

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390769 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.09.22

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

(22) Дата подачи заявки
2021.09.04

(54) ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ

(31) 2013962.2

(72) Изобретатель:

(32) 2020.09.04

Рикалдин Тимоти, Саймос Андре,
Нуссбаумер Оливер, Ковач Иштван,
Пател Михил (GB)

(33) GB

(86) PCT/IB2021/058083

(87) WO 2022/049550 2022.03.10

(71) Заявитель:

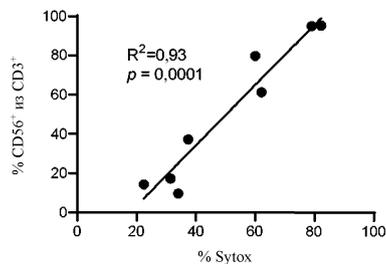
(74) Представитель:

ГАММАДЕЛЬТА ТЕРАПЬЮТИКС
ЛТД (GB)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим клетки естественные киллеры (NK) и $\gamma\delta$ T-клетки, в частности для применения в адоптивной иммунотерапии. Настоящее изобретение также относится к способу приготовления таких композиций, который включает приведение образца в контакт с антителом против варибельной дельта-цепи 1 TCR (анти-V δ 1).

с



A1

202390769

202390769

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577561EA/042

ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим клетки естественные киллеры (NK) и $\gamma\delta$ T-клетки, в частности, для применения в адоптивной иммунотерапии. Настоящее изобретение также относится к способу приготовления таких композиций, который включает приведение образца в контакт с антителом против варибельной дельта-цепи 1 TCR (анти-V δ 1).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Недавний успех неклочной (например, ингибиторы иммунных контрольных точек) и клеточной иммунотерапии (например, CD19, нацеленный на $\alpha\beta$ CAR-T-клетки) побудил к разработке новых подходов к иммунотерапии с применением немодифицированных и генно-инженерных Treg, iNK-T, $\gamma\delta$ T-клеток, NK-клеток и макрофагов. Изготовление таких передовых терапевтических лекарственных средств (АТМР) требует сложного процесса с применением комбинации различных цитокинов, культуральной среды, стимулирующих гранул и фидерных клеток. Широкое применение этих методов лечения в настоящее время является громоздким и дорогим из-за сложного производственного процесса и сопутствующих логистических проблем.

Например, подавляющее большинство методов лечения на основе CAR-модифицированных $\alpha\beta$ T-клеток ограничиваются аутологичным применением, и успех производственных циклов в значительной степени предопределяется качеством донорского материала. Существует несколько недостатков, связанных с этими методами лечения. Во-первых, $\alpha\beta$ T-клетки ограничены по МНС, что приводит к развитию фатальной болезни «трансплантат против хозяина» при аллогенном применении. Во-вторых, большинство методов лечения на основе CAR-T клеток были ассоциированы с нежелательными побочными эффектами, такими как синдром высвобождения цитокинов, нейротоксичность, внутриопухолевая токсичность. В-третьих, слабая миграция $\alpha\beta$ T-клеток в очаги солидных опухолей препятствует терапевтической эффективности таргетных подходов терапии при солидных опухолях.

Для того чтобы облегчить аллогенное применение этой революционной технологии, научная область реализует две основные стратегии: (1) сделать T-клетки неограниченными по МНС с помощью сложных способов редактирования генов (например, путем нокаута нативных $\alpha\beta$ TCR) или (2) использовать типы клеток, изначально не имеющие ограничений по МНС (например, NK-клетки и $\gamma\delta$ T-клетки), в качестве средств доставки для создания действительно аллогенного клеточного продукта. Оба подхода сопряжены со своими проблемами: редактирование генов усложняет производственный процесс и этапы контроля качества, в то время как культивирование неограниченных типов клеток требует четко определенной цитокиновой среды и/или систем фидерных клеток. Несмотря на то, что существуют установленные способы

выращивания NK-клеток либо из источников крови, либо из клеточных линий, большинство из этих способов включают использование аллогенных фидерных клеток, которые затем необходимо облучать и извлекать. В большинстве способов применяются даже облученные линии опухолевых клеток (K562), которые используют генетически введенные мембраносвязанные цитокины и ко-стимулирующие молекулы в качестве фидерных слоев в ходе изготовления. В некоторых случаях (например, при терапии NK-клетками) широкое применение указанного лечения затруднено проблемами криоконсервации и последующим снижением цитотоксического потенциала клеточного продукта.

Ранее были описаны способы размножения $\gamma\delta$ T-клеток с добавлением экзогенных цитокинов, например, см. WO 2017/072367 и WO 2018/212808. Также были описаны способы размножения собственных $\gamma\delta$ T-клеток пациентов с использованием фармакологически модифицированных форм гидроксиметилбут-2-енилпирофосфата (НМВРР) или клинически одобренных аминокислотных бисфосфонатов. С помощью этих подходов было пролечено более 250 пациентов с раком, казалось бы, безопасно, но полная ремиссия наблюдалась лишь в редких случаях. По-прежнему существует потребность в способах, с помощью которых можно размножить большое количество $\gamma\delta$ T-клеток.

NK-клетки и $\gamma\delta$ T-клетки являются особенно привлекательными иммунотерапевтическими агентами, поскольку они не ограничены по МНС, и их активация не зависит от распознавания антигена, связанного с МНС. Несмотря на то, что они имеют некоторые общие черты (например, способность различать здоровые и злокачественные клетки, наличие естественных цитотоксических рецепторов и т. д.), они также эволюционно консервативны, и каждый тип клеток обладает уникальными иммунологическими свойствами. Это включает, помимо прочего, уникальным механизмом действия каждого типа клеток, таким как концепция отсутствия распознавания себя и лиганда NCR через NK-клетки, а также их способность взаимодействовать с антителами для реализации опосредованной антителами клеточной цитотоксичности (ADCC). В дополнение к NCR, V δ 1 клетки также используют МНС-неограниченный TCR для распознавания антигенов, ассоциированных с опухолью, и для миграции в определенные участки ткани. V δ 2 T-клетки имеют уникальный инвариантный TCR, который позволяет им распознавать злокачественные клетки, воспринимая повышенную метаболическую активность мевалонатного пути, что является особенностью, которая связана со злокачественными клетками с мутировавшим онкогеном p53. Помимо широкого спектра распознавания мишеней и режимов цитотоксичности, врожденные лимфоциты также являются связующим звеном между воспалением и устойчивыми адаптивными реакциями. Например, $\gamma\delta$ T-клетки могут взаимодействовать с В-клетками и способствовать переключению класса иммуноглобулина (IG), что приводит к улучшению ответа антител на опухолевую антиген. Как NK, так и $\gamma\delta$ T-клетки привлекают и способствуют созреванию антигенпрезентирующих клеток, тем самым фактически связывая донорские клетки с

собственной иммунной системой пациента с потенциалом инициировать длительные иммунологические реакции. Воспалительная среда, создаваемая NK-клетками и $\gamma\delta$ T-клетками, дополнительно привлекает и активирует обычные $\alpha\beta$ T-клетки.

В то время как NK-клетки очень эффективны в борьбе с инфекционными заболеваниями (например, вызванными вирусами, бактериями или грибами), V δ 1 $\gamma\delta$ T-клетки являются основополагающими для распознавания и защиты от реактивации CMV (серьезная проблема у пациентов с ослабленным иммунитетом, например, у реципиентов трансплантатов и пациентов с формами рака, которые тяжело поддаются лечению). Кроме того, CMV-активированные V δ 1 $\gamma\delta$ T-клетки значительно снижают риск развития вторичных злокачественных опухолей у пациентов, получающих иммунодепрессанты, после трансплантации.

V δ 2 $\gamma\delta$ T-клетки играют важную роль в распознавании и устранении микобактериальных инфекций посредством распознавания HMBPP (очень высокоаффинного промежуточного продукта немевалонатного пути, используемого в основном прокариотами и некоторыми типами клеток эукариот). Клетки V δ 2 также распознают простейшие и вносят большой вклад в иммунный ответ против малярийных инфекций.

В идеальном варианте готовый аллогенный продукт клеточной терапии должен сочетать в себе все преимущества, присущие каждому из вышеперечисленных типов клеток: повышенная цитотоксичность в отношении злокачественных клеток, широкая защита от вирусных и бактериальных инфекций и т. д.; и в то же время указанный продукт смягчает ограничения каждого отдельного клеточного продукта, снижая риск дрейфа антигена, ускользания опухоли или подавления иммунитета. В настоящее время такая комбинированная терапия недоступна и потребует отдельных производственных циклов для каждого типа клеток с последующим смешиванием клеток в заранее определенном соотношении. Настоящее изобретение направлено на преодоление этой серьезной производственной проблемы.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с первым аспектом изобретения предлагается выделенная композиция, содержащая клетки естественные киллеры (NK) и $\gamma\delta$ T-клетки, при этом по меньшей мере 40% $\gamma\delta$ T-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой CD56^{bright}.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предлагается выделенная композиция, содержащая NK-клетки и $\gamma\delta$ T-клетки, при этом по меньшей мере 50% $\gamma\delta$ T-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой CD56.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предлагается выделенная композиция, содержащая клетки, при этом по меньшей мере 90% клеток состоят из NK-клеток и $\gamma\delta$ T-клеток, и при этом по меньшей мере 10% клеток представляют собой V δ 1 T-клетки, по меньшей мере 5% клеток представляют собой V δ 2 T-клетки, и по меньшей мере 30% клеток представляют собой NK-клетки.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предлагается способ размножения неограниченных по МНС не- $\gamma\delta$ + лимфоцитов, включающий стимуляцию смешанной клеточной популяции, содержащей $\gamma\delta$ Т-клетки и НК-клетки, с использованием антитела против варибельной дельта-цепи 1 TCR (анти-V δ 1) или его фрагмента, в присутствии интерлейкина-15 (IL-15) и в отсутствие интерлейкина-4 (IL-4) и культивирования смешанной клеточной популяции.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предлагается способ приготовления композиции, содержащей клеточную популяцию, обогащенную неограниченными по МНС лимфоцитами, при этом указанный способ включает:

(1) культивирование образца, полученного от субъекта, в присутствии:

(i) антитела анти-V δ 1 или его фрагмента; и

(ii) IL-15, в отсутствие IL-4,

с первого дня указанного культивирования; и

(2) выделение клеточной популяции, культивированной из образца.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предлагается композиция, которую можно получить способом, определенным в данном документе.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предлагается композиция, получаемая способом, определенным в данном документе.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предлагается композиция, как определено в данном документе, для применения в терапии.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предлагается композиция, как определено в данном документе, для применения в способе лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предлагается способ лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей НК-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки, при этом по меньшей мере 40% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, экспрессируют CD56.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предлагается способ лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей клетки, при этом по меньшей мере 90% клеток состоят из НК-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток, и при этом по меньшей мере 10% клеток представляют собой V δ 1 Т-клетки, по меньшей мере 5% клеток представляют собой V δ 2 Т-клетки, и по меньшей мере 30% клеток представляют собой НК-клетки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1: Схематическое изображение вариантов 1, 2 и 3 режимов культивирования клеток. При варианте 1 клетки высевают и культивируют с анти-V δ 1 антителом, IL-4, IL-1 β , IL-21 и IFN γ . Культуры в варианте 1 дополнительно регулярно подпитывают анти-V δ 1 антителом, IL-21 и IL-15 вплоть до сбора продуктов. В варианте 2

клетки высевают и культивируют с анти-V δ 1 антителом и IL-15. Культуры в варианте 2 дополнительно регулярно подпитывают анти-V δ 1 антителом и IL-15 вплоть до сбора продуктов. В варианте 3 клетки высевают и культивируют с анти-V δ 1 антителом, IL-15, IL-4, IL-1 β , IL-21 и IFN γ . Культуры в варианте 3 дополнительно регулярно подпитывают α -V δ 1 антителом, IL-21 и IL-15 вплоть до сбора продуктов. Варианты 1, 2 и 3 культивирования прекращают и клетки собирают между днями 11-14.

Фигура 2: График, демонстрирующий общий выход клеток, собранных при культивировании в вариантах 1, 2 или 3. Клетки высевали и культивировали в 24-луночных планшетах GREX. После сбора клетки концентрировали и подсчитывали с помощью NucleoCounter NC250. Варианты 1 и 2 обеспечивают эквивалентный выход клеток, а вариант 3 увеличивает выход клеток по сравнению с вариантом 1.

Фигура 3: График, демонстрирующий состав иммунных клеток, собранных при культивировании при различных режимах культивирования (варианты 1, 2 или 3). В частности, на этой фигуре приведен процент V δ 1+ $\gamma\delta$ Т-клеток, V δ 2+ $\gamma\delta$ Т-клеток и NK-клеток (CD3-CD56+) от общего числа лимфоцитов CD45+. Процент отдельных клеточных популяций оценивали с помощью проточной цитометрии. Варианты 1 и 3 генерировали клеточный продукт, сильно обогащенный V δ 1+ Т-клетками, тогда как вариант 2 генерировал клеточный продукт, содержащий смешанную популяцию V δ 1+, Т-V δ 2+ Т-клеток и NK-клеток.

Фигура 4: График, демонстрирующий экспрессию маркеров клеточной поверхности ключевых фенотипических маркеров в V δ 1+ $\gamma\delta$ Т-клетках, культивируемых при различных режимах культивирования (варианты 1, 2 или 3). Более конкретно, экспрессию NKp30, CD27 и NKG2D на клеточной поверхности изучали в V δ 1+ $\gamma\delta$ Т-клетках. Фенотипическую характеристику поверхности оценивали с помощью проточной цитометрии. V δ 1+ Т-клетки, полученные в вариантах 1 и 3, являются высокоположительными по CD27 и NKG2D и низкоположительными по NKp30. V δ 1+ Т-клетки, полученные в варианте 2, экспрессируют меньше CD27, но экспрессия NKp30 и NKG2D повышена.

Фигура 5: Иммунная клеточная композиция клеток, собранных при посеве и культивировании с различными антителами анти-V δ 1 или антителами анти-CD3 и IL-15. В частности, на этой фигуре приведен процент V δ 1+ $\gamma\delta$ Т-клеток, V δ 2+ $\gamma\delta$ Т-клеток и NK-клеток (CD3-CD56+) от общего числа лимфоцитов CD45+. Процент отдельных клеточных популяций оценивали с помощью проточной цитометрии. Использование двух отдельных клонов антител анти-V δ 1 обогащает NK-клетки, а также $\gamma\delta$ Т-клетки. Использование антитела анти-CD3 способствует обогащению только $\gamma\delta$ Т-клетками.

Фигура 6: Клеточная цитотоксичность. (А) демонстрирует процент уничтожения линии опухолевых клеток NALM-6 ALL при совместном культивировании с собранными клетками, культивируемыми при различных режимах культивирования (варианты 1, 2 или 3). Процент уничтожения клеток оценивали с помощью проточной цитометрии через 20-22 часа совместного культивирования. (В) демонстрирует процент

CD56-положительных лимфоцитов и CD56-положительных $\gamma\delta$ Т-клеток от общего числа CD45+ лимфоцитов. Процент отдельных клеточных популяций оценивали с помощью проточной цитометрии. Варианты 2 и 3 заметно усиливают цитотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам NALM-6. Усиленное уничтожение клеток коррелирует с экспрессией CD56 между вариантами.

Фигура 7: Профиль экспрессии CD56 в клетках V δ 1 и V δ 2 в PBMC до культивирования и после сбора продукта в вариантах 1 и 2. Поверхностную экспрессию CD56 определяли посредством анализа интенсивности окрашивания с помощью проточной цитометрии. Вариант 2 сильно увеличивал интенсивность экспрессии CD56 на клетках V δ 1 и V δ 2 по сравнению с их собственным уровнем PBMC.

Фигура 8: Экспрессия CD56 на $\gamma\delta$ Т-клетках и NK-клетках в PBMC до культивирования и после сбора продукта в варианте 2. Поверхностную экспрессию CD56 определяли с помощью проточной цитометрии. Вариант 2 сильно увеличивал процент CD56-bright клеток как на $\gamma\delta$ Т-клетках, так и на NK-клетках.

Фигура 9: Жизнеспособность и полное восстановление клеток после криоконсервации клеток, полученных при различных режимах культивирования (вариант 1 или 2). Общую жизнеспособность клеток оценивали как с помощью NucleoCounter NC250, так и методом проточной цитометрии. Процент общего восстановления клеток экстраполировали из общего количества клеток, подсчитанного после оттаивания и промывки криоконсервированных клеток, по отношению к количеству клеток, замороженных после прекращения культивирования и сбора продукта. Эквивалентная жизнеспособность и восстановление клеток наблюдались между вариантами 1 и 2 после криоконсервации.

Фигура 10: Клеточный фенотип после криоконсервации. (А) демонстрирует репрезентативные диаграммы композиции иммунных клеток клеточного продукта, полученного в соответствии с вариантом 2 режима культивирования до и после криоконсервации. (В) демонстрирует фенотипическую характеристику маркеров клеточной поверхности трех основных популяций (V δ 1+ $\gamma\delta$ Т-клетки, V δ 2+ $\gamma\delta$ Т-клетки и NK (CD3-CD56+) клетки), присутствующих на клеточном продукте, полученном в соответствии с вариантом 2 режима культивирования до и после криоконсервации. Более конкретно, экспрессию NKp30, CD27, NKG2D и CD56 на клеточной поверхности анализировали во всех присутствующих популяциях иммунных клеток и сравнивали с их экспрессией до и после криоконсервации. Вариант 2 демонстрирует эквивалентную композицию иммунных клеток и фенотип маркеров клеточной поверхности до и после криоконсервации.

Фигура 11: Цитотоксичность после криоконсервации. На графике показан процент лизиса опухолевой клеточной линии NALM-6 ALL при совместном культивировании с клеточными продуктами, полученными в вариантах 1 и 2 режимов культивирования после криоконсервации, при широком диапазоне соотношения эффектора и мишени. Процент уничтожения клеток оценивали с помощью проточной

цитометрии через 20-22 часа совместного культивирования. Вариант 2 демонстрирует повышенную цитотоксичность по отношению к клеткам NALM-6 после криоконсервации в диапазоне соотношений эффектора и мишени по сравнению с вариантом 1.

Фигура 12: Повышенная перmissивность к трансдукции. (А) график и (В) репрезентативные диаграммы трансдукции лентивирусными векторами всех иммунных клеток, составляющих продукты, полученные в вариантах 1 и 2. Трансдукцию проводили в присутствии ретронектина. Трансдуцированные клеточные продукты были получены с использованием неочищенного криоконсервированного материала. Процент CAR19-позитивных клеток определяли с помощью проточной цитометрии через 96 часов после трансдукции. Диаграммы демонстрируют репрезентативные диаграммы CAR, экспрессирующих $V\delta 1+$ $\gamma\delta$ Т-клетки. Вариант 2 демонстрирует повышенную перmissивность к трансдукции по сравнению с вариантом 1.

Фигура 13: График и репрезентативные диаграммы усиленной CAR-опосредованной цитотоксичности клеток, полученных в варианте 2 режима культивирования. Более конкретно, (А) демонстрирует процент погибших клеток NALM-6 (Sytox+ve из CTV+ve) при совместном культивировании с трансдуцированными и нетрансдуцированными клетками CAR19, полученными в варианте 2 режима культивирования в широком диапазоне соотношения эффектора и мишени. (В) демонстрирует репрезентативные диаграммы соотношения эффектора и мишени 1:50 (справа вверху) и дискриминации апоптотических клеток-мишеней (справа внизу) трансдуцированных клеток, полученных в варианте 2 при совместном культивировании с NALM-6. Клетки, трансдуцированные CAR19, полученные в варианте 2, проявляют повышенную цитотоксичность по отношению к клеткам NALM-6. Цитотоксическое нацеливание наблюдается при соотношении эффектора к мишени всего 1:100.

Фигура 14: Пропорции и выход клеток. (А) Схематическое изображение режима культивирования. Клетки высевали и культивировали с антителом анти- $V\delta 1$ (клон C08) и IL-15. В этой экспериментальной модели клетки дополнялись IL-15 в дни 6 и 9 до сбора в день 12. (В) График, демонстрирующий композицию иммунных клеток (вверху), собранных при культивировании с помощью процесса, описанного в (А), а также общий выход и жизнеспособность собранных клеток (внизу) от 5 доноров.

Фигура 15: Пропорции клеток от множества доноров. (А) График, демонстрирующий композицию иммунных клеток, собранных при размножении, как описано на Фигуре 14А, с использованием 15 случайно выбранных здоровых доноров. В частности, на этой фигуре приведен процент $V\delta 1+$ $\gamma\delta$ Т-клеток, $V\delta 2+$ $\gamma\delta$ Т-клеток и НК-клеток (CD3-CD56+) от общего числа лимфоцитов CD45+. (В) Таблица, демонстрирующая исходные значения.

Фигура 16: Значение экспрессии CD56 для цитотоксичности. Индукция экспрессии CD56 на комбинации клеток врожденного иммунитета (combo), состоящей из $\gamma\delta$ Т-клеток и НК-клеток, выражена как (А) медианная интенсивность флуоресценции (MFI), и (В) выражена как процент CD56+ на различных подмножествах иммунных

клеток внутри combo между днем 0 и 12, когда клетки культивировались, как описано на Фигуре 14А. (С) Корреляция между экспрессией CD56 на клетках CD3+ ($\gamma\delta$ Т-клетках) от 8 доноров и цитотоксичностью. На графике показана линейная регрессия между процентом клеток-мишеней sytox+ и процентом CD56+ Т-клеток ($R^2=0,93$, $p=0,0001$).

Фигура 17: Профиль хоуминг/хемокиновых рецепторов в иммунных клетках combo. Клетки культивировали, как описано на Фигуре 14А, а затем криоконсервировали. После оттаивания клетки окрашивали антителами к отображаемым маркерам и получали данные проточной цитометрии. На графике приведен процент каждого иммунного подмножества, экспрессирующего маркер, представляющий интерес, от 3 доноров.

