NT | 0,00 | |
| 60 мкл | 1,71 | |
| 120 мкл | 2,61 | |
| 240 мкл | 7,53 | |

ФИГ. 28D

День 4-60 мкл

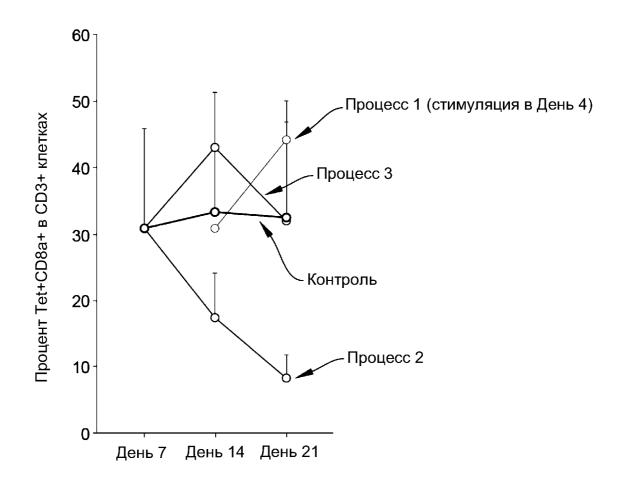


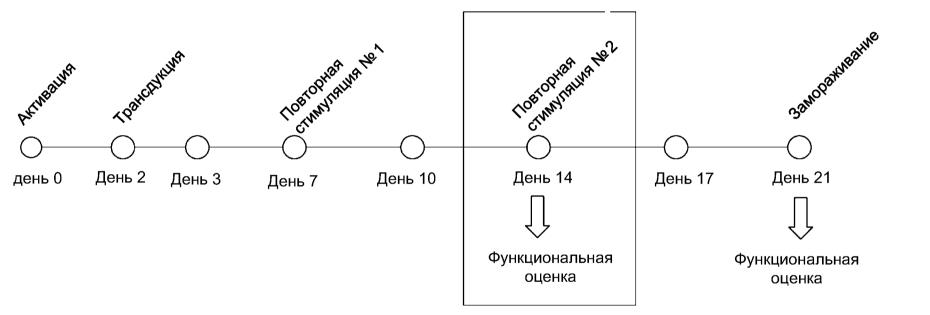
Comp-R1-A:: APC-A

ФИГ. 28Е

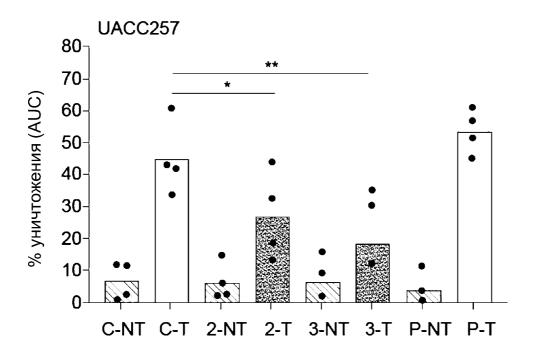
| Образец | Число копий | |
|-------------------|-------------|--|
| NT | 0,00 | |
| Трансдуцированный | 1,71 | |

ФИГ. 28F

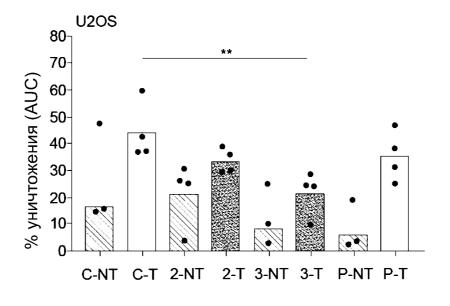




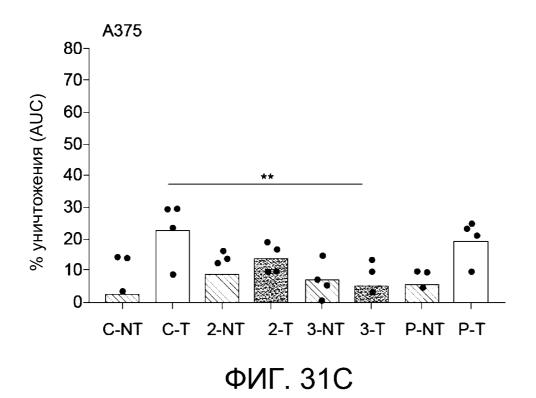
ФИГ. 30

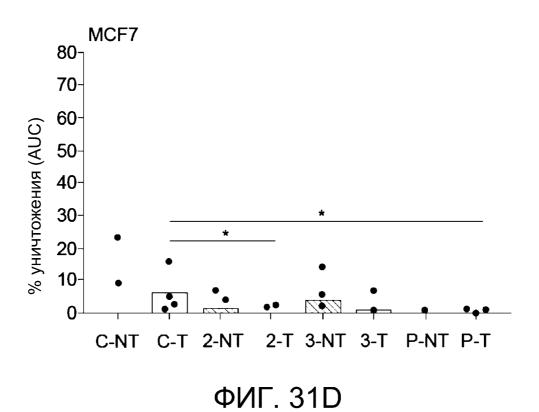


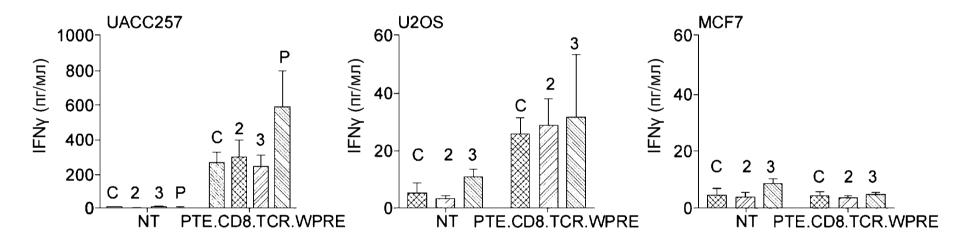
ФИГ. 31А



ФИГ. 31В





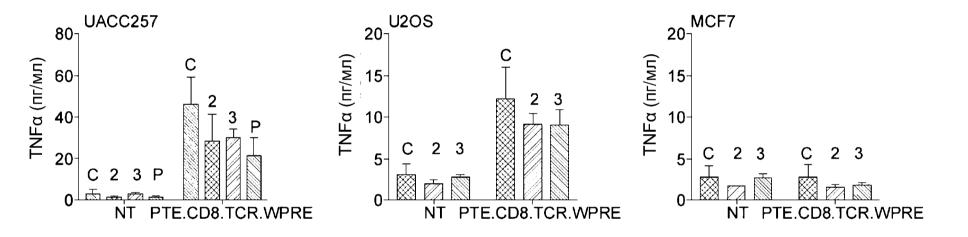


ФИГ. 32А

ФИГ. 32В

ФИГ. 32С

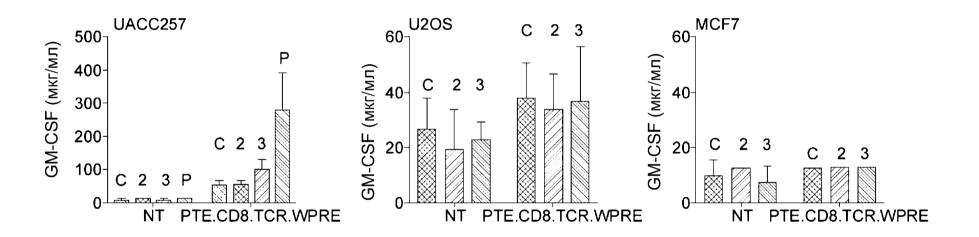




ФИГ. 33А

ФИГ. 33В

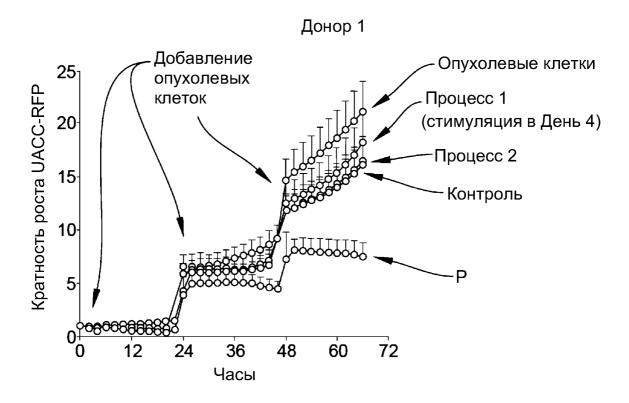
ФИГ. 33С



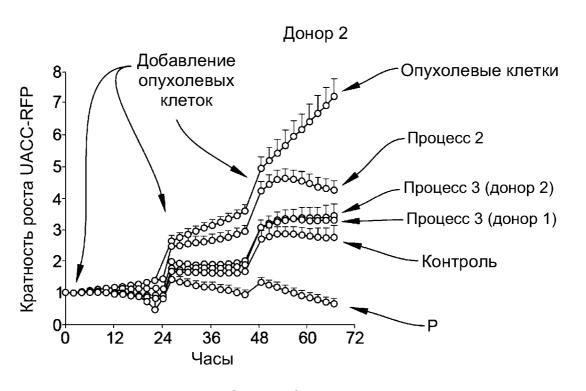