Фигура 18: Корреляция между экспрессией CD56 на иммунных клетках combo и трансдуктивностью. (А) Клетки культивировали, как продемонстрировано на Фигуре 14А, и трансдуцировали, как описано в Примере 8. Приведена эффективность трансдукции при сборе продукта. График демонстрирует общую эффективность трансдукции, а также эффективность трансдукции для каждого отображаемого представителя иммунных клеток combo. (В) Эффективность трансдукции в подмножестве V δ 1+, стратифицированная по экспрессии CD56. (С) Данные проточной цитометрии (верхняя панель), демонстрирующие экспрессию CD56 на V δ 1+ клетках, культивируемых с использованием C08 и IL-15, как продемонстрировано на Фигуре 14А, или с использованием ОКТ3+ IL-4 +IL-21+IFN γ +IL-1 β (модифицированный Вариант 1 Примера 1). График (нижняя панель) демонстрирует эффективность трансдукции в подмножестве V δ 1+ из клеток, культивируемых с использованием ОКТ3+ IL-4+IL-21+IFN γ +IL-1 β , стратифицированных по экспрессии CD56. Наблюдается более низкая экспрессия CD56, и влияние экспрессии CD56 на эффективность трансдукции в этом варианте намного ниже по сравнению с клетками, культивируемыми с помощью процесса, описанного на Фигуре 14А.

Фигура 19: Цитотоксическое нацеливание на мишени солидных опухолей с помощью комбинации иммунных клеток («combo»). Процент лизиса клеток-мишеней (А) клеток OVCAR (происхождение - рак яичников) и (В) HeLa (происхождение - рак шейки матки) при указанных соотношениях эффектор:мишень с использованием эффекторных клеток, полученных, как описано на Фигуре 14А. Сравнение нетрансдуцированных комбинированных иммунных клеток и генно-инженерных комбинированных клеток, трансдуцированных химерным антигенным рецептором, нацеленным на мезотелин, включая внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB и CD3 дзета. В качестве контроля применяли $\alpha\beta$ CAR-Т-клетки современного уровня техники, использующие те же связующие и сигнальные домены.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Если не указано иное, все употребляемые в настоящем документе технические и научные термины имеют общепринятое значение, понятное специалисту в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. В контексте настоящего документа,

следующие термины имеют значения, присвоенные им ниже.

Гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-клетки представляют собой небольшое подмножество Т-клеток, которые экспрессируют на своей поверхности отдельный определяющий Т-клеточный рецептор (TCR). Этот TCR состоит из одной гамма (γ) и одной дельта (δ) цепи. Каждая цепь содержит вариабельную (V) область, константную (C) область, трансмембранную область и цитоплазматический хвост. V-область содержит антигенсвязывающий сайт. Существует два основных подтипа $\gamma\delta$ Т-клеток человека: один, который доминирует в периферической крови, и второй, который доминирует в негематопоэтических тканях. Эти два подтипа могут определяться по типу δ и/или γ , присутствующих на клетках. Например, $\gamma\delta$ Т-клетки, которые доминируют в периферической крови, в первую очередь экспрессируют вариабельную дельта-цепь 2 (V δ 2). $\gamma\delta$ Т-клетки, которые доминируют в негематопоэтических тканях (*т.е.* являются резидентными в тканях), в первую очередь экспрессируют вариабельную дельта-цепь 1 (V δ 1). Основными сегментами гена TRGV кодирующими V γ , являются TRGV2, TRGV3, TRGV4, TRGV5, TRGV8, TRGV9 и TRGV11 и нефункциональные гены TRGV10, TRGV11, TRGVA и TRGVB. Наиболее частые сегменты гена TRDV кодируют V δ 1, V δ 2 и V δ 3, а также несколько V-сегментов, которые имеют обозначение V δ и V α (Adams et al., 296:30-40 (2015) Cell Immunol.).

Ссылки на «V δ 1 Т-клетки» относятся к $\gamma\delta$ Т-клеткам с V δ 1-цепью, т. е. V δ 1⁺ Т-клеткам.

Ссылки на «вариабельную дельта-цепь 1» также могут обозначаться как V δ 1 или Vd1, тогда как нуклеотид, кодирующий цепь TCR, содержащую эту область, может обозначаться как «TRDV1». Все антитела или их фрагменты, которые взаимодействуют с V δ 1-цепью $\gamma\delta$ TCR, являются эффективными антителами или их фрагментами, которые связываются с V δ 1, и могут называться «антителами к вариабельной дельта-цепи 1 TCR или их фрагментами» или «антителами анти-V δ 1 или их фрагментами».

В данном документе сделаны дополнительные ссылки на другие дельта-цепи, такие как «вариабельная дельта-цепь 2». Они могут быть обозначены аналогичным образом. Например, вариабельные дельта-цепи 2 могут обозначаться как V δ 2, тогда как нуклеотид, кодирующий цепь TCR, содержащую эту область, может обозначаться как «TRDV2». В предпочтительных вариантах осуществления антитела или их фрагменты, которые взаимодействуют с V δ 1-цепью $\gamma\delta$ TCR, не взаимодействуют с другими дельта-цепями, такими как V δ 2.

В данном документе также сделаны ссылки на «вариабельные гамма-цепи». Их также можно обозначить γ -цепями или V γ , а нуклеотид, кодирующий цепь TCR, содержащую эту область, можно обозначить TRGV. Например, TRGV4 относится к цепи V γ 4. В предпочтительных вариантах осуществления антитела или их фрагменты, которые взаимодействуют с V δ 1-цепью $\gamma\delta$ TCR, не взаимодействуют с гамма-цепями, такими как V γ 4.

Ссылки на «естественные клетки-киллеры» или «NK-клетки» относятся к

естественным клеткам-киллерам, врожденноподобным лимфоцитам, которые не экспрессируют TCR или CD3 и в основном положительны по экспрессии CD56. NK-клетки также могут экспрессировать FC-рецептор CD16 и естественные рецепторы цитотоксичности, такие как NKp44 и NKp46 и NKG2D. NK-клетки человека можно разделить на два подмножества, основанные на плотности CD56 на поверхности клеток: CD56^{bright} и CD56^{dim}, каждое из которых обладает различными фенотипическими свойствами. В то время как большинство NK-клеток в периферической крови являются CD56^{dim}, CD56^{bright} NK-клетки более многочисленны в тканях. Экспрессия CD56 считается маркером активации, при этом CD56^{dim} NK-клетки повышают экспрессию CD56, чтобы принять иммунофенотип CD56^{bright} (Van Acker et al. (2017) *Front. Immunol.* 8: 892).

Ссылки на «неограниченные по МНС лимфоциты» или «МНС-неограниченные лимфоциты» относятся к лимфоцитам, которые не требуют совместимости основного комплекса гистосовместимости (МНС) между эффекторной и целевой клеткой для распознавания или инициации иммунного ответа. Поэтому этот термин относится к NK-клеткам и $\gamma\delta$ T-клеткам, поскольку эти лимфоциты не требуют распознавания МНС.

Ссылки на «не- $\gamma\delta$ + МНС-неограниченные лимфоциты» относятся к МНС-неограниченным лимфоцитам, которые не экспрессируют $\gamma\delta$ TCR (т.е. $\gamma\delta$ -). Поэтому данный термин относится к NK-клеткам.

Термин «антитело» включает в себя любую белковую конструкцию антитела, содержащую по меньшей мере один варибельный домен антитела, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт (antigen binding site - ABS). Антитела включают, помимо прочего, иммуноглобулины типов IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также все их подтипы). Общая структура иммуноглобулинов G (IgG), собранных из двух идентичных полипептидов тяжелой (H) цепи и двух идентичных полипептидов легкой (L) цепи, хорошо известна и является высококонсервативной у млекопитающих (Padlan (1994) *Mol. Immunol.* 31:169-217).

Обычное антитело или иммуноглобулин (Ig) представляет собой белок, содержащий четыре полипептидные цепи: две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи. Каждая цепь разделена на константную область и варибельный домен. Варибельные домены тяжелой (H) цепи в настоящем документе сокращенно обозначаются как VH, а варибельные домены легкой (L) цепи в настоящем документе сокращенно обозначаются как VL. Эти домены, родственные им домены и домены, полученные из них, могут обозначаться в настоящем документе как варибельные домены цепей иммуноглобулина. Домены VH и VL (также называемые области VH и VL) могут быть дополнительно поделены на области, называемые «определяющими комплементарность областями» («CDR»), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми «каркасными областями» («FR»). Каркасные и определяющие комплементарность области были точно определены (Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition U.S. Department of Health and Human Services, (1991) NIH Publication Number 91-3242). Существуют также альтернативные системы нумерации для последовательностей

CDR, например, описанные Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883. В обычном антителе каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Тетрамер обычного антитела из двух тяжелых цепей иммуноглобулина и двух легких цепей иммуноглобулина образуется тяжелой и легкой цепями иммуноглобулина, связанными между собой, *например*, дисульфидными связями, и тяжелыми цепями, связанными аналогичным образом. Константная область тяжелой цепи включает в себя три домена CH1, CH2 и CH3. Константная область легкой цепи состоит из одного домена - CL. Варибельный домен тяжелых цепей и варибельный домен легких цепей представляют собой связывающие домены, которые взаимодействуют с антигеном. Константные области антител обычно опосредуют связывание антитела с тканями или факторами организма-хозяина, включая различные клетки иммунной системы (*например*, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Фрагмент антитела (который также может называться «антительный фрагмент», «фрагмент иммуноглобулина», «антигенсвязывающий фрагмент» или «антигенсвязывающий полипептид») в контексте настоящего документа относится к части антитела (или конструкции, которая содержит указанную часть), которая специфически связывается с мишенью - варибельной дельта-цепью 1 (V δ 1) $\gamma\delta$ T-клеточного рецептора (*например*, молекула, в которой одна или большее количество цепей иммуноглобулина не являются полноразмерными, однако которая специфически связывается с мишенью). Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «фрагмент антитела», включают в себя:

- (i) Fab-фрагмент (одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1);
- (ii) F(ab')₂-фрагмент (двухвалентный фрагмент, состоящий из двух Fab-фрагментов, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области);
- (iii) Fd-фрагмент (состоящий из доменов VH и CH1);
- (iv) Fv-фрагмент (состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела);
- (v) одноцепочечный варибельный фрагмент scFv (состоящий из доменов VL и VH, соединенных с использованием рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, который позволяет им быть в виде единой белковой цепи, в которой пары областей VL и VH образуют одновалентные молекулы);
- (vi) VH (варибельный домен цепи иммуноглобулина, состоящий из домена VH);
- (vii) VL (варибельный домен цепи иммуноглобулина, состоящий из домена VL);
- (viii) однодоменное антитело (dAb, состоящее из домена VH или VL);
- (ix) минитело (состоящее из пары фрагментов scFv, которые соединены посредством доменов CH3); и
- (x) диатело (состоящее из нековалентного димера фрагментов scFv, которые состоят из домена VH одного антитела, соединенного посредством небольшого пептидного линкера с доменом VL другого антитела).

Термин «антитело человека» относится к антителам, которые имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Субъекты-люди, которым вводят указанные антитела человека, не генерируют межвидовые гуморальные ответы (например, называемых НАМА-ответами - человеческое антимышиное антитело (НАМА)) на первичные аминокислоты, содержащиеся в указанных антителах. Указанные антитела человека могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии (*например*, мутации, вводимые случайным или сайт-специфическим мутагенезом или соматической мутацией), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако этот термин не предназначен для охвата антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты к человеческим каркасным последовательностям. Антитела человека, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, например, антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина, антитела, выделенные из рекомбинантной библиотеки комбинаторных антител человека, антитела, выделенные из животного (*например*, мыши), трансгенного по генам иммуноглобулина человека, или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК, также могут называться «рекомбинантными антителами человека».

Замена по меньшей мере одного аминокислотного остатка в каркасной области переменного домена иммуноглобулина нечеловеческого происхождения соответствующим остатком переменного домена человека называется «гуманизацией». Гуманизация переменного домена может снизить иммуногенность у людей.

«Специфичность» относится к числу разных типов антигенов или антигенных детерминант, с которыми может связываться определенное антитело или его фрагмент. Специфичность антитела - это способность антитела распознавать конкретный антиген как уникальный молекулярный объект и отличать его от других. Антитело, которое «специфически связывается» с антигеном или эпитопом, является термином, хорошо известным в данной области техники. Молекула, как сообщается, проявляет «специфическое связывание», если она реагирует чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретным целевым антигеном или эпитопом, чем с альтернативными мишенями. Антитело «специфически связывается» с целевым антигеном или эпитопом, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими веществами.

«Аффинность», представленная равновесной константой для диссоциации антигена с антигенсвязывающим полипептидом (KD), является мерой силы связывания между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим сайтом антитела (или его фрагмента):

чем ниже значение KD , тем сильнее сила связывания между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим полипептидом. В альтернативном варианте аффинность также может быть выражена как константа аффинности (KA), которая составляет $1/KD$. Аффинность может быть определена известными способами в зависимости от конкретного антигена, представляющего интерес.

Считается, что любое значение KD менее 10^{-6} указывает на связывание. Специфическое связывание антитела или его фрагмента с антигеном или антигенной детерминантой может определяться любым пригодным способом, включая, например, анализ Скэтчарда и/или анализы конкурентного связывания, такие как радиоиммуноанализы (RIA), иммуноферментные анализы (EIA) и конкурентные сэндвич-анализы, равновесный диализ, равновесное связывание, гель-фильтрацию, ELISA, поверхностный плазмонный резонанс или спектроскопию (например, с помощью флуоресцентного анализа) и их различные варианты, известные в данной области техники.

«Авидность» является мерой силы связывания между антителом или его фрагментом и соответствующим антигеном. Авидность связана как с аффинностью между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим сайтом на антителе, так и числом соответствующих сайтов связывания, присутствующих на антителе.

« $V\delta 1+$ клетки тканей человека», и «гематопоэтические и кровяные $V\delta 1+$ клетки», и « $V\delta 1+$ инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL)» определяются как клетки, экспрессирующие $V\delta 1$ ($V\delta 1+$), содержащиеся или происходящие из тканей человека, или гематопоэтической системы крови или опухолей человека соответственно. Все указанные типы клеток могут быть идентифицированы по их (i) местоположению или месту, откуда они были получены, и (ii) их экспрессии $V\delta 1+$ TCR.

«Модулирующие антитела» представляют собой антитела, которые вызывают измеримое изменение, включая, помимо прочего, измеримое изменение клеточного цикла, и/или количества клеток, и/или жизнеспособности клеток, и/или одного или большего количества маркеров клеточной поверхности, и /или секреции одной или большего количества секреторных молекул (например, цитокинов, хемокинов, лейкотриенов и т.д.) и/или функции (такой как цитотоксичность по отношению к клетке-мишени или пораженной клетке) при контакте или связывания с клеткой, экспрессирующей мишень, с которой связывается указанное антитело.

Способ «модулирования» клетки или их популяции относится к способу, в котором по меньшей мере одно измеримое изменение в указанной клетке или клетках или их секреции инициируется для образования одной или большего количества «модулированных клеток».

«Иммунный ответ» представляет собой измеримое изменение по меньшей мере одной клетки, или одного типа клеток, или одного эндокринного пути, или одного экзокринного пути иммунной системы (включая, помимо прочего, клеточно-опосредованный ответ, гуморальный ответ, цитокиновый ответ, хемокиновый ответ), например, при добавлении модулирующего антитела.

«Иммунная клетка» определяется как клетка иммунной системы, включая, помимо прочего, клетки CD34+, В-клетки, клетки CD45+ (общий антиген лимфоцитов), альфа-бета-Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, хелперные Т-клетки, плазматические клетки, нейтрофилы, моноциты, макрофаги, эритроциты, тромбоциты, дендритные клетки, фагоциты, гранулоциты, врожденные лимфоидные клетки, естественные клетки-киллеры (NK) и гамма-дельта-Т-клетки. Как правило, иммунные клетки классифицируют с помощью комбинаторного анализа молекул клеточной поверхности (например, с помощью проточной цитометрии) для идентификации или группировки или кластеризации с целью дифференциации иммунных клеток на субпопуляции. Затем клетки могут быть дополнительно подразделены с помощью соответствующего анализа. Например, лимфоциты CD45+ можно дополнительно подразделить на $\gamma\delta$ -положительные популяции и $\gamma\delta$ -отрицательные популяции.

«Пораженные клетки» проявляют фенотип, связанный с прогрессированием заболевания, такого как рак, инфекция, например, вирусная инфекция, или воспалительное состояние или воспалительное заболевание. Например, пораженная клетка может быть опухолевой клеткой, клеткой аутоиммунной ткани или инфицированной вирусом клеткой. Соответственно, указанные пораженные клетки могут быть определены как опухолевые, инфицированные вирусом или воспалительные.

«Здоровые клетки» относятся к нормальным клеткам, которые не являются пораженными. Их также можно назвать «нормальными» или «непораженными» клетками. Непораженные клетки включают нераковые, неинфицированные или невоспалительные клетки. Указанные клетки часто используют наряду с соответствующими пораженными клетками для определения специфичности пораженных клеток, придаваемой лекарственным средством, и/или для лучшего понимания терапевтического индекса лекарственного средства.

«Специфичность к пораженным клеткам» является мерой того, насколько эффективно эффекторная клетка или ее популяция (такая как, например, популяция $V\delta 1+$ клеток) различает и уничтожает пораженные клетки, такие как раковые клетки, сохраняя при этом непораженные или здоровые клетки. Этот потенциал может быть измерен в модельных системах и может включать сравнение склонности эффекторной клетки или популяции эффекторных клеток к избирательному уничтожению или лизису пораженных клеток с потенциалом указанной эффекторной клетки (клеток) к уничтожению или лизису непораженных или здоровых клеток. Указанная специфичность к пораженным клеткам может информировать о потенциальном терапевтическом индексе лекарственного средства.

«Повышенная специфичность к пораженным клеткам» описывает фенотип эффекторной клетки, такой как, например, $V\delta 1+$ клетка или ее популяция, которая была модулирована для дальнейшего повышения ее способности специфически уничтожать пораженные клетки. Это усиление может быть измерено различными способами, включая кратное изменение или процентное увеличение специфичности или селективности

уничтожения пораженных клеток.

Предпочтительно, антитело или его фрагмент (*т. е.* полипептид) по настоящему изобретению являются выделенными. «Выделенный (выделенная)» полипептид или композиция представляет собой полипептид или композицию, извлеченный (извлеченную) из первоначального окружения. Термин «выделенный» может использоваться для обозначения антитела, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (*например*, выделенное антитело, которое специфически связывается с V δ 1, или его фрагмент по существу не содержат антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от V δ 1).

Предпочтительно, композиции, используемые в настоящем изобретении, являются выделенными. «Выделенная» композиция представляет собой композицию, извлеченную из первоначального окружения. Например, встречающаяся в природе композиция является выделенной, если она отделена от некоторых или всех сосуществующих материалов в естественной системе. Композиция считается выделенной, если, например, она приготовлена *in vitro* или *ex vivo*.

Антитело или его фрагмент могут представлять собой «функционально активный вариант», который также включает в себя встречающиеся в природе аллельные варианты, а также мутанты или любые другие не встречающиеся в природе варианты. Как известно в данной области техники, аллельный вариант представляет собой альтернативную форму (поли)пептида, который характеризуется как имеющий замену, делецию или добавление одной или большего количества аминокислот, которые существенным образом не меняют биологическую функцию полипептида. В качестве неограничивающего примера, указанные функционально активные варианты могут при этом функционировать, когда каркасы, содержащие CDR, подвергаются модификации, когда CDR сами по себе подвергаются модификации, когда указанные CDR прививаются к альтернативным каркасам или когда включаются N- или C-концевые удлинения. Более того, содержащие CDR связывающие домены могут быть спарены с различными партнерскими цепями, например, общими с другим антителом. При одинаковых так называемых «общих» легких или «общих» тяжелых цепях указанные связывающие домены при этом могут функционировать. Более того, указанные связывающие домены могут функционировать при мультимеризации. Более того, «антитела или их фрагменты» могут также содержать функциональные варианты, причем VH, или VL, или константные домены были модифицированы в направлении от или к отличной канонической последовательности (например, как указано в IMGT.org) и при этом функционируют.

В целях сравнения двух близкородственных полипептидных последовательностей «% идентичности последовательности» между первой полипептидной последовательностью и второй полипептидной последовательностью может быть рассчитан с помощью NCBI BLAST v2.0 со стандартными настройками для полипептидных последовательностей (BLASTP). В целях сравнения двух близкородственных полинуклеотидных последовательностей «% идентичности

последовательности» между первой полинуклеотидной последовательностью и второй полинуклеотидной последовательностью может быть рассчитан с помощью NCBI BLAST v2.0 со стандартными настройками для полинуклеотидных последовательностей (BLASTN).

Полипептидные или полинуклеотидные последовательности считаются такими же или «идентичными» другим полипептидным или полинуклеотидным последовательностям, если они имеют 100% идентичности последовательности по всей своей длине. Остатки в последовательностях нумеруются слева направо, *т. е.* от N- к С-концу для полипептидов; от 5' - к 3'-концу для полинуклеотидов.

«Различие» между последовательностями относится к вставке, делеции или замене одного аминокислотного остатка в положении второй последовательности по сравнению с первой последовательностью. Две полипептидные последовательности могут содержать одно, два или большее количество таких аминокислотных различий. Вставки, делеции или замены во второй последовательности, которая в остальном идентична (100% идентичности последовательности) первой последовательности, приводит к снижению % идентичности последовательностей. Например, если идентичные последовательности состоят из 9 аминокислотных остатков, одна замена во второй последовательности приводит к идентичности последовательностей, составляющей 88,9%. Если первая и вторая полипептидные последовательности состоят из 9 аминокислотных остатков и имеют 6 одинаковых остатков, первая и вторая полипептидные последовательности имеют более чем 66% идентичности (первая и вторая полипептидные последовательности имеют 66,7% идентичности).