ФИГ. 34А

ФИГ. 34В

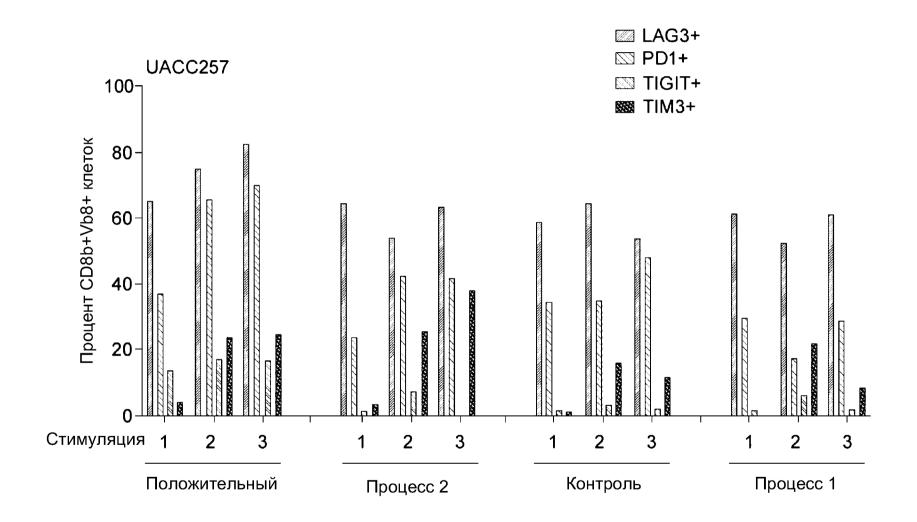
ФИГ. 34С



ФИГ. 35А



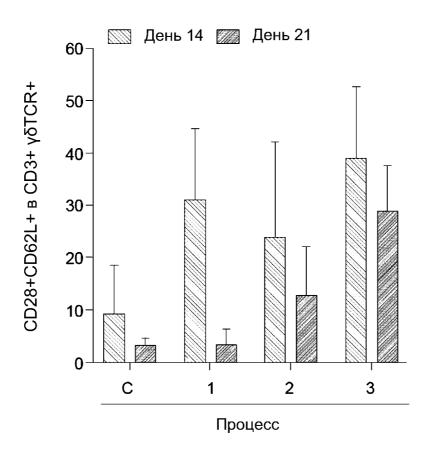
Фиг. 35В



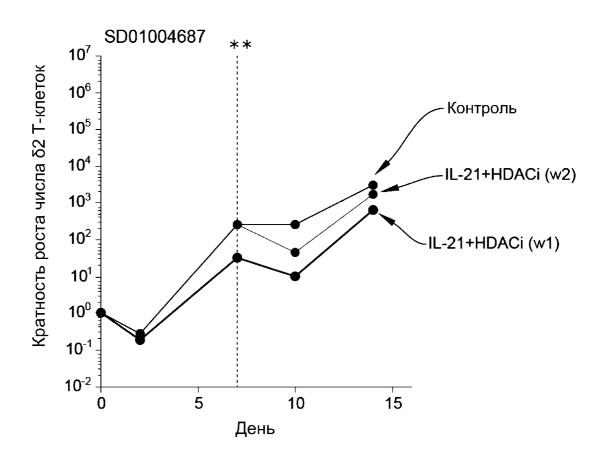
ФИГ. 36

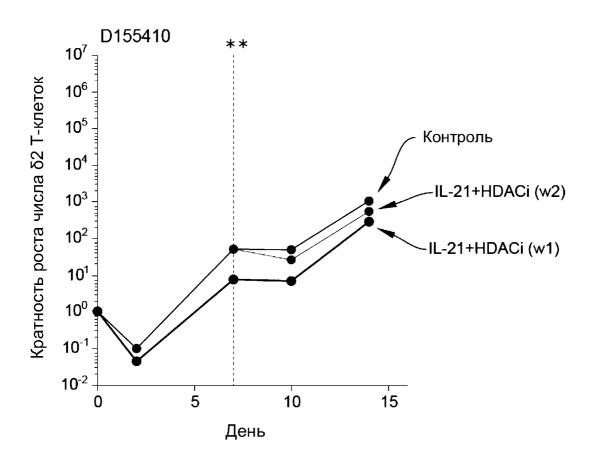
* повторная стимуляция

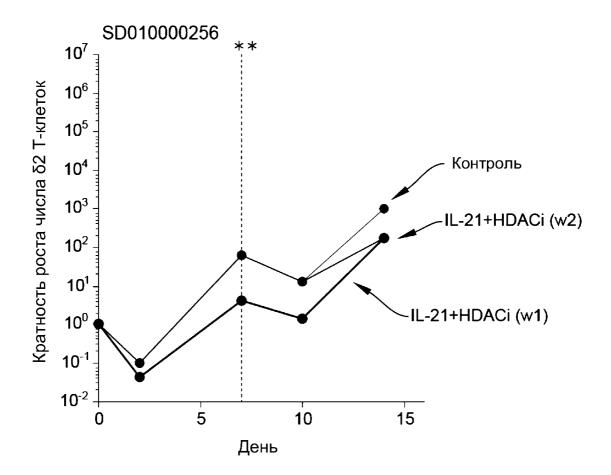
| | День | День 0 – День 6 | День 7* | День 8 – День 14 |
|-----------|--|----------------------------------|--|---------------------------------|
| Условия 1 | Контроль | ИЛ-2 + ИЛ-15 | Без цитокина | ИЛ-2 |
| Условия 2 | ИЛ-2 + ИЛ-15 | ИЛ-2 + ИЛ-15 | Без цитокина | ИЛ-2 + ИЛ-15 |
| Условия 3 | Примирование с помощью ИЛ-12 + ИЛ-18 | ИЛ-12 + ИЛ-15 | Примирование с помощью ИЛ-12 + ИЛ-18 | ИЛ-2 + ИЛ-15 |
| Условия 4 | ИЛ-21 + HDACi (Условия 1) | ИЛ-2 + ИЛ-15 | Без цитокина | ИЛ-21 + HDACI + ИЛ-2 + ИЛ-15 |
| Условия 5 | ИЛ-21 + HDACi (Условия 2) | ИЛ-21 + HDACI + ИЛ- 2 + ИЛ-15 | Без цитокина | ИЛ-2 + ИЛ-15 |

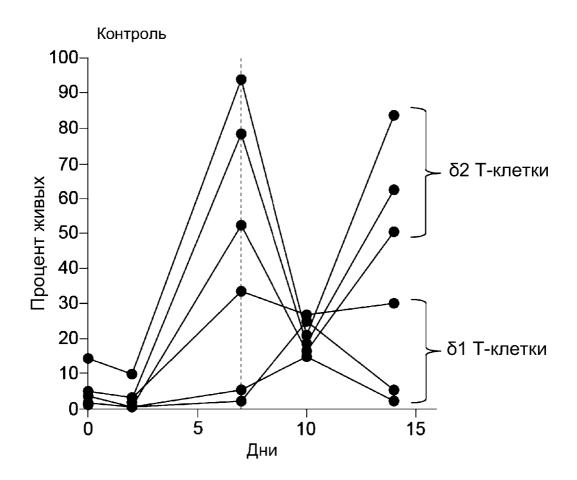


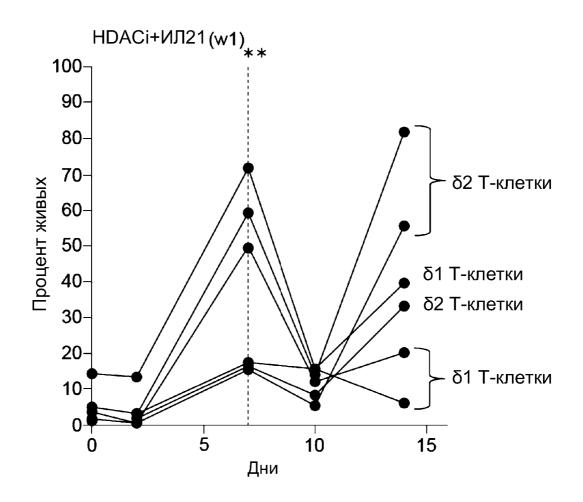
ФИГ. 38



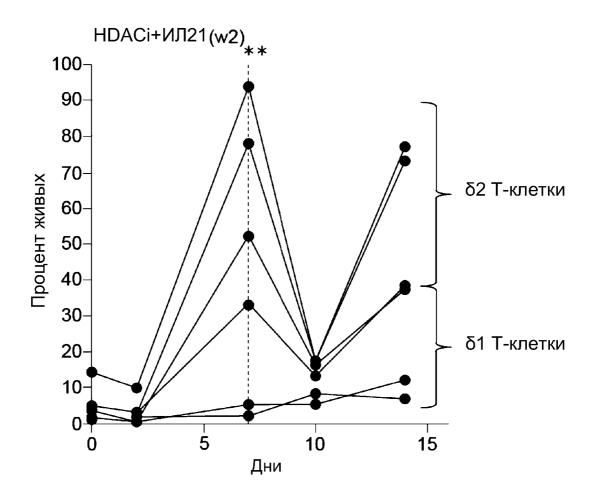


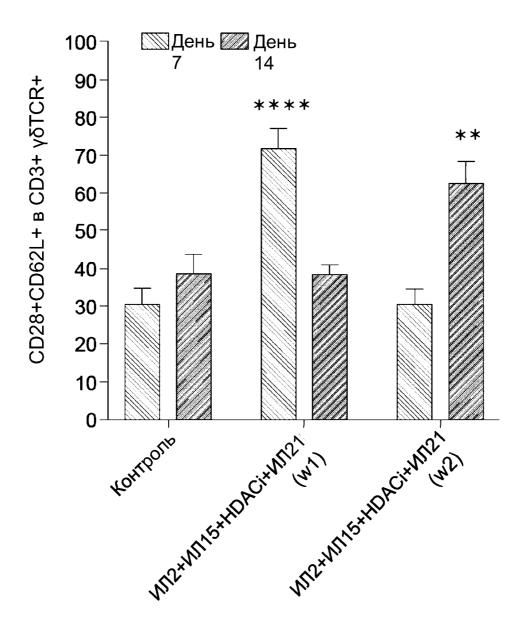




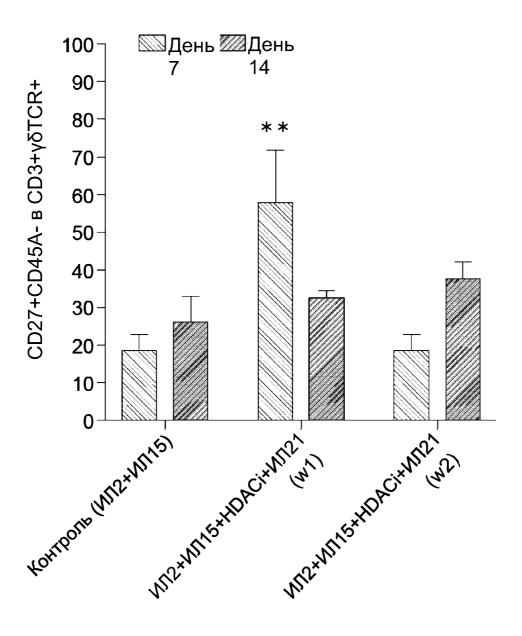


ФИГ. 40В

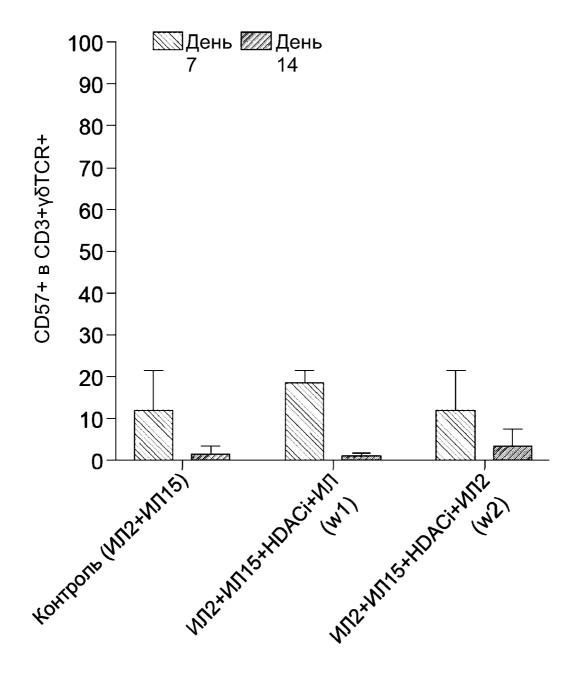