В альтернативном варианте, для целей сравнения первой эталонной полипептидной последовательности со второй сравниваемой полипептидной последовательностью может быть установлено количество добавлений, замен и/или делеций, осуществленных в первой последовательности для получения второй последовательности. «Добавление» представляет собой добавление одного аминокислотного остатка в последовательность первого полипептида (включая добавление на любом конце первого полипептида). «Замена» представляет собой замену одного аминокислотного остатка в последовательности первого полипептида на один другой аминокислотный остаток. Указанная замена может быть консервативной или неконсервативной. «Делеция» представляет собой делецию одного аминокислотного остатка из последовательности первого полипептида (включая делецию на любом конце первого полипептида).

«Консервативная» аминокислотная замена представляет собой аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком сходной химической структуры и которая, как ожидается, не будет оказывать значительного влияния на функцию, активность или другие биологические свойства полипептида. Такие консервативные замены предпочтительно представляют собой замены, в которых одна аминокислота из следующих групп заменена другим аминокислотным остатком из этой же группы:

Группа	Аминокислотный остаток
Неполярные алифатические	Глицин
	Аланин
	Валин
	Метионин
	Лейцин
	Изолейцин
Ароматические	Фенилаланин
	Тирозин
	Триптофан
Полярные незаряженные	Серин
	Треонин
	Цистеин
	Пролин
	Аспарагин
	Глутамин
Отрицательно заряженные	Аспаргат
	Глутамат
Положительно заряженные	Лизин
	Аргинин
	Гистидин

Предпочтительно, гидрофобный аминокислотный остаток представляет собой неполярную аминокислоту. Более предпочтительно гидрофобный аминокислотный остаток выбирают из V, I, L, M, F, W или C.

В контексте настоящего документа нумерация полипептидных последовательностей и определения CDR и FR осуществляются в соответствии с системой Kabat (Kabat et al., 1991, полностью включена в настоящий документ посредством ссылки). «Соответствующий» аминокислотный остаток между первой и второй полипептидными последовательностями представляет собой аминокислотный остаток в первой последовательности, который имеет одинаковое положение в соответствии с системой Kabat с аминокислотным остатком во второй последовательности, тогда как аминокислотный остаток во второй последовательности может отличаться по идентичности от первой. Предпочтительно, соответствующие остатки будут иметь одинаковую цифру (и букву), если каркас и CDR будут одинаковой длины в соответствии с определением по Kabat. Выравнивание может быть выполнено вручную или с помощью, например, известного компьютерного алгоритма для выравнивания последовательностей,

такого как NCBI BLAST v2.0 (BLASTP или BLASTN), используя стандартные настройки.

Ссылки в настоящем документе на «эпитоп» относятся к части мишени, которая специфически связана антителом или его фрагментом. Эпитопы также могут называться «антигенными детерминантами». Антитело связывается «по существу с тем же эпитопом», что и другое антитело, когда они оба распознают идентичные или стерически перекрывающиеся эпитопы. Широко применяемые способы определения того, связываются ли два антитела с идентичными или перекрывающимися эпитопами, представляют собой конкурентные анализы, которые могут быть сконфигурированы в различных форматах (*например*, планшеты с лунками с использованием радиоактивных или ферментных меток или проточная цитометрия на экспрессирующих антигены клетках) с использованием меченного антигена или меченного антитела.

Эпитопы, обнаруживаемые на белках-мишенях, могут быть определены как «линейные эпитопы» или «конформационные эпитопы». Линейные эпитопы образуются непрерывной последовательностью аминокислот в белковом антигене. Конформационные эпитопы образуются из аминокислот, которые являются прерывистыми в последовательности белка, но которые объединяются при сворачивании белка в его трехмерную структуру.

Термин «вектор» в контексте настоящего документа предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, причем дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к независимой репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (*например*, бактериальные векторы, имеющие бактериальную природу репликации, и эписомные векторы млекопитающего и дрожжевые векторы). Другие векторы (*например*, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина после внесения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящем документе «рекомбинантными векторами экспрессии» (или просто «векторами экспрессии»). В целом, векторы экспрессии, используемые в технологиях рекомбинантных ДНК, часто имеют форму плазмид. В настоящем описании «плазида» и «вектор» могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако настоящее изобретение предназначено для включения таких других форм векторов экспрессии, таких как вирусные векторы (*например*, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции, а также бактериофагов и фагмидных систем. Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») в контексте настоящего документа предназначен для

обозначения клетки, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Такие термины предназначены для обозначения не только конкретной рассматриваемой клетки, но и потомства такой клетки, например, когда указанное потомство используют для создания линии клеток или банка клеток, которые затем необязательно хранят, предоставляют, продают, переносят или используют для изготовления антитела или его фрагмента, как описано в настоящем документе.

Ссылки на «субъекта», «пациента» или «индивидуума» относятся к субъекту, в частности, субъекту-млекопитающему, подлежащему лечению. Субъекты-млекопитающие включают в себя людей, отличных от человека приматов, сельскохозяйственных животных (таких как коровы), спортивных животных или домашних питомцев, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы или мыши. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В альтернативных вариантах осуществления субъект представляет собой отличное от человека млекопитающее, такое как мышь.

Термин «достаточное количество» означает количество, достаточное для получения желаемого эффекта. Термин «терапевтически эффективное количество» означает количество, которое эффективно для облегчения симптома заболевания или нарушения. Терапевтически эффективное количество может представлять собой «профилактически эффективное количество», поскольку профилактика может считаться терапией.

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

Заболевание или нарушение «облегчается», если тяжесть признака или симптома заболевания или нарушения, частота, с которой такой признак или симптом проявляются у субъекта, или и то, и другое уменьшаются.

В контексте настоящего документа термин «лечить заболевание или нарушение» означает снижение частоты и/или тяжести по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения, испытываемого субъектом.

«Рак» в контексте настоящего документа относится к аномальному росту или делению клеток. Как правило, рост и/или срок жизни раковых клеток превышают рост и/или срок жизни нормальных клеток и тканей вокруг них и не согласуются с ними. Раковые заболевания могут быть доброкачественными, предзлокачественными или злокачественными. Рак возникает в различных клетках и тканях, включая полость рта (например, рот, язык, глотку и т. д.), пищеварительную систему (например, пищевод, желудок, тонкую кишку, толстую кишку, прямую кишку, печень, желчные протоки, желчный пузырь, поджелудочную железу и т. д.), дыхательную систему (например, гортань, легкие, бронхи и т. д.), кости, суставы, кожу (например, базально-клеточная, плоскоклеточная, менингиома и т. д.), молочную железу, половую систему (например,

матку, яичник, простату, яичко и т. д.), мочевыделительную систему (например, мочевой пузырь, почку, мочеточник и т. д.), глаза, нервную систему (например, головной мозг и т. д.), эндокринную систему (например, щитовидную железу и т. д.) и систему кроветворения (например, лимфома, миелома, лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, хронический лимфолейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз и т. д.).

Композиции

В настоящем изобретении предлагаются композиции, которые содержат особенно выгодную «троицу» типов клеток: NK-клетки, $V\delta 1$ -клетки и $V\delta 2$ -клетки. Как NK-клетки, так и $\gamma\delta$ T-клетки не имеют ограничений по МНС и не требуют МНС для активации. Хотя эти клетки имеют некоторую общую биологию, позволяющую им распознавать опухолевые клетки, сохраняя при этом здоровые клетки, NK-клетки и $\gamma\delta$ T-клетки, включая их подмножества, обладают эволюционно консервативными и уникальными свойствами, присутствующими только в одном конкретном типе клеток, но не обнаруженными во всех врожденных лимфоцитах. Таким образом, желательный клеточный подход должен сочетать в себе преимущества каждого типа клеток, дополняя пациента почти полной и высокоактивной врожденной иммунной системой, которая может взаимодействовать с собственной адаптивной иммунной системой пациента и управлять более сильным и устойчивым иммунологическим ответом.

В соответствии с первым аспектом изобретения предлагается выделенная композиция, содержащая NK-клетки и $\gamma\delta$ T-клетки, при этом по меньшей мере 40% $\gamma\delta$ T-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой $CD56^{bright}$.

В соответствии с другим аспектом изобретения предлагается выделенная композиция, содержащая NK-клетки и $\gamma\delta$ T-клетки, при этом по меньшей мере 50% NK-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой $CD56^{bright}$.

В соответствии с первым аспектом изобретения предлагается выделенная композиция, содержащая NK-клетки и $\gamma\delta$ T-клетки, при этом по меньшей мере 50% $\gamma\delta$ T-клеток, присутствующих в композиции, экспрессируют $CD56$.

$CD56$, также известный как молекула адгезии нервных клеток (NCAM), представляет собой молекулу адгезии суперсемейства иммуноглобулинов (Ig), которая коррелирует с высокой цитотоксичностью в NK-клетках, $\alpha\beta$ T-клетках и $\gamma\delta$ T-клетках. Было показано, что эта молекула участвует в цис- и транс-связывании с самой собой, что способствует активации лимфоцитов. Также было показано, что она имеет основополагающее значение для образования иммунологических синапсов между лимфоцитами, лимфоцитами и антигенпрезентирующими клетками (APC), а также лимфоцитами и клетками-мишенями (Nussbaumer and Thurnher (2020) *Cells* 9(3): 772).

Клеточный фенотип также можно определить по поверхностной плотности $CD56$. Таким образом, в данной области техники известны признанные подтипы клеток $CD56^{bright}$ и $CD56^{dim}$. В настоящем изобретении показано, что повышенная экспрессия и/или интенсивность $CD56$ на $\gamma\delta$ T-клетках, присутствующих в композициях по настоящему

изобретению, коррелируют с усиленным уничтожением, что указывает на терапевтический потенциал описанных в данном документе композиций.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 40% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой CD56^{bright}. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 45%, например, по меньшей мере 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой CD56^{bright}. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 50% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой CD56^{bright}. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 55% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой CD56^{bright}. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 60% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой CD56^{bright}.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 50% НК-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой CD56^{bright}. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 60%, например по меньшей мере 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80% НК-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой CD56^{bright}. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 70% НК-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой CD56^{bright}. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 75% НК-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой CD56^{bright}. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 80% НК-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой CD56^{bright}.

Поверхностную экспрессию CD56 можно определить с помощью способов, известных в данной области техники, таких как анализ интенсивности окрашивания с помощью проточной цитометрии. Разделение клеток на CD56^{bright} и CD56^{dim} понятно специалистам в данной области техники, например, как описано в публикации Van Acker et al. (2017) Front. Immunol. 8: 892. Такие способы сравнивают популяцию образца с эталонной популяцией с известными уровнями экспрессии CD56, такой как клеточная популяция, содержащая НК-клетки. НК-клетки имеют разные уровни экспрессии CD56, которые могут быть идентифицированы как яркие (bright) и тусклые (dim), поэтому путем установления стратегий гейтирования с использованием этой эталонной популяции, популяция образцов также может быть отсортирована на фракции CD56^{bright} и CD56^{dim} для целей настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 40% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, экспрессируют CD56. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 45%, например, по меньшей мере 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, экспрессируют CD56. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 50% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, экспрессируют CD56. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 55% $\gamma\delta$ Т-клеток,

присутствующих в композиции, экспрессируют CD56. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 60% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, экспрессируют CD56. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 70% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, экспрессируют CD56, например, по меньшей мере 75%. В одном варианте осуществления по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 85% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, экспрессируют CD56. В дополнительном варианте осуществления по меньшей мере 80% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, экспрессируют CD56 после периода около 12 дней (например, 12 дней) культивирования, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80%, например, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5% клеток, присутствующих в композиции, составляют НК-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки. В одном варианте осуществления по меньшей мере 85% клеток, присутствующих в композиции, составляют НК- и $\gamma\delta$ Т-клетки. В дополнительном варианте осуществления по меньшей мере 90% клеток, присутствующих в композиции, составляют НК-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки. В дополнительном варианте осуществления по меньшей мере 95% клеток, присутствующих в композиции, составляют НК-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80%, например, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, клеток, присутствующих в композиции, состоят из НК-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток. В одном варианте осуществления по меньшей мере 85% клеток, присутствующих в композиции, состоят из НК-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток. В дополнительном варианте осуществления по меньшей мере 90% клеток, присутствующих в композиции, состоят из НК-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток. В еще одном варианте осуществления по меньшей мере 95% клеток, присутствующих в композиции, состоят из НК-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30% клеток, присутствующих в композиции, представляют собой $\gamma\delta$ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере около 30% $\gamma\delta$ Т-клеток, например, по меньшей мере около 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49% или 50% $\gamma\delta$ Т-клеток. В дополнительном варианте осуществления композиция содержит по меньшей мере около 40% $\gamma\delta$ Т-клеток, например, более чем около 45% $\gamma\delta$ Т-клеток. В других вариантах осуществления по меньшей мере 15%, например, по меньшей мере 20% клеток, присутствующих в композиции, представляют собой $\gamma\delta$ Т-клетки. В одном варианте осуществления композиция содержит по меньшей мере около 20% $\gamma\delta$ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления менее 80% клеток, присутствующих в композиции, представляют собой $\gamma\delta$ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит менее чем около 80% $\gamma\delta$ Т-клеток, например, менее чем около 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 60%, 68%, 57%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, 60%, 59%, 58%, 57%, 56%, 55%, 54%, 53%, 52%, 51% или 50% $\gamma\delta$ Т-клеток. В дополнительном варианте осуществления композиция содержит менее чем около 60% $\gamma\delta$

T-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит от около 30% до 80% $\gamma\delta$ T-клеток, например, от около 30% до 60% $\gamma\delta$ T-клеток. В дополнительном варианте осуществления композиция содержит около 50% $\gamma\delta$ T-клеток.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере около 10% $V\delta 1$ T-клеток, например, по меньшей мере около 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29% или 30% $V\delta 1$ T-клеток. В дополнительном варианте осуществления композиция содержит по меньшей мере около 20% $V\delta 1$ T-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит от около 10% до 55% $V\delta 1$ T-клеток, например, от около 10% до 30% $V\delta 1$ T-клеток. В дополнительном варианте осуществления композиция содержит около 30% $V\delta 1$ T-клеток.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере около 5% $V\delta 2$ T-клеток, например, по меньшей мере около 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% $V\delta 2$ T-клеток. В дополнительном варианте осуществления композиция содержит по меньшей мере около 7% $V\delta 2$ T-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит от около 7% до 30% $V\delta 2$ T-клеток. В одном варианте осуществления композиция содержит от около 15% до 20% $V\delta 2$ T-клеток.

В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ T-клетки включают $V\delta 1$ клетки, $V\delta 2$ клетки, $V\delta 3$ клетки, $V\delta 5$ клетки и $V\delta 8$ клетки. В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ T-клетки включают $V\delta 1$ T-клетки, $V\delta 2$ T-клетки. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99%, в частности, по меньшей мере 90% $\gamma\delta$ T-клеток состоят из $V\delta 1$ T-клеток и $V\delta 2$ T-клеток. В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ T-клетки состоят из $V\delta 1$ T-клеток и $V\delta 2$ T-клеток. В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ T-клетки включают не- $V\delta 1/V\delta 2$ T-клетки.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30% клеток, присутствующих в композиции, представляют собой NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере около 30% NK-клеток, например, по меньшей мере около 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49% или 50% NK-клеток. В дополнительном варианте осуществления композиция содержит по меньшей мере около 40% NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит менее чем около 80% NK-клеток, например, менее чем около 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 60%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, 60%, 59%, 58%, 57%, 56%, 55%, 54%, 53%, 52%, 51% или 50% NK-клеток. В дополнительном варианте осуществления композиция содержит менее чем около 60% NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит от около 20% до 70% NK-клеток, например, от около 30% до 60% NK-клеток. В других вариантах осуществления композиция содержит от около 40% до 50% NK-клеток. В дополнительном варианте осуществления композиция

содержит около 50% NK-клеток. В других вариантах осуществления по меньшей мере около 10% клеток, присутствующих в композиции, представляют собой NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере около 10% NK-клеток, например, по меньшей мере около 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% NK-клеток. В одном варианте осуществления композиция содержит от около 10% до 75% NK-клеток. В дополнительном варианте осуществления композиция содержит по меньшей мере около 20% NK-клеток.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит менее чем около 10% $\alpha\beta$ Т-клеток, например, менее чем около 5%, 4%, 3%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1% или 0,05% $\alpha\beta$ Т-клеток. В дополнительном варианте осуществления композиция содержит менее чем около 1% $\alpha\beta$ Т-клеток. Т-клетки с рецепторами $\alpha\beta$ являются высокореактивными, поэтому пригодные клеточные популяции для введения пациентам в контексте настоящего изобретения могут содержать только низкие уровни $\alpha\beta$ Т-клеток.

Композиции по настоящему изобретению также можно определить по доле неограниченных по МНС лимфоцитов, присутствующих в композиции. Таким образом, в соответствии с еще одним аспектом изобретения предлагается композиция, содержащая клетки, при этом по меньшей мере 90% клеток состоят из NK-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток, и при этом по меньшей мере 10% клеток представляют собой V δ 1 Т-клетки, по меньшей мере 5% клеток представляют собой V δ 2 Т-клетки и по меньшей мере 30% клеток представляют собой NK-клетки. Соотношения V δ 1, V δ 2 и NK-клеток могут быть такими, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 13% клеток представляют собой V δ 1 Т-клетки, по меньшей мере 7% клеток представляют собой V δ 2 Т-клетки и по меньшей мере 35% клеток представляют собой NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 20% клеток представляют собой V δ 1 Т-клетки, по меньшей мере 10% клеток представляют собой V δ 2 Т-клетки и по меньшей мере 40% клеток представляют собой NK-клетки. В других вариантах осуществления по меньшей мере 30% клеток представляют собой V δ 1 Т-клетки, по меньшей мере 20% клеток представляют собой V δ 2 Т-клетки и по меньшей мере 35% клеток представляют собой NK-клетки.

Как описано в данном документе, $\gamma\delta$ Т-клетки могут включать в себя V δ 1 Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления V δ 1 Т-клетки, присутствующие в композиции, экспрессируют высокий уровень NKp30. Например, более чем около 10%, например, более чем около 15%, 20% или 25% V δ 1 Т-клеток экспрессируют NKp30 (*m.e.* NKp30+). В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки включают в себя V δ 1 Т-клетки, и по меньшей мере 15% указанных V δ 1 Т-клеток экспрессируют NKp30.

В некоторых вариантах осуществления V δ 1 Т-клетки, присутствующие в композиции, экспрессируют низкий уровень CD27 (CD27^{low}). Например, менее чем около 70%, например, менее чем около 50%, 40% или 30% V δ 1 Т-клеток экспрессируют CD27 (*m.e.* CD27+). В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки включают в себя V δ 1 Т-клетки, и менее чем 50% указанных V δ 1 Т-клеток экспрессируют CD27.

Композиции, содержащие сконструированные клетки

Врожденные лимфоциты не контролируют пролиферацию, активацию, продукцию цитокинов и уничтожение посредством одного рецептора. Следовательно, композиция, описанная в данном документе, позволит применять стратегии генной инженерии, которые невозможны или менее выгодны для $\alpha\beta$ Т-клеток или даже конкретно для одного врожденного типа клеток. Например, можно использовать несигнальный CAR, такой как несигнальный CAR, описанный в публикации WO2019180279. Использование определенных доменов инициирует сбалансированный ответ, например, DAP10 может запускать такие ответы, как активация и уничтожение в NK-клетках, а также продукцию цитокинов Th1 в $V\delta 1$ Т-клетках.

В некоторых вариантах осуществления выделенная композиция содержит сконструированные NK-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки. Как продемонстрировано в приведенных в данном документе примерах, клетки заявленной композиции обладают повышенной перmissивностью к трансдукции, что делает их пригодными для способов генной инженерии.

Клетки композиции могут быть сконструированы для экспрессии одного или большего количества трансгенов, которые могут кодировать, например, мембраносвязанный белок (например, рецептор клеточной поверхности, такой как химерный антигенный рецептор (CAR), $\alpha\beta$ TCR, природный рецептор цитотоксичности (например, NKp30, NKp44 или NKp46), цитокин, цитокиновый рецептор (например, рецептор IL-12), хемокиновый рецептор (например, рецептор CCR2)), селективируемый маркер (например, репортерный ген) или суицидный ген. В некоторых случаях, в настоящем изобретении предлагаются популяции неограниченных по МНС лимфоцитов, сконструированных для экспрессии CAR и необязательно один или большее количество дополнительных белков, кодируемых трансгеном (например, панцирный белок). В некоторых вариантах осуществления один или большее количество трансгенов являются кодон-оптимизированными.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные NK-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR). Термин «химерный антигенный рецептор» или, альтернативно, «CAR» относится к рекомбинантной полипептидной конструкции, включающей внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, который распространяет сигнал активации, активирующий клетку. В некоторых вариантах осуществления CAR включает необязательную лидерную последовательность на N-конце слитого белка CAR.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 20% (например, по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или по существу все) сконструированных клеток экспрессируют трансген, например, CAR или другой связанный с мембраной или растворимый белок. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или по существу все)

растворимый белок. В некоторых вариантах осуществления 20%-60% сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток экспрессируют трансген, например, CAR или другой связанный с мембраной или растворимый белок. В некоторых вариантах осуществления 30%-55% сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток экспрессируют трансген, например, CAR или другой связанный с мембраной или растворимый белок. В других вариантах осуществления от около 35% до 60% сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток экспрессируют трансген, например, CAR или другой связанный с мембраной или растворимый белок.

Как продемонстрировано в приведенных в данном документе примерах, клетки CD56+ заявленной композиции все еще обладают повышенной перmissивностью к трансдукции, что делает их особенно пригодными для способов генной инженерии.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 20% (например, по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80%) сконструированных CD56+ клеток экспрессируют трансген, например, CAR или другой связанный с мембраной или растворимый белок. В других вариантах осуществления по меньшей мере 40% (например, по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80%) сконструированных CD56+ клеток экспрессируют трансген, например, CAR или другой связанный с мембраной или растворимый белок. В некоторых вариантах осуществления от около 20% до 80% сконструированных CD56+ клеток экспрессируют трансген, например, CAR или другой связанный с мембраной или растворимый белок. В других вариантах осуществления от около 45% до 75% сконструированных CD56+ клеток экспрессируют трансген, например, CAR или другой связанный с мембраной или растворимый белок.

Фармацевтические композиции

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предлагается композиция, получаемая способом, определенным в данном документе. В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая клеточную популяцию, полученную способом, определенным в данном документе. В таких вариантах осуществления композиция может содержать клетки необязательно в комбинации с другими эксципиентами. Также включены композиции, содержащие один или большее количество дополнительных активных агентов (*например*, активных агентов, пригодных для лечения заболеваний, упомянутых в настоящем документе).

Фармацевтические композиции могут включать неограниченные по МНС лимфоциты, в частности размноженные неограниченные по МНС лимфоциты, как описано в данном документе, в комбинации с одним или большим количеством фармацевтически или физиологически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов. Такие композиции могут включать буферы, например, нейтральный буферный раствор, фосфатно-буферный раствор и т.п.; углеводороды, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатные агенты, такие как EDTA или глутатион; адъюванты

(,например гидроксид алюминия); и консерванты. Растворы для криоконсервации, которые можно применять в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают, например, DMSO. Композиции могут быть составлены, например, для внутривенного введения.

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

Предпочтительным способом введения является парентеральный (например, внутривенный, подкожный, внутрибрюшинный, внутримышечный, интратекальный). В предпочтительном варианте осуществления композицию вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В другом предпочтительном варианте осуществления композицию вводят путем внутримышечной или подкожной инъекции.

В пределах объема изобретения находится применение фармацевтической композиции по изобретению в терапевтических способах для лечения заболеваний, как описано в настоящем документе, в качестве дополнения или в сочетании с другими общепринятыми методами, обычно применяемыми для лечения таких заболеваний.

В дополнительном аспекте изобретения клеточную популяцию, композицию или фармацевтическую композицию вводят последовательно, одновременно или отдельно с по меньшей мере одним активным агентом.

Способы приготовления композиций, обогащенных лимфоцитами, неограниченными по МНС.

В настоящем изобретении предлагаются способы приготовления композиций, обогащенных лимфоцитами, неограниченными по МНС. Такие способы особенно выгодны для получения композиций, пригодных для аллогенного применения, поскольку терапевтический эффект не будет ограничиваться совместимостью с МНС.

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения предлагается способ размножения неограниченных по МНС не- $\gamma\delta$ + лимфоцитов, включающий стимуляцию смешанной клеточной популяции, содержащей $\gamma\delta$ Т-клетки и НК-клетки, с использованием антитела против варибельной дельта-цепи 1 TCR (анти-V δ 1) или его фрагмента, в присутствии интерлейкина-15 (IL-15) и в отсутствие интерлейкина-4 (IL-4) и культивирования смешанной клеточной популяции. Следует понимать, что указанная смешанная клеточная популяция может быть получена из образца, как более подробно описано в данном документе.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что присутствие антитела анти-V δ 1 и IL-15 активизирует продуцирование композиции, которая представляет собой CD56+ препарат, полностью неограниченный по МНС. Не ограничиваясь какой-либо теорией, следует понимать, что V δ 1 Т-клетки, по-видимому, стимулируются присутствием антител, которые специфически связываются с V δ 1 TCR и неожиданно способствуют размножению клеток, отличных от V δ 1, например, размножение НК-клеток. Не ограничиваясь какой-либо теорией, следует понимать, что такое размножение клеток,

отличных от V δ 1, например, размножение NK-клеток, может быть опосредовано антителом анти-V δ 1 и CD16, экспрессируемым на поверхности NK-клеток. Уникальная клеточная композиция, полученная способом по настоящему изобретению, представляет собой смесь клеток с очень многообещающими терапевтическими применениями.

В соответствии с одним аспектом изобретения предлагается способ приготовления композиции, содержащей клеточную популяцию, обогащенную неограниченными по МНС лимфоцитами, при этом указанный способ включает:

(1) культивирование образца, полученного от субъекта, в присутствии:

(i) антитела против вариабельной дельта-цепи 1 TCR (анти-V δ 1) или его фрагмента; и

(ii) интерлейкина-15 (IL-15), в отсутствие интерлейкина-4 (IL-4), с первого дня указанного культивирования; и

(2) выделение клеточной популяции, культивированной из образца.

Следует понимать, что этап культивирования может быть осуществлен *in vitro* или *ex vivo*. Исходный образец может содержать смешанную клеточную популяцию, *например*, клеточную популяцию, включающую более одного типа иммунных клеток, таких как $\gamma\delta$ Т-клетки, NK-клетки и необязательно $\alpha\beta$ Т-клетки, предпочтительно только $\gamma\delta$ Т-клетки и NK-клетки. Таким образом, в одном варианте осуществления образец содержит смешанную клеточную популяцию, которая включает $\gamma\delta$ Т-клетки и NK-клетки.

В другом варианте осуществления образец обогащают Т-клетками перед культивированием, например, перед введением антитела анти-V δ 1 или его фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления перед введением антитела анти-V δ 1 или его фрагмента образец обедняют на другие типы клеток, кроме неограниченных по МНС лимфоцитов, присутствующих в образце, например, от других типов клеток, кроме NK-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток. Например, перед культивированием образец может быть обогащен Т-клетками и/или обеднен на $\alpha\beta$ Т-клетки. В одном варианте осуществления образец сначала обедняют на $\alpha\beta$ Т-клетки. Обогащение или обеднение может быть достигнуто с помощью методов, известных в данной области техники, таких как использование магнитных гранул, покрытых антителами, которые связываются с молекулами на клеточной поверхности, относящимися к фенотипу, подлежащему обогащению/обеднению.

Присутствие в клеточной культуре других типов клеток, кроме лимфоцитов, может ингибировать размножение лимфоцитов, неограниченных по МНС. Такие клетки, *например*, стромальные, эпителиальные, опухолевые и/или фидерные клетки могут быть извлечены перед культивированием. Таким образом, в одном варианте осуществления клеточная популяция не находится в прямом контакте со стромальными клетками во время культивирования. Примеры стромальных клеток включают фибробласты, перициты, мезенхимальные клетки, кератиноциты, эндотелиальные клетки и негематологические опухолевые клетки. Предпочтительно лимфоциты не находятся в прямом контакте с фибробластами во время культивирования. В одном варианте

осуществления клеточная популяция не находится в прямом контакте с эпителиальными клетками во время культивирования. В одном варианте осуществления клеточная популяция не находится в прямом контакте с опухолевыми клетками и/или фидерными клетками во время культивирования.

В одном варианте осуществления указанный способ включает культивирование лимфоцитов, неограниченных по МНС, в отсутствие существенного контакта со стромальными клетками. В дополнительном варианте осуществления указанный способ включает культивирование лимфоцитов, неограниченных по МНС, в отсутствие существенного контакта с фибробластами.

В одном варианте осуществления указанный способ включает культивирование образца в среде, содержащей плазму (например, плазму человека). В другом варианте осуществления образец культивируют в среде, содержащей 2,5% плазмы, например, 2,5% плазмы человека.

В одном варианте осуществления способ включает культивирование образца в среде, по существу не содержащей сыворотки (*например*, в среде, не содержащей сыворотки, или в среде, содержащей заменитель сыворотки (SR)). Таким образом, указанный способ включает культивирование в бессывороточной среде. Такая бессывороточная среда может также включать среду из заменителем сыворотки, при этом указанный заменитель сыворотки основан на химически определенных компонентах, чтобы избежать применения сыворотки человека или животных. В альтернативном варианте осуществления указанный способ включает культивирование в среде, содержащей сыворотку (*например*, человеческую сыворотку АВ или эмбриональную бычью сыворотку (FBS)). В одном варианте осуществления указанная среда содержит заменитель сыворотки. В одном варианте осуществления указанная среда не содержит продуктов животного происхождения.

Следует понимать, что образец, культивируемый в бессывороточной среде, имеет то преимущество, которое позволяет избежать проблем с фильтрацией, преципитацией, контаминацией и поставкой сыворотки. Кроме того, продукты животного происхождения не являются предпочтительными при изготовлении медицинских препаратов для клинического применения у людей. Использование бессывороточных сред для клеток, особенно V δ 1 Т-клеток, по существу увеличивает количество клеток, полученных из образца, по сравнению с использованием сред, содержащих сыворотку АВ.

В одном варианте осуществления антитело анти-V δ 1 или его фрагмент находятся в растворимой или иммобилизованной форме. Например, антитело или его фрагмент можно вводить в образец в растворимой форме. В альтернативном варианте антитело или его фрагмент можно вводить в образец, когда антитело или его фрагмент связаны или ковалентно связаны с поверхностью, такой как гранула или планшет (*т.е.* в иммобилизованной форме). В одном варианте осуществления антитело иммобилизовано на поверхности, такой как лунки, покрытые Fc. В альтернативном варианте антитело или его фрагмент связаны с поверхностью клетки (*например*, иммобилизованы на поверхности

антигенпрезентирующей клетки (APC)). В другом варианте осуществления антитело не иммобилизуется на поверхности, когда клеточная популяция контактирует с антителом.

Популяцию клеток, контактирующую с антителом анти-V δ 1 или его фрагментом, можно получить из различных типов образцов. В одном варианте осуществления образец представляет собой гематопозитический образец или его фракцию (*т.е.* клеточную популяцию получают из гематопозитического образца или его фракции). Ссылки в данном документе на «гематопозитический образец» или «образец гематопозитической ткани» включают кровь (такую как периферическая кровь или пуповинная кровь), костный мозг, лимфоидную ткань, ткань лимфатического узла, ткань тимуса и их фракции или обогащенные части. Образец предпочтительно представляет собой кровь, включая периферическую кровь или пуповинную кровь или их фракции, включая клетки лейкоцитарной пленки, продукты лейкофереза, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и мононуклеарные клетки низкой плотности (LDMC). В некоторых вариантах осуществления гематопозитический образец состоит из мононуклеарных клеток низкой плотности (LDMC) или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления указанный образец представляет собой кровь человека или ее фракцию. Клетки могут быть получены из образца крови с помощью методов, известных в данной области техники, таких как центрифугирование в градиенте плотности. Например, цельная кровь может быть нанесена слоями на равный объем FICOLL-NYRAQUE с последующим центрифугированием при 400xg в течение 15-30 минут при комнатной температуре. Материал среды раздела будет содержать мононуклеарные клетки низкой плотности, которые можно собрать и промыть в культуральной среде и центрифугировать при 200xg в течение 10 минут при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления клеточная популяция не получена из конкретных типов образцов, таких как образцы негематопозитической ткани, например, кожи.

В альтернативном варианте осуществления указанный образец представляет собой образец негематопозитической ткани. Ссылки в данном документе на «негематопозитические ткани» или «образец негематопозитической ткани» включают кожу (*например*, кожу человека) и кишечник (*например*, кишечник человека). Негематопозитическая ткань представляет собой ткань, отличную от крови, костного мозга, лимфоидной ткани, ткани лимфатических узлов или ткани тимуса. В одном варианте осуществления образец негематопозитической ткани представляет собой образец кожи (*например*, образец кожи человека). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток получают из кожи (*например*, кожи человека), которая может быть получена с помощью способов, известных в данной области техники. Например, клеточная популяция может быть получена из образца негематопозитической ткани путем культивирования образца негематопозитической ткани на синтетическом каркасе, сконфигурированном для облегчения выхода клеток из образца негематопозитической ткани. В альтернативном варианте указанные способы можно применять к популяции

клеток (*например*, $\gamma\delta$ Т-клеток), полученной из желудочно-кишечного тракта (*например*, ободочной кишки или толстого кишечника), молочной железы, легких, предстательной железы, печени, селезенки, поджелудочной железы, матки, влагалища и других кожных, слизистых оболочек или серозных оболочек.

Образец может быть получен из образца раковой ткани (*т.е.* $\gamma\delta$ Т- и НК-клетки также могут находиться в образцах раковой ткани), *например*, опухоли молочной железы или предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления образец может представлять собой образец раковой ткани человека (*например*, ткани солидных опухолей). В других вариантах осуществления образец может быть получен из источника, отличного от раковой ткани человека (*например*, ткани без значительного количества опухолевых клеток). Например, образец может быть получен из участка кожи (*например*, здоровой кожи), отделенного от близлежащей или соседней раковой ткани. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления образец не получен из раковой ткани (*например*, раковой ткани человека).

Образец может быть получен из ткани человека или животного, отличного от человека. Следовательно, указанный способ может дополнительно включать этап получения образца ткани человека или животного, отличного от человека. В одном варианте осуществления образец был получен от человека. В альтернативном варианте осуществления образец был получен от животного, отличного от человека.

В некоторых вариантах осуществления клеточную популяцию, контактирующую с антителом анти-V δ 1 или его фрагментом, культивируют в объеме по меньшей мере около 10 мл, таком как около 15 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл или больше. В одном варианте осуществления клеточную популяцию культивируют в объеме около 30 мл. В другом варианте осуществления клеточную популяцию культивируют в объеме около 100 мл.

В некоторых вариантах осуществления клеточную популяцию, контактирующую с антителом анти-V δ 1 или его фрагментом, культивируют при плотности клеток по меньшей мере около $0,5 \times 10^6$ клеток/см², например, 1×10^6 клеток/см², $1,5 \times 10^6$ клеток/см², 2×10^6 клеток/см², $2,5 \times 10^6$ клеток/см² или 3×10^6 клеток/см². В одном варианте осуществления клеточную популяцию культивируют при плотности клеток около 1×10^6 клеток/см². В другом варианте осуществления клеточную популяцию культивируют при плотности клеток около 2×10^6 клеток/см².

Таким образом, в настоящем изобретении предлагаются *ex vivo* способы продуцирования популяции, обогащенной лимфоцитами, неограниченными по МНС. Обогащенная популяция может быть получена из выделенных смешанных клеточных популяций (*например*, полученных из образцов, взятых у пациентов/доноров) способом, включающим приведение в контакт смешанной клеточной популяции или ее очищенной фракции с антителом или его фрагментом.

Таким образом, в настоящем документе предлагается популяция клеток, обогащенная лимфоцитами, неограниченными по МНС, которую можно получить,

например, в соответствии со способом, как определено в данном документе. В соответствии с этим аспектом изобретения будет понятно, что такая размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, может быть получена и/или размножена *in vitro* или *ex vivo*. В одном аспекте предлагается размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, которая может быть получена, например, в соответствии со способом, как определено в данном документе, при этом указанную популяцию выделяют и размножают *in vitro* или *ex vivo*.

Также предлагается размноженная популяция НК-клеток, полученная в соответствии с описанным в данном документе способом. В соответствии с этим аспектом изобретения будет понятно, что такая размноженная популяция НК-клеток может быть получена и/или размножена *in vitro* или *ex vivo*. В одном аспекте предлагается размноженная популяция НК-клеток, полученная в соответствии со способом, как определено в данном документе, при этом указанную популяцию НК-клеток выделяют и размножают *in vitro* или *ex vivo*.

Также предлагается размноженная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, полученная в соответствии с описанным в данном документе способом. В соответствии с этим аспектом изобретения будет понятно, что такая размноженная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может быть получена и/или размножена *in vitro* или *ex vivo*. В одном аспекте предлагается размноженная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, полученная в соответствии со способом, как определено в данном документе, при этом указанную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток выделяют и размножают *in vitro* или *ex vivo*.

Антитела или их фрагменты, как описано в данном документе, могут быть использованы в способах размножения лимфоцитов, неограниченных по МНС. Эти способы могут быть осуществлены *in vitro* или *ex vivo*. Если способы размножения осуществляются *in vitro*, антитела (или их фрагменты) могут применяться к выделенной клеточной популяции, полученной, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления клетки размножаются из клеточной популяции, которая была выделена из образца гематопозитической ткани, такого как образец крови.

Размножение лимфоцитов, неограниченных по МНС, включает культивирование образца в присутствии антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, и интерлейкина-15 (IL-15). Такое культивирование может происходить в присутствии или в отсутствие других цитокинов. Цитокины могут включать интерлейкины, лимфокины, интерфероны, колониестимулирующие факторы и хемокины. Представленные в данном документе данные демонстрируют, что культивирование образца в присутствии IL-15 и в отсутствие интерлейкина-4 (IL-4) с самого начала культивирования преимущественно увеличивает количество лимфоцитов, неограниченных по МНС. Следовательно, способы, описанные в данном документе, включают культивирование образца в присутствии антитела анти-V δ 1 (или его фрагмента) и IL-15 в отсутствие IL-4 с начала (т.е. в первый день) культивирования. Следует понимать, что ссылки на цитокины, описанные в данном документе, могут включать любое соединение, которое обладает той же активностью, что

и указанный цитокин, в отношении его способности стимулировать сходные физиологические эффекты на лимфоциты, неограниченные по МНС, в культуре и включают, помимо прочего, миметики или любые их функциональные эквиваленты.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают добавление антитела анти-V δ 1 (или его фрагмента) в начале (то есть в первый день) культивирования. В дополнительных вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают добавление антитела анти-V δ 1 (или его фрагмента) только в начале (то есть только в первый день) культивирования. В других вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают добавление антитела анти-V δ 1 в один или большее количество дополнительных моментов в течение периода культивирования (например, в один или два дополнительных момента времени). В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают добавление IL-15 в начале (то есть в первый день) культивирования. В дополнительных вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают добавление IL-15 только в начале (то есть только в первый день) культивирования. В других вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают добавление IL-15 в один или большее количество дополнительных моментов в течение периода культивирования (например, в один или два дополнительных момента времени). Как можно легко оценить, снижение частоты добавления антитела анти-V δ 1 и/или IL-15 обеспечивает преимущество, заключающееся в уменьшении количества манипуляций с культурами, например, сокращении обработки. Такое уменьшение количества манипуляций/обработок может обеспечить повышение технологичности.

Этап культивирования может проводиться в присутствии или отсутствии других цитокинов. Примеры цитокинов включают, помимо прочего, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-8 (IL-8), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-18 (IL-18), интерлейкин-21 (IL-21), интерлейкин-33 (IL-33), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), интерлейкин-1 β (IL-1 β), интерферон- γ (IFN- γ) и фактор-1, полученный из стромальных клеток (SDF-1).

Используемый цитокин (*например*, интерлейкин) может быть человеческого или животного происхождения, предпочтительно человеческого происхождения. Это может быть белок дикого типа или любой его биологически активный фрагмент или вариант, то есть способный связываться со своим рецептором. Такое связывание может индуцировать активацию $\gamma\delta$ Т-клеток в условиях способа по настоящему изобретению. Более предпочтительно цитокин может находиться в растворимой форме, слитым или в комплексе с другой молекулой, такой как, например, пептид, полипептид или биологически активный белок. Предпочтительно используют рекомбинантный цитокин человека. Более предпочтительно диапазон концентрации интерлейкина может варьироваться в пределах 1-10000 нг/мл, еще более предпочтительно в пределах 1-1000 нг/мл, например, около 100 нг/мл. В некоторых вариантах концентрация IL-15 составляет 100 нг/мл. Таким образом, в одном варианте осуществления этап культивирования

проводят в присутствии 100 нг/мл IL-15.

В одном варианте осуществления цитокин представляет собой фактор роста, обладающий активностью, подобной интерлейкину-15, *т.е.* любое соединение, которое обладает той же активностью, что и IL-15, в отношении его способности стимулировать аналогичные физиологические эффекты на лимфоциты, неограниченные по МНС, в культуре и включает, помимо прочего, IL-15 и миметики IL-15 или любой функциональный эквивалент IL-15, включая IL-2 и IL-7.

В одном варианте осуществления в культуральной среде присутствует IL-15. В одном варианте осуществления в культуральной среде отсутствует IL-4.

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

В одном варианте осуществления указанный способ включает культивирование образца в течение по меньшей мере 5 дней (*например*, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 18 дней, по меньшей мере 21 день, по меньшей мере 28 дней или дольше, *например*, от 5 дней до 40 дней, от 7 дней до 35 дней, от 14 дней до 28 дней или около 21 дня). В другом варианте осуществления указанный способ включает культивирование образца в течение по меньшей мере 7 дней, например, по меньшей мере 11 дней или по меньшей мере 14 дней.

В дополнительных вариантах осуществления указанный способ включает культивирование образца в течение определенного периода времени (*например*, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 18 дней, по меньшей мере 21 день, по меньшей мере 28 дней или дольше, *например*, от 5 дней до 40 дней, от 7 дней до 35 дней, от 14 дней до 28 дней или около 21 дня) в количестве, эффективном для продуцирования размноженной популяции лимфоцитов, неограниченных по МНС.

В одном варианте осуществления образец культивируют в течение периода от 5 до 60 дней, например, по меньшей мере от 7 до 45 дней, от 7 до 21 дня или от 7 до 18 дней. В одном варианте осуществления образец культивируют в течение периода от 11 до 14 дней. В дополнительном варианте осуществления образец культивируют в течение 12 дней для продуцирования размноженной популяции лимфоцитов, неограниченных по МНС. В другом варианте осуществления образец культивируют в течение периода 14 дней. В еще одном варианте осуществления образец культивируют в течение периода, пока экспрессия маркера активной пролиферации, такого как Ki-67, не будет подавляться, то есть в течение периода, прежде чем такое подавление может быть обнаружено. Таким образом, в одном варианте осуществления образец культивируют в течение периода времени до подавления экспрессии маркера активной пролиферации, такого как Ki-67. В некоторых вариантах осуществления период культивирования до/перед подавлением экспрессии маркера активной пролиферации составляет 12 дней. В одном варианте осуществления период культивирования до/перед подавлением экспрессии Ki-67 составляет 12 дней.

Указанный способ может включать регулярное добавление антитела анти-V δ 1 или его фрагмента и/или фактора роста во время культивирования. Например, антитело анти-V δ 1 или его фрагмент и/или фактор роста можно добавлять каждые 2-7 дней, более предпочтительно каждые 3-4 дня. В одном варианте осуществления (после первоначального введения) антитело анти-V δ 1 или его фрагмент и/или фактор роста добавляют после 7 дней культивирования и затем каждые 3-4 дня.