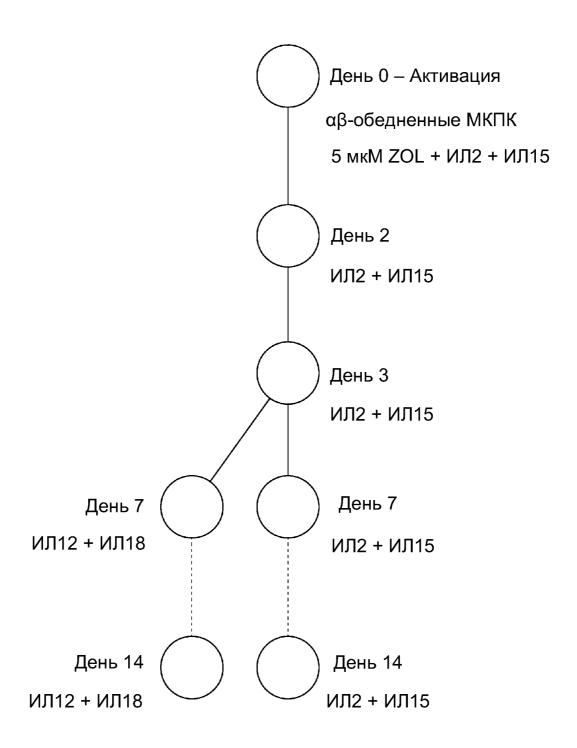
ФИГ. 41А



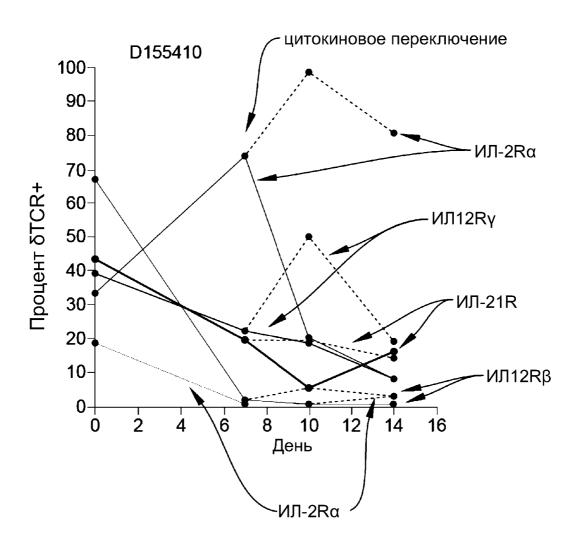
ФИГ. 41В



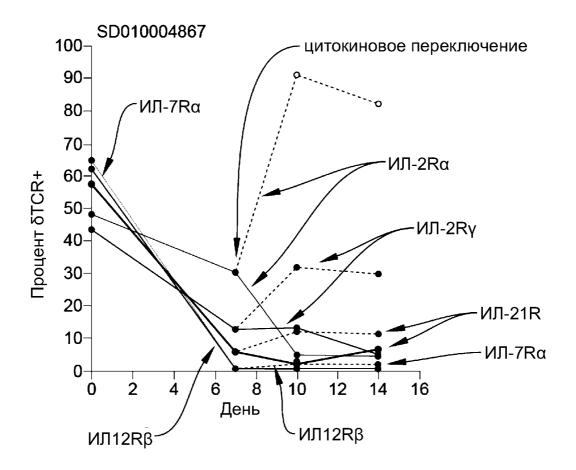
ФИГ. 41С



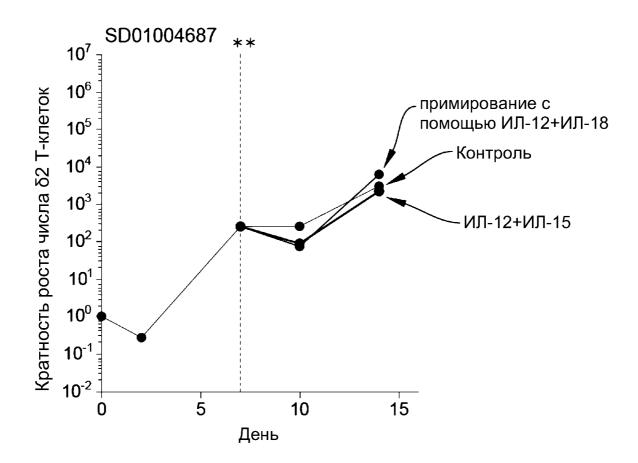
ФИГ. 42

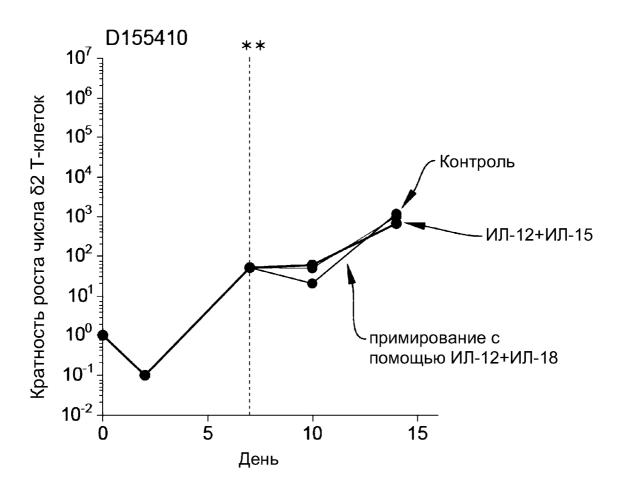


ФИГ. 43А

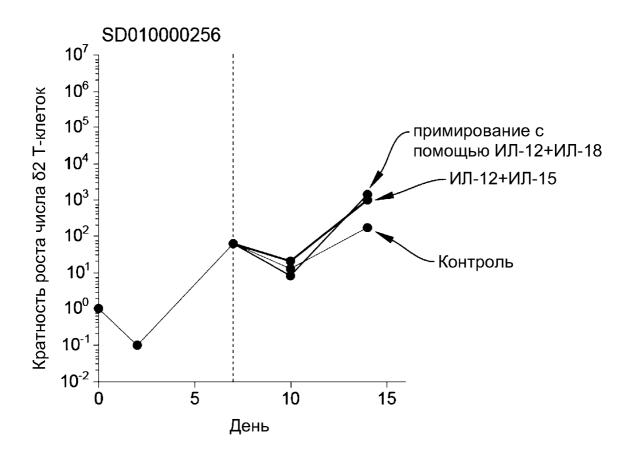


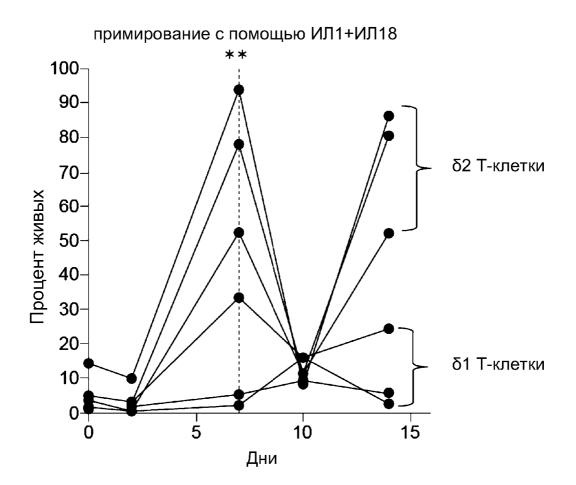
Фиг. 43В

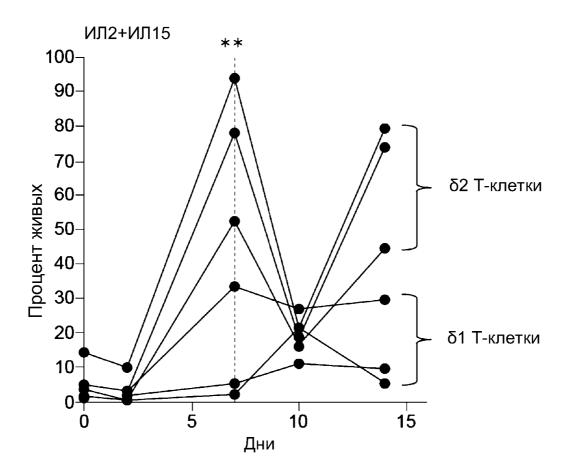




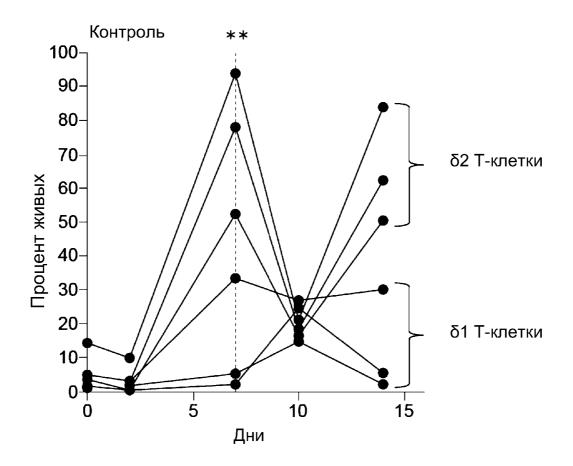
ФИГ. 44В



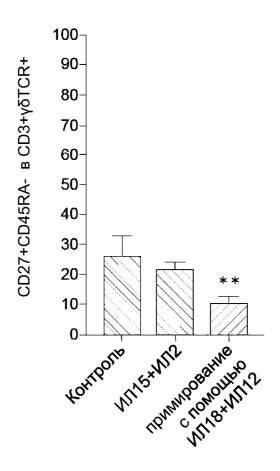


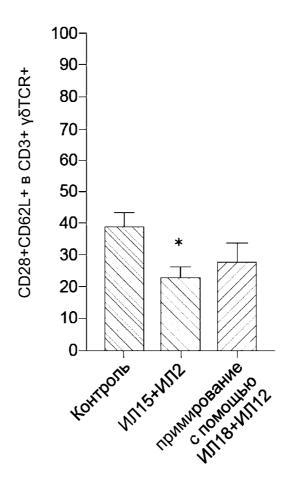


ФИГ. 45В