Способы по настоящему изобретению обеспечивают получение размноженной популяции лимфоцитов, неограниченных по МНС, число которых больше, чем в эталонной популяции. В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция неограниченных по МНС лимфоцитов является большей по численности, чем выделенная популяция неограниченных по МНС лимфоцитов до этапа размножения (*например*, по меньшей мере в 2 раза по численности, по меньшей мере в 5 раз по численности, по меньшей мере в 10 раз по численности, по меньшей мере в 25 раз по численности, по меньшей мере в 50 раз по численности, по меньшей мере в 60 раз по численности, по меньшей мере в 70 раз по численности, по меньшей мере в 80 раз по численности, по меньшей мере в 90 раз по численности, по меньшей мере в 100 раз по численности, по меньшей мере в 200 раз по численности, по меньшей мере в 300 раз по численности, по меньшей мере в 400 раз по численности, по меньшей мере в 500 раз по численности, по меньшей мере в 600 раз по численности, по меньшей мере в 1000 раз по численности или более по сравнению с выделенной популяцией неограниченных по МНС лимфоцитов до этапа размножения). В одном варианте осуществления увеличенная популяция неограниченных по МНС лимфоцитов в 5-10 раз больше по численности по сравнению с выделенной популяцией неограниченных по МНС лимфоцитов до этапа размножения. В дополнительном варианте осуществления размноженная популяция в 5-10 раз больше по численности по сравнению с выделенной популяцией до размножения после периода культивирования, как определено в данном документе. В еще одном варианте

осуществления размноженная популяция в 5-10 раз больше по численности, чем выделенная популяция до размножения после 12-дневного периода культивирования. В другом варианте осуществления размноженная популяция в 5-10 раз больше по численности по сравнению с выделенной популяцией до размножения после 14-дневного периода культивирования. В одном варианте осуществления размноженная популяция неограниченных по МНС лимфоцитов больше по численности, чем популяция, культивируемая в течение того же периода времени без присутствия антитела или его фрагмента. В одном варианте осуществления размноженная популяция неограниченных по МНС лимфоцитов, в частности НК-клеток, больше по численности, чем популяция, культивируемая в течение того же периода времени в присутствии IL-4.

Способы по настоящему изобретению обеспечивают получение размноженной популяции неограниченных по МНС лимфоцитов, которая может быть охарактеризована, как описано в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70% неограниченных по МНС лимфоцитов, присутствующих в клеточной популяции, выделенной с помощью указанного способа, экспрессируют CD56.

В некоторых вариантах осуществления клеточная популяция, выделенная с помощью указанного способа, включает $\gamma\delta$ Т-клетки, и при этом по меньшей мере 40% $\gamma\delta$ Т-клеток экспрессируют CD56. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 45% $\gamma\delta$ Т-клеток экспрессируют CD56. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 45%, например, по меньшей мере 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60% $\gamma\delta$ Т-клеток экспрессируют CD56. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 50% $\gamma\delta$ Т-клеток экспрессируют CD56. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 55% $\gamma\delta$ Т-клеток экспрессируют CD56. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 60% $\gamma\delta$ Т-клеток экспрессируют CD56.

Способы по настоящему изобретению могут обеспечить популяцию неограниченных по МНС лимфоцитов, которая имеет более высокую долю клеток CD56^{bright} по сравнению с эталонной популяцией (например, исходным материалом/образцом). В некоторых вариантах осуществления количество CD56^{bright} $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в размноженной композиции, увеличивается по меньшей мере на 40%. В некоторых вариантах осуществления наблюдается по меньшей мере 45%, например, по меньшей мере 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60% увеличение количества CD56^{bright} $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в размноженной композиции. В некоторых вариантах осуществления количество CD56^{bright} $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в размноженной композиции, увеличивается по меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах осуществления количество CD56^{bright} $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в размноженной композиции, увеличивается по меньшей мере на около 55%. В некоторых вариантах осуществления количество CD56^{bright} $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в размноженной композиции, увеличивается по меньшей мере на около 60%.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 40% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в размноженной композиции, представляют собой CD56^{bright}. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 45%, например, по меньшей мере 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в размноженной композиции, представляют собой CD56^{bright}. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 50% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в размноженной композиции, представляют собой CD56^{bright}. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 55% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в размноженной композиции, представляют собой CD56^{bright}. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 60% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в размноженной композиции, представляют собой CD56^{bright}.

В некоторых вариантах осуществления количество CD56^{bright} НК-клеток, присутствующих в размноженной композиции, увеличивается по меньшей мере на 50%. В некоторых вариантах осуществления наблюдается по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80% увеличение количества CD56^{bright} НК-клеток, присутствующих в размноженной композиции. В некоторых вариантах осуществления количество CD56^{bright} НК-клеток, присутствующих в размноженной композиции, увеличивается по меньшей мере на около 70%. В некоторых вариантах осуществления количество CD56^{bright} НК-клеток, присутствующих в размноженной композиции, увеличивается по меньшей мере на около 75%. В некоторых вариантах осуществления количество CD56^{bright} НК-клеток, присутствующих в размноженной композиции, увеличивается по меньшей мере на около 80%.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 50% НК-клеток, присутствующих в размноженной композиции, представляют собой CD56^{bright}. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80% НК-клеток, присутствующих в размноженной композиции, представляют собой CD56^{bright}. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 70% НК-клеток, присутствующих в размноженной композиции, представляют собой CD56^{bright}. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 75% НК-клеток, присутствующих в размноженной композиции, представляют собой CD56^{bright}. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 80% НК-клеток, присутствующих в размноженной композиции, представляют собой CD56^{bright}.

Способы размножения могут обеспечить получение размноженной популяции лимфоцитов, неограниченных по МНС, которая имеет более высокий процент НК-клеток, чем эталонная популяция. В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит по меньшей мере около 30% НК-клеток, например, по меньшей мере около 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49% или 50% НК-клеток. В

дополнительном варианте осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит по меньшей мере около 40% NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит менее чем около 80% NK-клеток, например, менее чем около 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 60%, 68%, 57%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, 60%, 59%, 58%, 57%, 56%, 55%, 54%, 53%, 52%, 51% или 50% NK-клеток. В дополнительном варианте осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит менее чем около 60% NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит от около 20% до 70% NK-клеток, например, от около 30% до 60% NK-клеток. В дополнительном варианте осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит около 50% NK-клеток.

Способы размножения могут обеспечить получение размноженной популяции лимфоцитов, неограниченных по МНС, которая имеет более высокий процент $\gamma\delta$ Т-клеток, чем эталонная популяция. В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит по меньшей мере около 30% $\gamma\delta$ Т-клеток, например, по меньшей мере около 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49% или 50% $\gamma\delta$ Т-клеток. В дополнительном варианте осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит по меньшей мере около 40% $\gamma\delta$ Т-клеток, например, более чем около 45% $\gamma\delta$ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит менее чем около 80% $\gamma\delta$ Т-клеток, например, менее чем около 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 60%, 68%, 57%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, 60%, 59%, 58%, 57%, 56%, 55%, 54%, 53%, 52%, 51% или 50% $\gamma\delta$ Т-клеток. В дополнительном варианте осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит менее чем около 60% $\gamma\delta$ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит от 30% до 60% $\gamma\delta$ Т-клеток. В дополнительном варианте осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит около 50% $\gamma\delta$ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит по меньшей мере около 10% V δ 1 Т-клеток, например, по меньшей мере около 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29% или 30% V δ 1 Т-клеток. В дополнительном варианте осуществления размноженная популяция V δ 1 Т-клеток содержит по меньшей мере около 20% V δ 1 Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит от около 10% до 55% V δ 1 Т-клеток, например, от около 10% до 30% V δ 1 Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит по меньшей мере около 5% V δ 2 Т-клеток, например,

по меньшей мере около 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% V δ 2 Т-клеток. В дополнительном варианте осуществления размноженная популяция V δ 1 Т-клеток содержит по меньшей мере около 7% V δ 2 Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит от 7% до 30% V δ 2 Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит менее чем около 10% $\alpha\beta$ Т-клеток, например, менее чем около 5%, 4%, 3%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1% или 0,05% $\alpha\beta$ Т-клеток. В дополнительном варианте осуществления размноженная популяция лимфоцитов, неограниченных по МНС, содержит менее чем около 1% $\alpha\beta$ Т-клеток. Т-клетки с рецепторами $\alpha\beta$ являются высокореактивными, поэтому пригодные клеточные популяции для введения пациентам в контексте настоящего изобретения могут содержать только низкие уровни $\alpha\beta$ Т-клеток. Антитела, описанные в данном документе, можно использовать для селективного размножения лимфоцитов, неограниченных по МНС, что снижает потребность в громоздких способах очистки после размножения для удаления $\alpha\beta$ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% клеточной популяции, выделенной с помощью указанного способа, состоит из NK-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток, и при этом по меньшей мере 10% клеток представляют собой V δ 1 Т-клетки, по меньшей мере 5% клеток представляют собой V δ 2 Т-клетки, и по меньшей мере 30% клеток представляют собой NK-клетки.

Данные относительно увеличения или уменьшения экспрессии маркеров клеточной поверхности можно дополнительно или альтернативно применять для характеристики одной или большего количества размноженных популяций лимфоцитов, неограниченных по МНС, включая CD27 и/или NKp30. В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция V δ 1 Т-клеток, присутствующая в популяции лимфоцитов, неограниченных по МНС, экспрессирует более низкий уровень CD27 по сравнению с эталонной популяцией (такой как популяция, не размноженная с помощью способа по настоящему изобретению). В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция V δ 1 Т-клеток, присутствующая в популяции лимфоцитов, неограниченных по МНС, экспрессирует низкий уровень CD27 (CD27^{low}). Например, менее чем около 70%, например, менее чем около 50%, 40% или 30% размноженной популяции V δ 1 Т-клеток экспрессируют CD27 (*m.e.* CD27+). В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция V δ 1 Т-клеток, присутствующая в популяции лимфоцитов, неограниченных по МНС, экспрессирует более высокий уровень NKp30 по сравнению с эталонной популяцией (такой как популяция, не размноженная с помощью способа по настоящему изобретению). Например, более чем около 10%, например, более чем около 15%, 20% или 25% размноженной популяции V δ 1 Т-клеток экспрессируют NKp30 (*m.e.* NKp30+).

В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция V δ 1 Т-клеток, присутствующая в популяции лимфоцитов, неограниченных по МНС, экспрессирует

высокий уровень NKG2D (NKG2D^{high}). Например, более чем около 80%, например, более чем около 85%, 90% или 95% размноженной популяции V δ 1 Т-клеток экспрессируют NKG2D (*m.e.* NKG2D+).

Доступны многочисленные основные культуральные среды, пригодные для использования при пролиферации $\gamma\delta$ Т-клеток, в частности такие среды, как CTS OpTmizer (Thermo Fisher) AIM-V, среда Iscoves и RPMI-1640 (Life Technologies), EXVIVO-10, EXVIVO-15 или EXVIVO-20 (Lonza), необязательно в присутствии сыворотки или плазмы. Среда может быть дополнена другими факторами среды, как определено в данном документе, такими как сыворотка, белки сыворотки и селективные агенты, такие как антибиотики. Например, в некоторых вариантах осуществления среда RPMI-1640 содержит 2 мМ глутамин, 10% FBS, 10 мМ HEPES, pH 7,2, 1% пенициллин/стрептомицин, пируват натрия (1 мМ; Life Technologies), заменимые аминокислоты (например, 100 мкМ Gly, Ala, Asn, Asp, Glu, Pro и Ser, 1X MEM заменимых аминокислот (Life Technologies)) и 10 мкл/л β -меркаптоэтанола. В альтернативном варианте осуществления среда AIM-V может быть дополнена заменителем сыворотки CTS Immune и амфотерицином В. Обычно клетки культивируют при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, в подходящей культуральной среде во время культивирования. Среда может быть дополнительно дополнена факторами, которые специфически поддерживают размножение конкретных клеток, таких как НК-клетки и/или Т-клетки V δ 2. Таким образом, в одном варианте осуществления среда содержит добавку НК-клеток и/или Т-клеток V δ 2. Примеры добавок к среде включают добавку НК от Miltenyi Biotec. Присутствие такой добавки (добавок) может повысить потенциал пролиферации клеток-мишеней, тем самым увеличивая долю таких клеток в размноженной популяции.

Как описано в данном документе, антитела (или их фрагменты) можно наносить на клеточную популяцию, полученную из образца. В одном варианте осуществления клеточную популяцию выделяют из образца перед введением антитела анти-V δ 1 или его фрагмента.

Ссылки в данном документе на «выделение» или «процесс выделения» клеток, в частности $\gamma\delta$ Т-клеток, относятся к способам или процессам, в которых клетки удаляют, отделяют, очищают, обогащают или иным образом извлекают из ткани или пула клеток. Следует понимать, что такие ссылки включают термины «отделенный», «удаленный», «очищенный», «обогащенный» и т.п. Выделение $\gamma\delta$ Т-клеток включает выделение или отделение клеток из образца интактной ткани или из стромальных клеток негематопоэтических тканей (*например*, фибробластов или эпителиальных клеток). Такое выделение может альтернативно или дополнительно включать выделение или отделение $\gamma\delta$ Т-клеток от других гемопоэтических клеток (*например*, $\alpha\beta$ Т-клеток или других лимфоцитов). Выделение может осуществляться в течение определенного периода времени, например, начиная с момента помещения эксплантата ткани или биоптата в культуру для выделения и заканчивая сбором клеток из культуры, например, путем

центрифугирования или других способов переноса популяции выделенных клеток для размножения культуры или используются для других целей, или исходный тканевый эксплантат или биоптат удаляют из культуры. Этап выделения может длиться от по меньшей мере 3 дней до около 45 дней. В одном варианте осуществления этап выделения длится от по меньшей мере около 10 дней до по меньшей мере 28 дней. В дополнительном варианте осуществления этап выделения длится от по меньшей мере 14 дней до по меньшей мере 21 дней. Таким образом, этап выделения может длиться по меньшей мере 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 день, 32 дня, около 35 дней, около 40 дней или около 45 дней. Можно оценить, что хотя пролиферация клеток может быть незначительной во время этого этапа выделения, она не обязательно отсутствует. Действительно, специалисту в данной области техники известно, что выделенные клетки могут также начать делиться с образованием множества таких клеток в сосуде для выделения, содержащем образец.

Популяцию клеток можно получить любым пригодным способом, позволяющим выделить лимфоциты, в частности V δ 1 T-клетки, из образцов человека или животных, отличных от человека, таких как образец негематопоетической ткани. Один из таких способов изложен в публикации Clark et al. (2006) J. Invest. Dermatol. 126(5): 1059-70, который описывает трехмерный протокол эксплантата кожи для выделения лимфоцитов из кожи человека. Эксплантат может быть прикреплен к синтетическому каркасу, чтобы облегчить выход лимфоцитов из эксплантата на каркас. Синтетический каркас относится к ненативной трехмерной структуре, пригодной для поддержки роста клеток. Синтетические каркасы могут быть изготовлены из материалов, таких как полимеры (*например*, природные или синтетические полимеры, такие как поливинилпирролидоны, полиметилметакрилат, метилцеллюлоза, полистирол, полипропилен, полиуретан), керамика (*например*, трикальцийфосфат, алюминат кальция, кальций гидроксипатит) или металлы (тантал, титан, платина и металлы той же группы элементов, что и платина, ниобий, гафний, вольфрам и комбинации их сплавов). Биологические факторы (*например*, коллагены (*такие как* коллаген I или коллаген II), фибронектины, ламинины, интегрины, ангиогенные факторы, противовоспалительные факторы, гликозаминогликаны, витрогены, антитела и их фрагменты, цитокины могут быть нанесены на поверхность каркаса или инкапсулированы в материал каркаса для улучшения адгезии, миграции, выживаемости или пролиферации клеток в соответствии со способами, известными в данной области техники. Этот и другие способы можно применять для выделения клеточной популяции из ряда других типов негематопоетических тканей, *например*, кишечника, предстательной железы и молочной железы. В других примерах пригодных способов выделения применяют способы «выползания», которые могут включать культивирование клеточной популяции и/или образца в присутствии цитокинов и/или хемокинов, достаточных для индукции выделения или разделения иммунных клеток, в

частности лимфоцитов, неограниченных по МНС.

Лимфоциты, не являющиеся резидентами гематопозитической ткани, могут быть собраны и отделены от стромальных клеток, таких как дермальные фибробласты, *т.е.* посредством твердого пипетирования. Собранные лимфоциты можно дополнительно промыть через нейлоновую сетку 40 мкм, чтобы сохранить агрегаты фибробластов, которые могли стать рыхлыми во время процесса. Лимфоциты также могут быть выделены с помощью флуоресцентной или магнитно-ассоциированной сортировки клеток с использованием, например, антител против CD45.

Ссылки в данном документе на «культивирование» включают добавление образца, включая выделенные, отделенные, удаленные, очищенные или обогащенные клетки из образца, в среду, содержащую факторы роста и/или основные питательные вещества, необходимые и/или предпочтительные для клеток и/или образца. Следует понимать, что такие условия культивирования могут быть адаптированы в соответствии с клетками или популяцией клеток, которые должны быть выделены из образца, или могут быть адаптированы в соответствии с клетками или популяцией клеток, которые должны быть выделены и размножены из образца.

Культуральная среда может дополнительно включать другие ингредиенты, которые могут способствовать росту и размножению $\gamma\delta$ Т-клеток. Примеры других ингредиентов, которые могут быть добавлены, включают, помимо прочего, плазму или сыворотку, очищенные белки, такие как альбумин, источник липидов, такой как липопротеины низкой плотности (LDL), витамины, аминокислоты, стероиды и любые другие добавки, поддерживающие или стимулирующие рост и/или выживание клеток.

Антитела или их фрагменты

Антитела, используемые в способах, предложенных в настоящем изобретении, представляют собой антитела или их фрагменты, способные специфически связываться с переменной дельта-цепью 1 ($V\delta 1$) $\gamma\delta$ Т-клеточного рецептора (TCR). В одном варианте осуществления антитело анти- $V\delta 1$ или его фрагмент представляет собой активирующее антитело анти- $V\delta 1$ или его фрагмент. Неожиданно было обнаружено, что культивирование клеточной популяции в присутствии антитела анти- $V\delta 1$ при определенных условиях культивирования способно одновременно обогатить все лимфоциты, неограниченные по МНС, а не только $V\delta 1$ Т-клетки, как ожидалось. В некоторых вариантах осуществления антитело анти- $V\delta 1$ используют в концентрации 42 нг/мл. Таким образом, в одном варианте осуществления этап культивирования описанного в данном документе способа проводится в присутствии 42 нг/мл антитела анти- $V\delta 1$.

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент представляют собой scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, переменный домен (*например*, VH или VL), диатело, минитело или моноклональное антитело. В дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент представляют собой scFv.

Описанные в данном документе антитела могут быть любого класса, *например*, IgG, IgA, IgM, IgE, IgD или их изотипам, и могут содержать легкую цепь каппа или

лямбда. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG, например, по меньшей мере один из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В дополнительном варианте осуществления антитело может быть в таком формате, как, например, формат IgG, который был модифицирован для придания желаемых свойств, таких как обеспечение мутации Fc с целью снижения эффекторной функции, увеличения периода полужизни, изменения ADCC или улучшения стабильности шарнира. Такие модификации хорошо известны в данной области техники.

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент являются человеческими. Таким образом, антитело или его фрагмент могут быть получены из последовательности иммуноглобулина (Ig) человека. CDR, каркасная и/или константная область антитела (или его фрагмента) могут быть получены из последовательности Ig человека, в частности, последовательности IgG человека. CDR, каркасная и/или константная область могут быть по существу идентичными для последовательности Ig человека, в частности, последовательности IgG человека. Преимущество использования человеческих антител заключается в том, что они обладают низкой или нулевой иммуногенностью у людей.

Антитело или его фрагмент также могут быть химерными, например, химера антитела мыши/человека.

В альтернативном варианте антитело или его фрагмент получают от отличных от человека видов, таких как мышь. Такие антитела нечеловеческого происхождения могут быть модифицированы для повышения их сходства с вариантами антител, естественным образом вырабатываемых у людей, таким образом, антитело или его фрагмент могут быть частично или полностью гуманизированными. Таким образом, в одном варианте осуществления антитело или его фрагмент являются гуманизированными.

Антитела, нацеленные на эпитопы

В настоящем изобретении предлагаются антитела (или их фрагменты), которые связываются с эпитопом V δ 1-цепи $\gamma\delta$ TCR. Такое связывание необязательно может оказывать эффект на активность $\gamma\delta$ TCR, такой как активация или ингибирование.

В одном варианте осуществления эпитоп может представлять собой активирующий эпитоп $\gamma\delta$ Т-клетки. «Активирующий» эпитоп может включать в себя, например, стимуляцию функции TCR, такую как дегрануляция, подавление TCR, цитотоксичность, пролиферация, мобилизация, повышенная выживаемость или устойчивость к истощению, внутриклеточная передача сигналов, секреция цитокина или фактора роста, фенотипическое изменение или изменение экспрессии генов. Например, связывание активирующего эпитопа может стимулировать размножение (*m. e.* пролиферацию) популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, предпочтительно популяции V δ 1 Т-клеток. Соответственно, эти антитела можно использовать для модуляции активации $\gamma\delta$ Т-клеток и тем самым модуляции иммунного ответа. Таким образом, в одном варианте осуществления связывание активирующего эпитопа подавляет $\gamma\delta$ TCR. В дополнительном или альтернативном варианте осуществления связывание активирующего эпитопа активирует

дегрануляцию $\gamma\delta$ Т-клетки. В еще одном дополнительном или альтернативном варианте осуществления связывание активирующего эпитопа активирует уничтожение клеток-мишеней, выполняемое $\gamma\delta$ Т-клетками.

В альтернативном варианте антитела (или их фрагменты) могут иметь блокирующий эффект, предотвращая связывание или взаимодействие с другим антителом или молекулой. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предлагаются выделенные антитела или их фрагменты, которые блокируют V δ 1 и предотвращают связывание TCR (*например*, посредством стерического затруднения). За счет блокирования V δ 1, антитело может препятствовать активации и/или передаче сигналов TCR. Эпитоп может представлять собой ингибирующий эпитоп $\gamma\delta$ Т-клетки. «Ингибирующий» эпитоп может включать, например, блокирование функции TCR, тем самым ингибируя активацию TCR.

Эпитоп предпочтительно состоит из по меньшей мере одной внеклеточной, растворимой, гидрофильной, внешней или цитоплазматической части V δ 1-цепи $\gamma\delta$ TCR.

В частности, эпитоп не содержит эпитоп, обнаруженный в гипервариабельной области V δ 1-цепи $\gamma\delta$ TCR, в частности CDR3 V δ 1-цепи. В предпочтительном варианте осуществления эпитоп находится в пределах невариабельной области V δ 1-цепи $\gamma\delta$ TCR. Следует понимать, что такое связывание обеспечивает уникальное распознавание V δ 1-цепи без ограничения последовательностей TCR, которые являются сильно вариабельными (в частности, CDR3). Различные комплексы $\gamma\delta$ TCR, которые распознают МНС-подобные пептиды или антиген, могут быть распознаны таким образом исключительно по присутствию V δ 1-цепи. В связи с этим будет понятно, что любой $\gamma\delta$ TCR, содержащий V δ 1-цепь, может распознаваться с помощью антител или их фрагментов, как определено в настоящем документе, независимо от специфичности $\gamma\delta$ TCR. В одном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 1-24 и/или 35-90 SEQ ID NO: 1, *например*, части V δ 1-цепи, которые не являются частью последовательностей CDR1 и/или CDR3. В одном варианте осуществления эпитоп не содержит аминокислотных остатков в аминокислотной области 91-105 (CDR3) SEQ ID NO: 1.

Аналогично хорошо охарактеризованным $\alpha\beta$ Т-клеткам, $\gamma\delta$ Т-клетки используют определенный набор соматически перегруппированных генов вариабельности (V), разнообразия (D), присоединения (J) и константной области (C), хотя $\gamma\delta$ Т-клетки содержат меньше сегментов V, D и J, чем $\alpha\beta$ Т-клетки. В одном варианте осуществления эпитоп, связанный с антителами (или их фрагментами), не содержит эпитоп, обнаруженный в области J V δ 1-цепи (*например*, одна из четырех областей J, кодируемых в зародышевой линии дельта-цепи человека: SEQ ID NO: 131 (J1*0), или 132 (J2*0), или 133 (J3*0), или 134 (J4*0)). В одном варианте осуществления эпитоп, связанный с антителами (или их фрагментами), не содержит эпитоп, обнаруженный в С-области V δ 1-цепи (*например*, SEQ ID NO: 135 (C1*0), который содержит С-концевую юкстамембранные/трансмембранные области). В одном варианте осуществления эпитоп,

связанный с антителами (или их фрагментами), не содержит эпитоп, обнаруженный в N-концевой лидерной последовательности V δ 1-цепи (например, SEQ ID NO:129). Таким образом, антитело или его фрагмент могут связываться только в V-области V δ 1-цепи (например, SEQ ID NO: 130). Таким образом, в одном варианте осуществления эпитоп состоит из эпитопа в V-области $\gamma\delta$ TCR (например, аминокислотные остатки 1-90 из SEQ ID NO: 1).

Ссылки на эпитоп сделаны в отношении последовательности V δ 1, полученной из последовательности, описанной Luoma et al. (2013) Immunity 39: 1032-1042, и записей банка данных белков RCSB: 4MNH и 3OMZ, представленных как SEQ ID NO: 1:

AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQLPSKEMIFLIRQGSDEQNAKSGRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGESLTRADKLIFGKGTRVTVEPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS (SEQ ID NO: 1)

SEQ ID NO: 1 представляет собой растворимый TCR, содержащий V-область (также называемую вариабельным доменом), D-область, J-область и константную область TCR. V-область содержит аминокислотные остатки 1-90, D-область содержит аминокислотные остатки 91-104, J-область содержит аминокислотные остатки 105-115 и константная область содержит аминокислотные остатки 116-209. В пределах V-области, CDR1 определяется как аминокислотные остатки 25-34 SEQ ID NO: 1, CDR2 определяется как аминокислотные остатки 50-54 SEQ ID NO: 1, а CDR3 определяется как аминокислотные остатки 93-104. SEQ ID NO: 1 (Xu et al., PNAS USA 108(6):2414-2419 (2011)).

Следовательно, в одном варианте осуществления выделенное антитело или его фрагмент связывается с эпитопом вариабельной дельта-цепи 1 (V δ 1) $\gamma\delta$ T-клеточного рецептора (TCR), содержащего один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей:

- (i) 3-20 SEQ ID NO: 1; и/или
- (ii) 37-77 SEQ ID NO: 1.

Картирование эпитопов описанных в данном документе антител проводили, как описано в Примерах 1 и 9 заявки PCT № PCT/GB2020/051956, которые включены в данный документ посредством ссылки.

В другом варианте осуществления антитела или их фрагменты дополнительно распознают полиморфную V-область, содержащую аминокислотные остатки 1-90 эпитопа SEQ ID NO:128. Следовательно,

аминокислоты 1-90 SEQ ID NO:1 и последовательность полиморфного варианта зародышевой линии (аминокислоты 1-90 SEQ ID NO:128) можно считать взаимозаменяемыми при определении описанных в данном документе эпитопов. Антитела по настоящему изобретению могут распознавать оба варианта этой последовательности зародышевой линии. В качестве примера, если указано, что антитела или их фрагменты, как определено в данном документе, распознают эпитопы, содержащие один или большее

количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 1-24 и/или 35-90 SEQ ID NO:1, это также относится к тем же областям SEQ ID NO:128; в частности, аминокислотным областям 1-24 и/или 35-90 SEQ ID NO:128.

В одном варианте осуществления антитела или их фрагменты распознают один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 1-90 SEQ ID NO:1 и эквивалентно расположенных аминокислотных областей 1-90 в SEQ ID NO:128. Более конкретно, в одном варианте осуществления антитела или их фрагменты, как определено в настоящем документе, распознают эпитоп зародышевой линии человека, при этом указанная зародышевая линия кодирует либо аланин (A), либо валин (V) в положении 71 SEQ ID NO:1.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество, например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более, аминокислотных остатков в описанных областях.

В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит один или более (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в аминокислотной области 3-20 из SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит один или более (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в аминокислотной области 37-77 из SEQ ID NO: 1 (например, в аминокислотной области 50-54). В еще одном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в аминокислотной области 3-20 (например, 5-20 или 3-17) и один или большее количество (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в аминокислотной области 37-77 (например, 62-77 или 62-69) SEQ ID NO: 1.

Также следует понимать, что указанное антитело (или его фрагмент) не должно связываться со всеми аминокислотами в пределах указанного диапазона. Такие эпитопы можно назвать линейными эпитопами. Например, антитело, которое связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в аминокислотной области 5-20 из SEQ ID NO: 1, может связываться только с одним или большим количеством аминокислотных остатков в указанном диапазоне, *например*, с аминокислотными остатками на каждом конце диапазона (*т. е.* аминокислотными остатками 5 и 20), необязательно включая аминокислоты в пределах этого диапазона (*т. е.* аминокислоты 5, 9, 16 и 20).

В одном варианте осуществления эпитоп содержит по меньшей мере один из аминокислотных остатков 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 или 77 SEQ ID NO: 1. В дополнительных вариантах осуществления эпитоп содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 или 77 SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах следующих аминокислотных областей SEQ ID NO:

1 (или SEQ ID NO: 128, как описано выше):

- (i) 3-17;
- (ii) 5-20;
- (iii) 37-53;
- (iv) 50-64;
- (v) 59-72;
- (vi) 59-77;
- (vii) 62-69; и/или
- (viii) 62-77.

В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп состоит из одного или большего количества аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1.

В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит аминокислотные остатки: 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68 и 69 SEQ ID NO: 1 или, соответственно, состоит из аминокислотных остатков: 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68 и 69 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит аминокислотные остатки: 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 и 77 SEQ ID NO: 1, или соответственно состоит из аминокислотных остатков: 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 и 77 SEQ ID NO: 1. В еще одном варианте осуществления эпитоп содержит аминокислотные остатки: 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 1 или, соответственно, состоит из аминокислотных остатков: 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит аминокислотные остатки: 50, 53, 59, 62 и 64 из SEQ ID NO: 1 или соответственно состоит из аминокислотных остатков: 50, 53, 59, 62 и 64 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит аминокислотные остатки: 59, 60, 68 и 72 SEQ ID NO: 1 или соответственно состоит из аминокислотных остатков: 59, 60, 68 и 72 SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 5-20 и/или 62-77 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп состоит из одного или большего количества аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 5-20 и 62-77 SEQ ID NO: 1. В другом альтернативном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 5-20 или 62-77 SEQ ID NO: 1. Антитела или их фрагменты, имеющие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все последовательности 1245_P01_E07, или такие антитела или их фрагменты могут быть получены из 1245_P01_E07. Например, антитела или их фрагменты, имеющие одну или большее количество последовательностей CDR 1245_P01_E07 или одну или обе

последовательности VH и VL 1245_P01_E07, могут связывать такие эпитопы.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 50-64 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп состоит из одного или большего количества аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 50-64 SEQ ID NO: 1. Антитела или их фрагменты, имеющие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все последовательности 1252_P01_C08, или такие антитела или их фрагменты могут быть получены из 1252_P01_C08. Например, антитела или их фрагменты, имеющие одну или большее количество последовательностей CDR 1252_P01_C08 или одну или обе последовательности VH и VL 1252_P01_C08, могут связывать такие эпитопы.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 37-53 и/или 59-77 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп состоит из одного или большего количества аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 37-53 и/или 59-77 SEQ ID NO: 1. В другом альтернативном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 37-53 или 59-77 SEQ ID NO: 1. Антитела или их фрагменты, содержащие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все последовательности 1245_P02_G04, или такие антитела или их фрагменты могут быть получены из 1245_P02_G04. Например, антитела или их фрагменты, имеющие одну или большее количество последовательностей CDR 1245_P02_G04 или одну или обе последовательности VH и VL 1245_P02_G04, могут связывать такие эпитопы.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 59-72 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп состоит из одного или большего количества аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 59-72 SEQ ID NO: 1. Антитела или их фрагменты, содержащие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все последовательности 1251_P02_C05, или такие антитела или их фрагменты могут быть получены из 1251_P02_C05. Например, антитела или их фрагменты, имеющие одну или большее количество последовательностей CDR 1251_P02_C05 или одну или обе последовательности VH и VL 1251_P02_C05, могут связывать такие эпитопы.

В одном варианте осуществления эпитоп не содержит аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 11-21 SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления эпитоп не содержит аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 21-28 SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления эпитоп не содержит аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 59 и 60 SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления эпитоп не содержит аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 67-82 SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления эпитоп не является тем же эпитопом, который связывается коммерчески доступным антителом анти-V δ 1, таким как TS-1 или TS8.2. Как

описано в WO2017197347, связывание TS-1 и TS8.2 с растворимыми TCR обнаруживалось, когда $\delta 1$ -цепь включала последовательности V $\delta 1$ J1 и V $\delta 1$ J2, но не V $\delta 1$ J3 цепь, указывая на то, что в связывании TS-1 и TS8.2 участвуют критические остатки в области дельта J1 и дельта J2.

Ссылки на термин «в пределах» в данном документе включают крайние значения определяемого диапазона. Например, фраза «в пределах аминокислотных областей 5-20» относится ко всем аминокислотным остаткам от остатка 5 включительно до остатка 20 включительно.

В данной области техники известны различные методы для определения того, какой эпитоп связывается антителом. Типовые методы включают в себя, например, стандартные анализы перекрестного блокирования, анализ методом аланин-сканирующего мутагенеза, анализ пептидных блотов, анализ расщепления пептидов, кристаллографические исследования и анализ ЯМР. Кроме того, можно применять такие способы, как иссечение эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов. Другой способ, который можно применять для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, представляет собой водород-дейтериевый обмен, обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии (как описано в Примере 9). В общих чертах, способ водород-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, и способные к обмену протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом антитела, подвергаются водород-дейтериевому обратному обмену с более низкой скоростью, чем способные к обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью поверхности. В результате этого аминокислоты, которые образуют часть поверхности белка/антитела, могут сохранять дейтерий и тем самым демонстрировать относительно более высокую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в поверхность. После диссоциации антитела целевой белок подвергают протеазному расщеплению и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело.

Последовательности антитела

Выделенные антитела анти-V $\delta 1$ или их фрагменты могут быть описаны со ссылкой на их последовательности CDR.

В одном варианте осуществления антитело анти-V $\delta 1$ или его фрагмент содержит один или большее количество из следующих элементов:

CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-25;

CDR2, содержащую последовательность, по меньшей мере на 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ: A1-A12; и/или

CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80%

последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 8-13, в частности 8, 9, 10 или 11, и/или область VL, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 20-25, в частности 20, 21, 22 или 23.

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент, которое содержит область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 8-13, в частности 8, 9, 10 или 11, и/или область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 20-25, в частности 20, 21, 22 или 23. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент, которое содержит область VH, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 8-13, в частности 8, 9, 10 или 11, и/или область VL, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 20-25, в частности 20, 21, 22 или 23.

Варианты осуществления, которые относятся в данном документе к «по меньшей мере 80%» или «80% или более», следует понимать как такие, которые включают в себя все значения, равные или превышающие 80%, например, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с указанной последовательностью.

Вместо процента идентичности последовательности варианты осуществления также могут определяться одним или большим количеством аминокислотных изменений, например, одной или большим количеством вставок, замен и/или делеций. В одном варианте осуществления последовательность может содержать до пяти аминокислотных изменений, например, до трех аминокислотных изменений, в частности до двух аминокислотных изменений. В дополнительном варианте осуществления последовательность может содержать до пяти аминокислотных замен, например, до трех аминокислотных замен, в частности до одной или двух аминокислотных замен. Например, CDR3 антитела или его фрагмента содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 2, более предпочтительно не более 1 замены по сравнению с любой из SEQ ID NO: 2-25.

Предпочтительно, любые остатки CDR1, CDR2 или CDR3, отличающиеся от их соответствующих остатков в SEQ ID NO: 2-61 и последовательностях: A1-A12, представляют собой консервативные замены по отношению к их соответствующим остаткам. Например, любые остатки CDR3, отличающиеся от их соответствующих остатков в SEQ ID NO: 2-25, представляют собой консервативные замены по отношению к их соответствующим остаткам.

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат:

(i) область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13;

(ii) область VH, содержащую CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37;

(iii) область VH, содержащую CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-49;

(iv) область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25;

(v) область VL, содержащую CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: A1-A12; и/или

(vi) область VL, содержащую CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 50-61.

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат тяжелую цепь с:

(i) областью VH, содержащей CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13;

(ii) областью VH, содержащей CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37; и

(iii) областью VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-49.

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат легкую цепь с:

(i) областью VL, содержащей CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25;

(ii) областью VL, содержащей CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: A1-A12; и

(iii) областью VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 50-61.

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент антитело или его фрагмент содержит (или состоит из) область VH, содержащую CDR3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 или 6, такой как 2, 3, 4 или 5, в частности 2, 3 или 4. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержит (или состоит из) область VH, содержащую CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29 или 30, такой как 26, 27, 28 или 29, в частности 26, 27 или 28. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат (или состоят из) область VH, содержащую CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с

любой из SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41 или 42, такой как 38, 39, 40 или 41, в частности 38, 39 или 40.

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат (или состоят из) область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10 или 11. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат (или состоят из) область VH, содержащую CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 32, 33, 34 или 35. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат (или состоят из) область VH, содержащую CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 44, 45, 46 или 47.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 2, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 26, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 38. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 26, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 38.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 27, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 39. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 3, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 27, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 39.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 28, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 40. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 4, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 28, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 40.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 5, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 29, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 41. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 5, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 29, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 41.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 30, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 42. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 6, CDR2 состоит из

последовательности SEQ ID NO: 30, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 42.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 8, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 44. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 8, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 32, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 44.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 9, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 33, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 45. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 9, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 33, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 45.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 34, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 46. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 10, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 34, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 46.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 35, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 47. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 11, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 35, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 47.

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат (или состоят из) область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25, такой как SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17 или 18, например, 14, 15, 16 или 17, в частности 14, 15 или 16. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат (или состоят из) область VL, содержащую CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: A1-A12 (из Таблицы 2), такой как ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: A1, A2, A3, A4 или A5, например, A1, A2, A3 или A4, в частности A1, A2 или A3. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат (или состоят из) область VL, содержащую CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 50-61, такой как SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53 или 54, например, 50, 51, 52 или 53, в частности 50, 51 или 52.

последовательности SEQUENCE: A8, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 57.

В одном варианте осуществления область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 22, CDR2, содержащую последовательность SEQUENCE: A9, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 58. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, CDR2 состоит из последовательности SEQUENCE: A9, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 58.

В одном варианте осуществления область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 23, CDR2, содержащую ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A10, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 59. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 23, CDR2 состоит из ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: A10, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 59.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 2, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 26, CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 38, а область VL, содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 14, CDR2, содержащую ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A1, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 50. В одном варианте осуществления HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 26, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 38, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 14, LCDR2 состоит из последовательности SEQUENCE: A1, а LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 50.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 27, CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 39, и область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15, CDR2, содержащую последовательность SEQUENCE: A2, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 51. В одном варианте осуществления HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 3, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 27, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 39, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 15, LCDR2 состоит из последовательности SEQUENCE: A2, и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 51.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 28, CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 40, и область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащую последовательность SEQUENCE: A3, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 52. В одном варианте осуществления HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 4, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 28, HCDR1 состоит из

CDR клона 1251_P02_G10, как описано в **Таблице 2**.

Таблица 2. Примеры антител против варибельной дельта-цепи 1 TCR (анти-V δ 1)

ID клона	CDR1 тяжелой цепи	SE Q ID NO .	CDR2 тяжелой цепи	SE Q ID NO .	CDR3 тяжелой цепи	SE Q ID NO .	CDR1 легкой цепи	SE Q ID NO .	CDR2 легк ой цепи	SE Q	CDR3 легкой цепи	SE Q ID NO.
1245_P 01_E07	GFTFSD YY	38	ISSSGST I	26	VDYADAF DI	2	QSIGT Y	50	VAS	A1	QSYS TLLT	14
1252_P 01_C08	GFTVSS NY	39	IYSGGS T	27	PIELGAFDI	3	NIGSQ S	51	YDS	A2	QVWD SSSDH VV	15
1245_P 02_G04	GDSVSS KSAA	40	TYYRS KWST	28	TWSGYVD V	4	QDIN DW	52	DAS	A3	QSYS TPQVT	16
1245_P 01_B07	GFTFSD YY	41	ISSSGST I	29	ENYLNAFD I	5	QSLN NY	53	AAS	A4	QSYS TPLT	17
1251_P 02_C05	GFTFSSY A	42	ISGGGG TT	30	DSGVAFDI	6	QNIRT W	54	DAS	A5	QFK RYPPT	18
1141_P 01_E01	GYSFTS YW	43	IYPGDS DT	31	HQVDTRT ADY	7	RSDV GGYN Y	55	EVS	A6	SSYTS TSTLV	19
1139_P 01_E04	GDSVSS NSAA	44	TYYRS KWYN	32	SWNDAFDI	8	QSIST W	56	DAS	A7	QSYS TPLT	20
1245_P 02_F07	GDSVSS NSAA	45	TYYRS KWYN	33	DYYYSMD V	9	QSISS W	57	DAS	A8	QSHS HPPT	21
1245_P 01_G06	GFTFSD YY	46	ISSSGST I	34	HSWNDAF DV	10	QSISS Y	58	AAS	A9	QSYS TPDT	22
1245_P 01_G09	GDSVSS NSAA	47	TYYGS KWYN	35	DYYYSMD V	11	QSIST W	59	DAS	A1 0	QSYS TPVT	23
1138_P 01_B09	GFTFSD YY	48	ISSSGST I	36	HSWSDAF DI	12	QDISN Y	60	DAS	A1 1	QSYS TPLT	24
1251_P 02_G10	GFTFSD YY	49	ISSSGST I	37	HSWNDAF DI	13	QSISS H	61	AAS	A1 2	QSYS TLLT	25

Предпочтительно каждая область VH и VL, указанная выше, содержит четыре каркасные области (FR1-FR4). В одном варианте осуществления антитело или его

фрагмент содержат каркасную область (*например*, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с каркасной областью в любой из SEQ ID NO: 62-85. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат каркасную область (*например*, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, 97% или 99% идентичности последовательности с каркасной областью в любой из SEQ ID NO: 62-85. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат каркасную область (*например*, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащую последовательность в любой из SEQ ID NO: 62-85. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат каркасную область (*например*, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), состоящую из последовательности в любой из SEQ ID NO: 62-85.

Антитела, описанные в данном документе, могут определяться по переменным последовательностям полноразмерной легкой цепи и/или тяжелой цепи. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-85. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент состоят из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-85.

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73. В другом варианте осуществления область VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65 или 66, такой как 62, 63, 64 или 65, в частности 62, 63 или 64. В дополнительном варианте осуществления область VH состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65 или 66, такой как 62, 63, 64 или 65, в частности 62, 63 или 64. В другом варианте осуществления область VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 или 73, такой как 68, 69, 70 или 71. В другом варианте осуществления область VH состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 или 73, такой как 68, 69, 70 или 71.

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат область VL, состоящую из

аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85. В другом варианте осуществления область VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74, 75, 76, 77 или 78, такой как 74, 75, 76 или 77, в частности 74, 75 или 76. В дополнительном варианте осуществления область VL состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74, 75, 76, 77 или 78, такой как 74, 75, 76 или 77, в частности 74, 75 или 76. В дополнительном варианте осуществления область VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 80, 81, 82, 83, 84 или 85, такой как 80, 81, 82 или 83. В дополнительном варианте осуществления область VL состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 80, 81, 82, 83, 84 или 85, такой как 80, 81, 82 или 83.

В дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85. В дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73, и область VL, состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85.

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 (1252_P01_C08). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62 (1245_P01_E07). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (1245_P02_G04). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (1139_P01_E04). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 (1245_P02_F07). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 (1245_P01_G06). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 (1245_P01_G09).