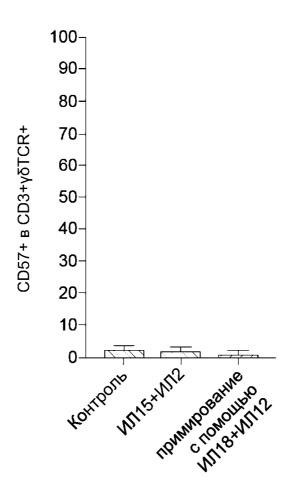


ФИГ. 45С

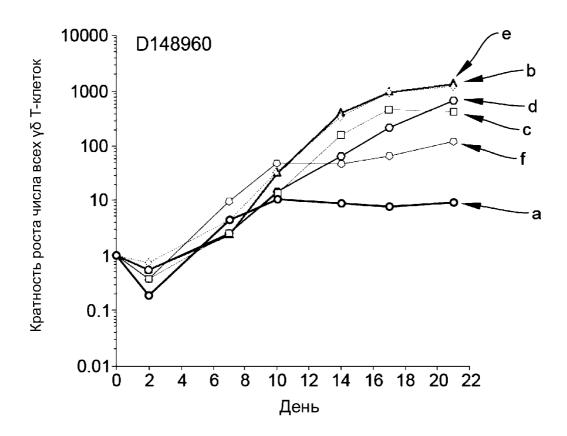




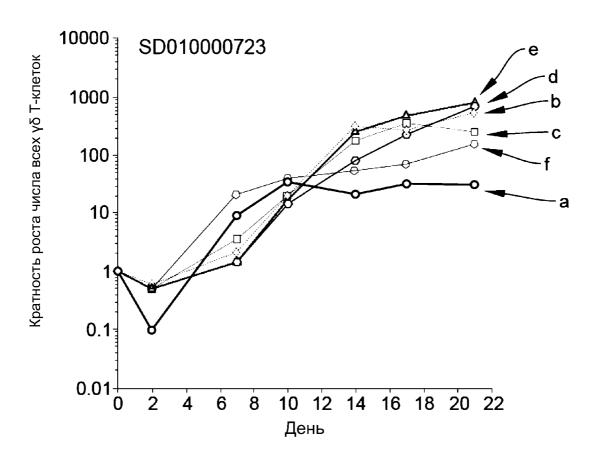
ФИГ. 46В



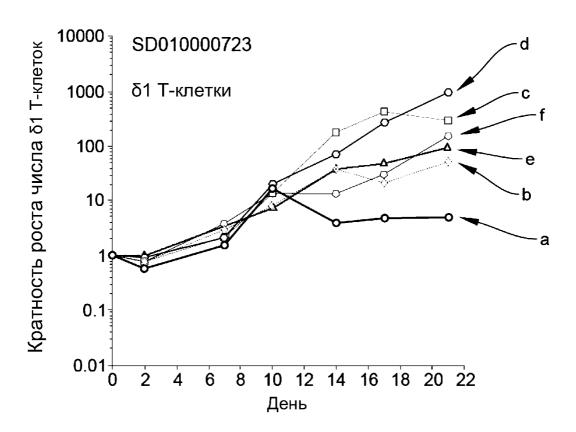
ФИГ. 46С



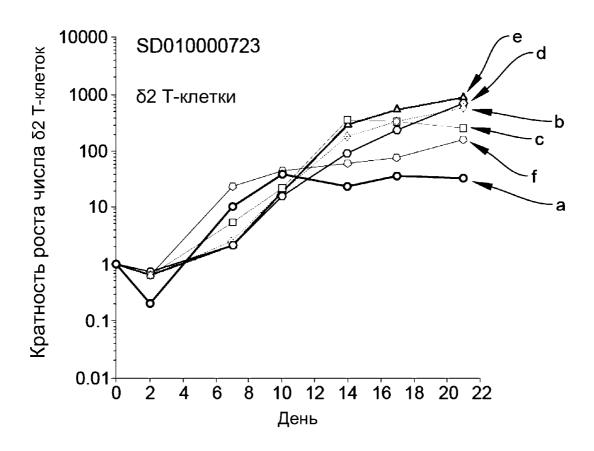
ФИГ. 47А



ФИГ. 47В



ФИГ. 48А



ФИГ. 48В