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63 (1252_P01_C08). В

содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 70 (1245_P01_G06), и область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 82 (1245_P01_G06). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 71 (1245_P01_G09), и область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83 (1245_P01_G09).

Для фрагментов, содержащих как область VH, так и область VL, они могут быть связаны ковалентно (*например*, посредством дисульфидных связей или линкера) или нековалентно. Фрагмент антитела, описанный в настоящем документе, может содержать scFv, *т. е.* фрагмент, содержащий область VH и область VL, соединенные с помощью линкера. В одном варианте осуществления области VH и VL соединены с помощью (*например*, синтетического) полипептидного линкера. Полипептидный линкер может содержать линкер $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$, где n =от 1 до 8, *например*, 2, 3, 4, 5 или 7. Полипептидный линкер может содержать линкер $[(\text{Gly}_4\text{Ser})_n(\text{Gly}_3\text{AlaSer})_m]_p$, где n =от 1 до 8, *например*, 2, 3, 4, 5 или 7, m =от 1 до 8, *например*, 0, 1, 2 или 3, а p =от 1 до 8, *например*, 1, 2 или 3. В дополнительном варианте осуществления линкер содержит SEQ ID NO: 98. В дополнительном варианте осуществления линкер состоит из SEQ ID NO: 98.

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 86-97. В дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 86-97. В еще одном дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87 (1252_P01_C08). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86 (1245_P01_E07). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 (1245_P02_G04). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 (1139_P01_E04). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93 (1245_P02_F07). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94 (1245_P01_G06). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95 (1245_P01_G09).

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент состоят из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 86-97. В дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент состоят из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 86-97. В еще одном дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент состоят из аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 87 (1252_P01_C08). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86 (1245_P01_E07). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 88 (1245_P02_G04). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 92 (1139_P01_E04). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 93 (1245_P02_F07). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 94 (1245_P01_G06). В альтернативном варианте осуществления антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 95 (1245_P01_G09).

Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что конструкции scFv могут быть сконструированы и изготовлены с включением N-концевых и C-концевых модификаций для содействия трансляции, очистке и обнаружению. Например, на N-конце последовательности scFv перед каноническими последовательностями VH может быть включен дополнительный аминокислотный остаток метионина и/или аланина (например, начальный QVQ или EVQ). На C-конце (т.е. на C-конце последовательности канонического домена VL, оканчивающейся в соответствии с определением IMGT) могут быть включены дополнительные последовательности, такие как (i) частичная последовательность константного домена и/или (ii) дополнительные синтетические последовательности, включая метки, такие как His-метки и Flag-метки, для облегчения очистки и обнаружения. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 124 добавляют к C-концу любой из SEQ ID NO: 86, 88-90, 92-97. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 125 добавляют к C-концу любой из SEQ ID NO: 86, 88-90, 92-97. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 126 добавляют к C-концу любой из SEQ ID NO: 87 или 91. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 127 добавляют к C-концу любой из SEQ ID NO: 87 или 91. Хорошо известно, что указанные N- или C-концевые последовательности scFv являются необязательными и могут быть удалены, модифицированы или заменены, если будут приняты альтернативные стратегии дизайна, трансляции, очистки или обнаружения scFv.

Как описано в настоящем документе, антитела могут находиться в любом формате. В предпочтительном варианте осуществления антитело находится в формате IgG1. Следовательно, в одном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 111-122. В дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 111-122. В еще одном дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

111-116, такую как SEQ ID NO: 111-113 и 116. В еще одном дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117-122, такую как SEQ ID NO: 117-120. В еще одном дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, 112, 116-120, такую как SEQ ID NO: 111, 112 или 116, или SEQ ID NO: 117-120.

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент состоят из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 111-122. В дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент состоят из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 111-122. В еще одном дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент состоят из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111-116, такой как SEQ ID NO: 111-113 и 116. В еще одном дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент состоят из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 117-122, такой как SEQ ID NO: 117-120. В еще одном дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент состоят из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111, 112, 116-120, такой как SEQ ID NO: 111, 112 или 116, или SEQ ID NO: 117-120.

В одном варианте осуществления антитело связывается с таким же или по существу таким же эпитопом, что и антитело или его фрагмент, как определено в данном документе, или конкурирует с ним. Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, или конкурирует за связывание с тем же эпитопом, что и эталонное антитело анти-V δ 1, с помощью обычных способов, известных в данной области техники. Например, чтобы определить, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело анти-V δ 1, эталонному антителу позволяют связываться с белком или пептидом V δ 1 в условиях насыщения. Затем оценивается способность исследуемого антитела связываться с V δ 1-цепью. Если исследуемое антитело способно связываться с V δ 1 после насыщения связывания с эталонным антителом анти-V δ 1, можно сделать вывод, что исследуемое антитело связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается эталонное антитело анти-V δ 1. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно связываться с V δ 1-цепью после насыщения связывания с эталонным антителом анти-V δ 1, то исследуемое антитело может связываться с тем же эпитопом, с которым связывается эталонное антитело анти-V δ 1.

Настоящее изобретение также включает в себя антитела анти-V δ 1, которые конкурируют за связывание с V δ 1 с антителом или его фрагментом, как определено в данном документе, или антителом, имеющим последовательности CDR любых иллюстративных антител, описанных в данном документе. Например, конкурентные анализы можно проводить с антителом, чтобы определить, какие белки, антитела и другие антагонисты конкурируют за связывание с V δ 1-цепью с антителом и/или имеют общий эпитоп. Такие анализы хорошо известны специалистам в данной области техники; они

оценивают конкуренцию между антагонистами или лигандами за ограниченное количество сайтов связывания белка, *например*, V δ 1. Антитело (или его фрагмент) иммобилизуют или приводят в нерастворимую форму до или после конкуренции, и образец, связанный с V δ 1-цепью, отделяют от несвязанного образца, например, путем декантации (когда антитело было предварительно приведено в нерастворимую форму) или центрифугирования (когда антитело осаждали после конкурирующей реакции). Также конкурентное связывание может быть определено на основании того, изменяется ли функция при связывании или отсутствии связывания антитела с белком, *например*, ингибирует или стимулирует молекула антитела ферментативную активность, например, метки. ELISA и другие функциональные анализы можно применять, как известно в данной области техники и описано в настоящем документе.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждый из них конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном-мишенью. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания. В альтернативном варианте два антитела имеют один и тот же эпитоп, если по существу все аминокислотные мутации в антигене-мишени, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

Затем можно провести дополнительные стандартные эксперименты (*например*, анализ пептидных мутаций и анализ связывания), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела обусловлено связыванием с тем же эпитопом, с которым связывается и эталонное антитело, или причиной отсутствия наблюдаемого связывания является стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого рода могут быть выполнены с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент обладают модифицированной эффекторной функцией за счет изменения сахаров, связанных с Asn 297 (схема нумерации по Kabat). В еще одной указанной модификации Asn 297 не является фукозилированным или демонстрирует пониженное фукозилирование (т.е. дефукозилированное антитело или нефукозилированное антитело). Фукозилирование включает добавление к молекуле сахара фукозы, например, присоединение фукозы к N-гликанам, O-гликанам и гликолипидам. Соответственно, в дефукозилированном антителе фукоза не присоединена к углеводным цепям константной области. Антитело можно модифицировать для предотвращения или ингибирования фукозилирования антитела. Как правило, модификации гликозилирования включают экспрессию указанного антитела или его фрагмента в клетке-хозяине, обладающей альтернативными возможностями процессинга гликозилирования, либо посредством направленной инженерии, либо путем

целенаправленной или случайной селекции хозяина или клона. Эти и другие эффекторные модификации обсуждаются в недавних обзорах, таких как Xinhua Wang et al. (2018) *Protein & Cell* 9: 63-73 и Pereira et al. (2018) *mAbs* 10(5): 693-711, которые включены в данный документ.

Модификации последовательностей антител

Антитела и их фрагменты могут быть модифицированы с помощью известных способов. Модификации последовательностей молекул антител, описанных в данном документе, могут быть легко включены специалистами в данной области техники. Следующие примеры не являются ограничивающими.

При обнаружении антител и извлечении последовательностей из фаговых библиотек переменные домены желаемых антител могут быть переформатированы в полноразмерный IgG путем субклонирования. Для ускорения процесса переменные домены часто переносят с помощью рестрикционных ферментов. Такие уникальные сайты рестрикции могут вводить дополнительные/альтернативные аминокислоты вдали от канонической последовательности (такие канонические последовательности можно найти, например, в международной информационной системе ImMunoGeneTics [IMGT], см. <http://www.imgt.org>). Они могут быть введены в виде модификаций последовательностей легкой цепи каппа или лямбда.

Модификации легкой цепи каппа

Переменные последовательности легкой цепи каппа могут быть клонированы с помощью сайтов рестрикции (*например*, Nhe1-Not1) в процессе переформатирования в полноразмерный IgG. Более конкретно, на N-конце легкой цепи каппа была введена дополнительная последовательность Ala-Ser для поддержания клонирования. Предпочтительно, эту дополнительную последовательность AS затем удаляют в ходе дальнейшей разработки, чтобы получить каноническую N-концевую последовательность. Следовательно, в одном варианте осуществления описанные в настоящем документе антитела, содержащие легкую цепь каппа, не содержат последовательность AS на своих N-концах, *т. е.* SEQ ID NO: 74, 76-78 и 80-85 не содержат исходную последовательность AS. В дополнительном варианте осуществления SEQ ID NO: 74 и 76-78 не содержат исходную последовательность AS. Следует понимать, что этот вариант осуществления также применим к другим последовательностям, включенным в данный документ, которые содержат эту последовательность (*например*, SEQ ID NO: 86, 88-90 и 92-97).

Для поддержания клонирования могут быть внесены дополнительные аминокислотные изменения. Например, для антител, описанных в данном документе, на границе переменного домена и константного домена легкой цепи каппа валин был заменен на аланин для поддержания клонирования. Это привело к модификации константного домена каппа. В частности, это привело к тому, что константный домен начинается с RTAAPS (от сайта рестрикции NotI). Предпочтительно, эту последовательность можно модифицировать в ходе дальнейшей разработки для получения канонических константных областей легкой цепи каппа, которые начинаются с

RTVAAAPS. Следовательно, в одном варианте осуществления описанные в данном документе антитела, содержащие легкую цепь каппа, содержат константный домен, начинающийся с последовательности RTV. Таким образом, в одном варианте осуществления последовательность RTAAAPS из SEQ ID NO: 111-114 и 117-122 заменена последовательностью RTVAAAPS.

Модификации легкой цепи лямбда

Аналогично примеру цепи каппа выше, переменные домены легкой цепи лямбда также могут быть клонированы путем введения сайтов рестрикции (*например*, Nhe1-Not1) в процессе реформатирования в полноразмерный IgG. Более конкретно, на N-конце легкой цепи лямбда может быть введена дополнительная последовательность Ala-Ser для поддержания клонирования. Предпочтительно, эту дополнительную последовательность AS затем удаляют в ходе дальнейшей разработки, чтобы получить каноническую N-концевую последовательность. Следовательно, в одном варианте осуществления описанные в данном документе антитела, содержащие легкую цепь лямбда, не содержат последовательность AS на своих N-концах, *т. е.* SEQ ID NO: 75 и 79 не содержат исходную последовательность AS. Следует понимать, что этот вариант осуществления также применим к другим последовательностям, включенным в данный документ, которые содержат эту последовательность (*например*, SEQ ID NO: 87, 91, 115 и 116). В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 75 не содержит первоначальных шести остатков, *т. е.* последовательность ASSYEL удалена.

В качестве другого примера, для антител, описанных в данном документе, на границе переменного домена и константного домена легкой цепи лямбда было введено изменение последовательности лизина на аланин для поддержания клонирования. Это привело к модификации константного домена лямбда. В частности, это привело к тому, что константный домен начинается с GQPAAAPS (от сайта рестрикции NotI). Предпочтительно, эту последовательность можно модифицировать в ходе дальнейшей разработки для получения канонической константной области легкой цепи лямбда, которая начинается с GQPKAAPS. Следовательно, в одном варианте осуществления описанные в данном документе антитела, содержащие легкую цепь лямбда, содержат константный домен, начинающийся с последовательности GQPK. Таким образом, в одном варианте осуществления последовательность GQPAAAPS из SEQ ID NO: 115 или 116 заменена последовательностью GQPKAAPS.

Модификации тяжелой цепи

Как правило, последовательности переменной тяжелой цепи человека начинаются либо с основного глутамина (Q), либо с кислого глутамата (E). Однако известно, что обе такие последовательности затем превращаются в кислый аминокислотный остаток пироглутамат (pE). Превращение Q в pE приводит к изменению заряда антитела, тогда как превращение E в pE не изменяет заряд антитела. Следовательно, чтобы избежать переменного изменения заряда со временем, одна возможность заключается в модификации начальной последовательности тяжелой цепи с

Q на E в первую очередь. Следовательно, в одном варианте осуществления тяжелая цепь антитела, описанного в настоящем документе, содержит модификацию Q на E на N-конце. В частности, начальный остаток SEQ ID NO: 62, 64 и/или 67-71 может быть изменен с Q на E. Следует понимать, что этот вариант осуществления также применим к другим последовательностям, включенным в настоящее описание, которые содержат эту последовательность (*например*, SEQ ID NO: 86, 88, 91-97 и 111, 112, 115, 117-120).

Более того, С-конец константного домена IgG1 заканчивается на PGK. Однако концевой основной лизин (K) затем часто расщепляется во время экспрессии (*например*, в клетках CHO). Это в свою очередь приводит к изменению заряда антитела посредством различной утраты С-концевого остатка лизина. Таким образом, одна возможность заключается в удалении лизина в первую очередь, что приведет к однородной и стабильной С-концевой последовательности тяжелой цепи, заканчивающейся на PG. Следовательно, в одном варианте осуществления с С-конца тяжелой цепи антитела, описанного в данном документе, был удален концевой K. В частности, антитело по настоящему изобретению может содержать любую из SEQ ID NO: 111-122, в которой концевой остаток лизина был удален.

Необязательные модификации аллотипа

При обнаружении антител могут использоваться специфические человеческие аллотипы. Необязательно антитела могут быть переключены на другие человеческие аллотипы в ходе разработки. В качестве неограничивающего примера, для цепи каппа существует три человеческих аллотипа, обозначаемых Km1, Km1,2 и Km3, которые определяют три аллели Km (используя нумерацию аллотипов): Km1 коррелирует с валином 153 (IMGT V45.1) и лейцином 191 (IMGT L101); Km1,2 коррелирует с аланином 153 (IMGT A45.1) и лейцином 191 (IMGT L101); а Km3 коррелирует с аланином 153 (IMGT A45.1) и валином 191 (IMGT V101). Необязательно таким образом можно модифицировать последовательность с одного аллотипа на другой с помощью стандартных подходов клонирования. Например, изменение L191V (IMGT L101V) преобразует аллотип Km1,2 в аллотип Km3. Для получения дополнительной информации касательно таких аллотипов см. публикацию Jefferis and Lefranc (2009) MAb 1(4):332-8, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Следовательно, в одном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, содержит аминокислотные замены, полученные от другого человеческого аллотипа одного и того же гена. В дополнительном варианте осуществления антитело содержит замену L191V (IMGT L101V) в цепи каппа для преобразования с-домена из аллотипа km1,2 в аллотип km3.

Связывание антител

Антитело или его фрагмент могут связываться с V δ 1-цепью γ δ TCR с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, менее чем $1,5 \times 10^{-7}$ М (*m.e.* 150 нМ). В предпочтительном варианте KD составляет менее чем $1,5 \times 10^{-7}$ М (*т.е.* 150 нМ). В дополнительном варианте осуществления KD составляет

$1,3 \times 10^{-7}$ М (*т. е.* 130 нМ) или менее чем, например, $1,0 \times 10^{-7}$ М (*т. е.* 100 нМ) или меньше. В еще одном дополнительном варианте осуществления КД составляет менее чем $5,0 \times 10^{-8}$ М (*т. е.* 50 нМ), например, менее чем $4,0 \times 10^{-8}$ М (*т. е.* 40 нМ), менее чем $3,0 \times 10^{-8}$ М (*т. е.* 30 нМ) или менее чем $2,0 \times 10^{-8}$ М (*т. е.* 20 нМ). Например, в соответствии с одним аспектом предлагается человеческое антитело анти-V δ 1, которое связывается с V δ 1-цепью $\gamma\delta$ TCR с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, менее чем $1,5 \times 10^{-7}$ М (*т. е.* 150 нМ).

В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент связываются с V δ 1-цепью $\gamma\delta$ TCR с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, менее чем $4,0 \times 10^{-8}$ М (*т. е.* 40 нМ), менее чем $3,0 \times 10^{-8}$ М (*т. е.* 30 нМ) или менее чем $2,0 \times 10^{-8}$ М (*т. е.* 20 нМ).

Анализ аффинности связывания описанных в данном документе антител проводили, как описано в Примерах 1 и 5 заявки РСТ № РСТ/GB2020/051956, которые включены в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления аффинность связывания антитела или его фрагмента устанавливают путем нанесения антитела или его фрагмента прямо или опосредовано (*например*, путем захвата антителом против Fc IgG человека) на поверхность сенсора (*например*, аминного чипа высокой емкости или эквивалентный), причем мишень, связанная антителом или его фрагментом (*т. е.* цепь V δ 1 $\gamma\delta$ TCR), протекает над чипом для обнаружения связывания. Предпочтительно, прибор MASS-2 (который также может называться Sierra SPR-32) используют при 25°C в рабочем буфере PBS+0,02% Tween 20 со скоростью 30 мкл/мин.

В настоящем документе описаны и другие анализы, которые можно применять для определения функций антител. Например, антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе, можно оценивать путем вовлечения $\gamma\delta$ TCR, *например*, измерения подавления $\gamma\delta$ TCR при связывании с антителом. Поверхностную экспрессию $\gamma\delta$ TCR после применения антитела или его фрагмента (необязательно присутствующих на поверхности клетки) можно измерить, *например*, с помощью проточной цитометрии. Антитело или его фрагмент, описанные в данном документе, также можно оценить путем измерения дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток. Например, экспрессию CD107a, маркера дегрануляции клеток, можно измерить после нанесения антитела или его фрагмента (необязательно присутствующих на поверхности клетки) на $\gamma\delta$ Т-клетки, *например*, с помощью проточной цитометрии. Антитело или его фрагмент, описанные в данном документе, также можно оценить путем измерения активности уничтожения клеток-мишеней, выполняемого $\gamma\delta$ Т-клетками (чтобы проверить, оказывает ли антитело влияние на активность уничтожения клеток-мишеней, выполняемого $\gamma\delta$ Т-клетками). Например, клетки-мишени можно инкубировать с $\gamma\delta$ Т-клетками в присутствии антитела или его фрагмента (необязательно присутствующих на поверхности клетки). После инкубации культуру могут окрашивать красителем для оценки жизнеспособности клеток, чтобы отличить живые клетки-мишени от мертвых. Долю мертвых клеток затем можно

измерить, *например*, с помощью проточной цитометрии.

Как описано в данном документе, антитела или их фрагменты, используемые в анализах, могут присутствовать на поверхности, например, поверхности клетки, такой как клетка, содержащая Fc-рецептор. Например, антитела или их фрагменты могут присутствовать на поверхности клеток ТНР-1, таких как клетки Т1В-202™ (доступны от Американской коллекции типовых культур (АТСС)). В альтернативном варианте антитела или их фрагменты можно непосредственно использовать в анализах.

В таких функциональных анализах выход можно измерить путем расчета полумаксимальной концентрации, также называемой «ЕС50» или «эффективная концентрация при 50 процентах». Термин «IC50» относится к ингибирующей концентрации. ЕС50 и IC50 можно измерить с помощью способов, известных в данной области техники, таких как способы проточной цитометрии. Во избежание сомнений, значения ЕС50 в настоящей заявке представлены с помощью антитела, отформатированного до IgG1. Такие значения можно легко преобразовать на основании молекулярной массы формата антитела в эквивалентные значения следующим образом:

$$(\text{мкг/мл}) / (\text{мол. масса в кДа}) = \text{мкМ}$$

ЕС50 для подавления $\gamma\delta$ TCR при связывании с антителом (или фрагментом) может составлять менее чем 0,50 мкг/мл, например, менее чем 0,40 мкг/мл, 0,30 мкг/мл, 0,20 мкг/мл, 0,15 мкг/мл, 0,10 мкг/мл или 0,05 мкг/мл. В предпочтительном варианте осуществления ЕС50 для подавления $\gamma\delta$ TCR при связывании с антителом (или его фрагментом) составляет менее чем 0,10 мкг/мл. В частности, ЕС50 для подавления $\gamma\delta$ TCR при связывании антитела (или его фрагмента) может составлять менее чем 0,06 мкг/мл, например, менее чем 0,05 мкг/мл, 0,04 мкг/мл или 0,03 мкг/мл. В частности, указанные значения ЕС50 имеют место тогда, когда антитело измеряют в формате IgG1. Например, значение ЕС50 подавления $\gamma\delta$ TCR можно измерить с помощью проточной цитометрии (*например*, как описано в анализе Примера 6).

Значение ЕС50 при дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании с антителом (или фрагментом) может составлять менее чем 0,050 мкг/мл, например, менее чем 0,040 мкг/мл, 0,030 мкг/мл, 0,020 мкг/мл, 0,015 мкг/мл, 0,010 мкг/мл или 0,008 мкг/мл. В частности, значение ЕС50 при дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании с антителом (или его фрагментом) может составлять менее чем 0,005 мкг/мл, например, менее чем 0,002 мкг/мл. В предпочтительном варианте осуществления значение ЕС50 при дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток при связывании с антителом (или его фрагментом) составляет менее чем 0,007 мкг/мл. В частности, указанные значения ЕС50 имеют место тогда, когда антитело измеряют в формате IgG1. Например, значение ЕС50 при дегрануляции $\gamma\delta$ Т-клеток можно измерить путем обнаружения экспрессии CD107a (*т. е.* маркера дегрануляции клеток) с помощью проточной цитометрии (*например*, как описано в анализе Примера 7). В одном варианте осуществления экспрессию CD107a измеряют с помощью антитела анти-CD107a, такого как антитело BV421 против человеческого CD107a (клон Н4А3) (BD Biosciences).

Значение EC50 при уничтожении клеток-мишеней, выполняемом $\gamma\delta$ Т-клетками, при связывании с антителом (или его фрагментом) может составлять менее чем 0,50 мкг/мл, например, менее чем 0,40 мкг/мл, 0,30 мкг/мл, 0,20 мкг/мл, 0,15 мкг/мл, 0,10 мкг/мл или 0,07 мкг/мл. В предпочтительном варианте осуществления значение EC50 при уничтожении клеток-мишеней, выполняемом $\gamma\delta$ Т-клетками, при связывании с антителом (или его фрагментом) составляет менее чем 0,10 мкг/мл. В частности, значение EC50 при уничтожении клеток-мишеней, выполняемом $\gamma\delta$ Т-клетками, при связывании с антителом (или его фрагментом) может составлять менее чем 0,060 мкг/мл, например, менее чем 0,055 мкг/мл, в частности менее чем 0,020 мкг/мл или 0,010 мкг/мл. В частности, указанные значения EC50 имеют место тогда, когда антитело измеряют в формате IgG1. Например, значение EC50 при уничтожении клеток-мишеней, выполняемом $\gamma\delta$ Т-клетками, можно измерить путем обнаружения доли мертвых клеток (*т. е.* используя краситель для оценки жизнеспособности клеток) с помощью проточной цитометрии после инкубации антитела, $\gamma\delta$ Т-клеток и клеток-мишеней (*например*, как описано в анализе Примера 8). В одном варианте осуществления уничтожение клеток-мишеней измеряют с помощью красителя для оценки жизнеспособности клеток Viability Dye eFluor™ 520 (ThermoFisher).

В анализах, описанных в этих аспектах, антитело или его фрагмент могут присутствовать на поверхности клетки, такой как клетка ТНР-1, например, Т1В-202™ (АТСС). Клетки ТНР-1 необязательно помечены красителем, таким как CellTracker™ Orange СМТМR (ThermoFisher).

Функциональный анализ описанных в данном документе антител проводили, как описано в Примерах 1, 6, 7 и 8 публикации WO 2021032961 (заявка РСТ № РСТ/GB2020/051956), которые включены в данный документ посредством ссылки. Сводная информация о связывании и функциональных свойствах антител, описанных в данном документе, представлена в **Таблице 3**.

Таблица 3. Сводная информация о связывании и функциональных свойствах антител анти-V δ 1

ID клона	K_D (нМ)	Подавление TCR (EC50 мкг/мл - 3 донора)	Дегрануляция Т-клеток (EC50 мкг/мл - 3 донора)	Анализ на уничтожение (EC50 мкг/мл - 2 или 3 донора)
1245_P01_E07	12,4	0,04-0,11	0,007-0,004	0,06
1252_P01_C08	100	0,02-0,03	0,001-0,0006	0,02
1245_P02_G04	126	0,01-0,05	0,002	0,10
1245_P01_B07	341	Положительный; 0,35 (только 1 донор)	Положительный; 0,1 (только 1 донор)	0,13

1251_P02_C05	1967*	Положительный; Н/Д	Положительный; Н/Д	Н/Д*
1139_P01_E04	251	0,027-0,057	0,005	0,005-0,019
1245_P02_F07	193	0,032-0,043	0,001-0,002	0,006-0,018
1245_P01_G06	264	0,042-0,055	0,001	0,007-0,051
1245_P01_G09	208	0,029-0,040	0,001	0,003-0,008
1138_P01_B09	290	0,078-0,130	Н/Д	0,055-0,199
1251_P02_G10	829	0,849; Н/Д	Н/Д	Н/Д**

Связывание 1252_P02_C05 не достигло насыщения, поэтому данные были экстраполированы; Н/Д: определить не удалось; Н/Д: определить не удалось, кривая титрования не вышла на плато; Н/Д**: Пониженный профиль уничтожения, значение EC50 не установлено.

Антитела (или фрагменты) можно получать и подвергать манипуляции с помощью методов, описанных например, в Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2012) 4th Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридной технологии путем слияния В-клетки, продуцирующей специфические антитела, с клеткой миеломы (В-клеточный рак), выбранной по способности расти в культуре тканей и отсутствию синтеза цепей антител.

Моноклональное антитело, направленное против определенного антигена, можно, например, получить путем:

- a) иммортализации лимфоцитов, полученных из периферической крови животного, ранее иммунизированного определенным антигеном, с помощью иммортализованной клетки и предпочтительно клеток миеломы с целью образования гибридомы,
- b) культивирования полученных иммортализованных клеток (гибридомы) и выделения клеток, продуцирующих антитела, имеющие желаемую специфичность.

В альтернативном варианте использование клетки гибридомы не требуется. Антитела, способные связываться с антигенами-мишенями, как описано в настоящем документе, могут быть выделены из подходящей библиотеки антител путем стандартной практики, например, используя технологии фагового дисплея, дрожжевого дисплея, рибосомного дисплея или дисплея на клетках млекопитающих, известные в данной области техники. Соответственно, моноклональные антитела могут быть получены, например, в результате процесса, включающего следующие этапы:

- a) клонирование в векторы, особенно в фаги и, в частности, в нитчатые бактериофаги, последовательности ДНК или кДНК, полученные из лимфоцитов, особенно лимфоцитов периферической крови животного (предпочтительно предварительно иммунизированных определенными антигенами),
- b) трансформация прокариотических клеток указанными выше векторами в условиях, позволяющих продуцировать антитела,

- c) селекция антител путем их отбора по аффинности к антигену,
- d) выделение антител, имеющих желаемую специфичность.

Полинуклеотиды и векторы экспрессии

Также предлагаются полинуклеотиды, кодирующие антитело анти-V δ 1, или его фрагменты для применения в способах по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления антитело анти-V δ 1 или его фрагмент кодируются полинуклеотидом, который содержит или состоит из последовательности имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 99-110. В одном варианте осуществления антитело анти-V δ 1 или его фрагмент кодируются вектором экспрессии, который содержит область VH из SEQ ID NO: 99-110. В другом варианте осуществления антитело анти-V δ 1 или его фрагмент кодируются вектором экспрессии, который содержит область VL из SEQ ID NO: 99-110. В дополнительном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из SEQ ID NO: 99-110. В дополнительном варианте осуществления предлагается кДНК, содержащая указанный полинуклеотид.

В одном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 99-110. В одном варианте осуществления вектор экспрессии содержит область VH из SEQ ID NO: 99-110. В другом варианте осуществления вектор экспрессии содержит область VL из SEQ ID NO: 99-110. В дополнительном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из SEQ ID NO: 99-110. В дополнительном аспекте предлагается кДНК, содержащая указанный полинуклеотид.

В одном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 99-101 или 105-108. В одном варианте осуществления вектор экспрессии содержит область VH из SEQ ID NO: 99-101 или 105-108. В другом варианте осуществления вектор экспрессии содержит область VL из SEQ ID NO: 99-101 или 105-108. В дополнительном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из SEQ ID NO: 99-101 или 105-108. В дополнительном аспекте предлагается кДНК, содержащая указанный полинуклеотид.

В одном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 99-101. В одном варианте осуществления вектор экспрессии содержит область VH из SEQ ID NO: 99-101. В другом варианте осуществления вектор экспрессии содержит область VL из SEQ ID NO: 99-101. В

дополнительном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из SEQ ID NO: 99-101. В дополнительном аспекте предлагается кДНК, содержащая указанный полинуклеотид.

В одном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из частей SEQ ID NO: 99-110, которая кодирует CDR1, CDR2 и/или CDR3 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина. В одном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из частей SEQ ID NO: 99-101 или 105-108, которая кодирует CDR1, CDR2 и/или CDR3 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина. В одном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из частей SEQ ID NO: 99-101, которая кодирует CDR1, CDR2 и/или CDR3 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина.

В одном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из частей SEQ ID NO: 99-110, которая кодирует FR1, FR2, FR3 и/или FR4 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина. В одном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из частей SEQ ID NO: 99-101 или 105-108, которая кодирует FR1, FR2, FR3 и/или FR4 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина. В одном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из частей SEQ ID NO: 99-101, которая кодирует FR1, FR2, FR3 и/или FR4 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина.

Полинуклеотиды и векторы экспрессии по настоящему изобретению также могут быть описаны в отношении кодируемой аминокислотной последовательности. Таким образом, в одном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 62-85. В одном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из

последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 62-73. В другом варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 74-85.

Для экспрессии антител или их фрагментов полинуклеотиды, кодирующие частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, как описано в данном документе, вставляют в векторы экспрессии таким образом, чтобы гены были оперативно связаны с последовательностями контроля транскрипции и трансляции. Следовательно, в одном варианте осуществления вектор экспрессии содержит область VH из SEQ ID NO: 99-110, например, SEQ ID NO: 99, 100, 101, 105, 106, 107 или 108. В другом варианте осуществления вектор экспрессии содержит область VL из SEQ ID NO: 99-110, например, SEQ ID NO: 99, 100, 101, 105, 106, 107 или 108.

Следует понимать, что нуклеотидные последовательности, описанные в данном документе, содержат дополнительные последовательности, кодирующие аминокислотные остатки, чтобы облегчить трансляцию, очистку и обнаружение, однако могут использоваться альтернативные последовательности в зависимости от используемой системы экспрессии. Например, начальные (5'-конец) девять нуклеотидов SEQ ID NO: 99-110 и последние (3'-конец) 36 нуклеотидов SEQ ID NO: 99-100, 102-103, 105-110 или последние (3'-конец) 39 нуклеотидов SEQ ID NO: 101 и 104 являются необязательными последовательностями. Эти необязательные последовательности могут быть удалены, модифицированы или заменены, если будут приняты альтернативные стратегии дизайна, трансляции, очистки или обнаружения.

Мутации могут быть внесены в ДНК или кДНК, которые кодируют полипептиды, являющиеся молчащими в отношении аминокислотной последовательности полипептида, однако которые обеспечивают предпочтительные кодоны для трансляции в конкретном хозяине. Предпочтительные кодоны для трансляции нуклеиновой кислоты в, например, *E. coli* и *S. cerevisiae*, а также у млекопитающего, в частности, человека, являются известными.

Мутации полипептидов могут достигаться, например, путем замен, добавлений или делеций в нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид. Замены, добавления или делеции в нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид, могут быть введены многими способами, включая, например, ПЦР сниженной точности, перетасовку, олигонуклеотид-направленный мутагенез, сборочную ПЦР, ПЦР-мутагенез, мутагенез *in vivo*, каскадный мутагенез, рекурсивный множественный мутагенез, экспоненциальный множественный мутагенез, сайт-специфический мутагенез, повторную сборку генов, синтез искусственных генов, насыщающий мутагенез участка гена (Gene Site Saturation Mutagenesis - GSSM), искусственную перестройку с лигированием (synthetic ligation reassembly - SLR) или комбинацию этих способов. Модификации, добавления или делеции в нуклеиновой кислоте также могут быть введены способом, включающим рекомбинацию, рекомбинацию возвратной последовательности, мутагенез

модифицированной фосфоротиоатом ДНК, мутагенез на урацил-содержащей матрице, мутагенез с применением дуплексной ДНК с гэпом, точечный мутагенез с исправлением ошибок спаривания, мутагенез штамма-хозяина с дефицитом репарации, химический мутагенез, радиогенный мутагенез, делеционный мутагенез, мутагенез на основе рестрикционной селекции, мутагенез на основе рестрикционной очистки, множественный мутагенез, создание мультимеров химерных нуклеиновых кислот и их комбинации.

В частности, можно использовать синтез искусственных генов. Ген, кодирующий полипептид, описанный в данном документе, может быть получен синтетическим путем, например, при помощи твердофазного синтеза ДНК. Целые гены могут быть синтезированы *de novo* без необходимости в предшественнике ДНК-матрицы. Для получения желаемого олигонуклеотида структурные звенья последовательно связывают с растущей олигонуклеотидной цепью в порядке, требуемом последовательностью продукта. По завершении сборки цепи продукт высвобождают из твердой фазы в раствор, снимают защиту и собирают. Продукты могут быть выделены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для получения желаемых олигонуклеотидов высокой чистоты.

Векторы экспрессии включают в себя, например, плазмиды, ретровирусы, космиды, дрожжевые искусственные хромосомы (YAC) и эписомы, полученные из вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ). Полинуклеотид лигируется в вектор таким образом, чтобы транскрипционные и трансляционные регуляторные последовательности в векторе выполняли свою предусмотренную функцию регуляции транскрипции и трансляции полинуклеотида. Последовательности экспрессии и/или контроля могут включать в себя промоторы, энхансеры, терминаторы транскрипции, стартовый кодон (т. е. ATG), расположенный 5' к кодирующей последовательности, сигналы сплайсинга для интронов и стоп-кодоны. Вектор экспрессии и последовательности регуляции экспрессии выбирают так, чтобы они были совместимыми с используемой клеткой-хозяином экспрессии. SEQ ID NO: 99-110 содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие одноцепочечные переменные фрагменты по настоящему изобретению, содержащие область VH и область VL, соединенные синтетическим линкером (например, кодирующие SEQ ID NO: 98). Следует понимать, что полинуклеотиды или векторы экспрессии по настоящему изобретению могут содержать область VH, область VL или и ту, и другую (необязательно включая линкер). Таким образом, полинуклеотиды, кодирующие области VH и VL, могут быть вставлены в отдельные векторы, в качестве альтернативны, последовательности, кодирующие обе области, вставляют в один и тот же вектор экспрессии. Полинуклеотид(-ы) вставляют в вектор экспрессии стандартными способами (*например*, лигированием комплементарных сайтов рестрикции на полинуклеотиде и векторе или лигированием тупого конца в случае отсутствия сайтов рестрикции).

Удобным является вектор, который кодирует функционально полную последовательность CH или CL иммуноглобулина человека, с соответствующими сайтами рестрикции, сконструированными таким образом, чтобы можно было легко вставить и

экспрессировать любую последовательность VH или VL, как описано в данном документе. Вектор экспрессии может также кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию антитела (или его фрагмента) из клетки-хозяина. Полинуклеотид может быть клонирован в вектор так, чтобы сигнальный пептид в рамке был связан с аминоконцом антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (*т. е.* сигнальный пептид из белка, не являющегося иммуноглобулином).

Клетка-хозяин может содержать первый вектор, кодирующий легкую цепь антитела или его фрагмента, и второй вектор, кодирующий тяжелую цепь антитела или его фрагмента. В альтернативном варианте обе тяжелая и легкая цепи кодируются на одном и том же векторе экспрессии, введенном в клетку-хозяина. В одном варианте осуществления полинуклеотид или вектор экспрессии кодирует мембранный якорь или трансмембранный домен, слитый с антителом или его фрагментом, причем антитело или его фрагмент присутствуют на внеклеточной поверхности клетки-хозяина.

Для введения полинуклеотидов в клетку-хозяина трансформацию можно проводить любым известным способом. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области техники и включают в себя опосредованную декстраном трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, опосредованную полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсулирование полинуклеотида(-ов) в липосомы, биолистическую инъекцию и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты могут быть введены в клетки млекопитающих посредством вирусных векторов.

Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области техники и включают в себя многие иммортализованные клеточные линии, доступные из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Эти клетки включают, помимо прочего, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки NSO, SP2, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (ВНК), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (*например*, Нер G2), клетки A549, клетки 3T3 и ряд других клеточных линий. Клетки-хозяева млекопитающих включают клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяны, свиньи, козы, крупного рогатого скота, лошади и хомяка. Особенно предпочтительные клеточные линии выбирают путем определения того, какие клеточные линии обладают высокими уровнями экспрессии. Другими клеточными линиями, которые можно использовать, являются клеточные линии насекомых, такие как клетки Sf9, клетки земноводного, бактериальные клетки, клетки растения и клетки гриба. Антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как фрагменты scFv и Fv, могут быть выделены и экспрессированы в *E. Coli* с помощью способов, известных в данной области техники.

Антитела получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для обеспечения возможности экспрессии антитела в клетках-

хозяевах или более предпочтительно секретию антитела в культуральную среду, в которой выращивают клетки-хозяева. Антитела могут быть выделены из культуральной среды с использованием стандартных методов очистки белка.

Антитела (или фрагменты) по изобретению можно получать и подвергать манипуляции с помощью методов, описанных например, в Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2012) 4th Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридомной технологии путем слияния В-клетки, продуцирующей специфические антитела, с клеткой миеломы (В-клеточный рак), выбранной по способности расти в культуре тканей и отсутствию синтеза цепей антител.

Моноклональное антитело, направленное против определенного антигена, можно, например, получить путем:

- а) иммортализации лимфоцитов, полученных из периферической крови животного, ранее иммунизированного определенным антигеном, с помощью иммортализованной клетки и предпочтительно клеток миеломы с целью образования гибридомы,
- б) культивирования полученных иммортализованных клеток (гибридомы) и выделения клеток, продуцирующих антитела, имеющие желаемую специфичность.

В альтернативном варианте использование клетки гибридомы не требуется. Антитела, способные связываться с антигенами-мишенями, как описано в настоящем документе, могут быть выделены из подходящей библиотеки антител путем стандартной практики, например, используя технологии фагового дисплея, дрожжевого дисплея, рибосомного дисплея или дисплея на клетках млекопитающих, известные в данной области техники. Соответственно, моноклональные антитела могут быть получены, например, в результате процесса, включающего следующие этапы:

- а) клонирование в векторы, особенно в фаги и, в частности, в нитчатые бактериофаги, последовательности ДНК или кДНК, полученные из лимфоцитов, особенно лимфоцитов периферической крови животного (предпочтительно предварительно иммунизированных определенными антигенами),
- б) трансформация прокариотических клеток указанными выше векторами в условиях, позволяющих продуцировать антитела,
- с) селекция антител путем их отбора по аффинности к антигену,
- д) выделение антител, имеющих желаемую специфичность.

Способы лечения

Композиции по настоящему изобретению находят особое применение в клинической практике. Помимо противораковой и нормальной клеточной активности трех типов иммунных клеток, присутствующих в композиции, НК-клетки также очень эффективны для борьбы с инфекционными заболеваниями, вызванными вирусами, бактериями или грибами. Известно, что V δ 1 Т-клетки играют важную роль в распознавании и защите от реактивации CMV, что является серьезной проблемой у пациентов с ослабленным иммунитетом, таких как пациенты после трансплантации или

предварительно пролеченные пациенты с раком. CMV-активированные V δ 1 T-клетки фактически значительно снижает риск вторичных злокачественных новообразований у пациентов, получающих широкий спектр иммунодепрессантов после трансплантации.

V δ 2 T-клетки уникальны тем, что они распознают с очень высокой аффинностью промежуточные продукты немевалонатного пути, а именно НМВРР, который используется исключительно прокариотами и некоторыми эукариотами. Эти клетки имеют фундаментальное значение для распознавания и борьбы с микобактериальными инфекциями и могут составлять более 50% всех T-клеток в крови пациентов с активными инфекциями. Клетки V δ 2 также распознают простейшие и вносят большой вклад в иммунный ответ против малярии.

Следовательно, композиция, описанная в данном документе, должна обеспечивать широкую защиту от лечения рака или осложнений, вызванных трансплантацией, таких как реактивация вируса и бактериальные инфекции, которые могут способствовать смертности при иммунотерапии. Защита, которую не смог бы обеспечить один тип клеток за раз.

По тем же причинам композиция также привлекательна для лечения инфекционных заболеваний. Фактически, NK-клетки были испытаны для лечения коронавируса (COVID-19). Следовательно, композицию можно применять для лечения COVID, CMV, HIV, малярии и любой микобактериальной инфекции.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предлагается композиция, как определено в данном документе, для применения в терапии.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предлагается композиция, как определено в данном документе, для применения в способе лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

Популяции клеток и композиции, полученные способами по настоящему изобретению, также можно применять в терапии. Таким образом, в соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предлагается клеточная популяция, полученная описанным в данном документе способом, для применения в качестве лекарственного средства. Ссылки в данном документе на клеточную популяцию «для применения» в качестве лекарственного средства или в терапии ограничиваются введением клеточной популяции субъекту.

В одном варианте осуществления клеточная популяция предназначена для лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания. В дополнительном варианте осуществления клеточная популяция предназначена для лечения рака.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая клеточную популяцию, как определено в данном документе, для применения в качестве лекарственного средства. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая клеточную популяцию, предназначена для лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания. В дополнительном варианте осуществления фармацевтическая композиция,

содержащая клеточную популяцию, предназначена для лечения рака.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предлагается способ модуляции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, как определено в данном документе.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предлагается способ лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей НК-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки, при этом по меньшей мере 40% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, экспрессируют CD56. Следует понимать, что варианты осуществления, описанные для композиций выше, могут в равной степени применяться к этому аспекту изобретения.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предлагается способ лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей клетки, при этом по меньшей мере 90% клеток состоят из НК-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток, и при этом по меньшей мере 10% клеток представляют собой V δ 1 Т-клетки, по меньшей мере 5% клеток представляют собой V δ 2 Т-клетки, и по меньшей мере 30% клеток представляют собой НК-клетки.

В соответствии с дополнительными аспектами изобретения предлагается применение клеточной популяции, как определено в данном документе, для изготовления лекарственного средства, например, для лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

Адоптивная Т-клеточная терапия

Композиции, полученные способами по настоящему изобретению, можно применять в качестве лекарственного средства, например, для адоптивной Т-клеточной терапии. Это включает в себя перенос иммунных клеток в организм пациента. Терапия может быть аутологичной, *то есть* иммунные клетки могут быть перенесены обратно тому же пациенту, от которого они были получены, или терапия может быть аллогенной, *то есть* иммунные клетки от одного человека могут быть перенесены другому пациенту. В случаях, связанных с аллогенным переносом, композиция может по существу не содержать $\alpha\beta$ Т-клеток. Например, $\alpha\beta$ Т-клетки могут быть обеднены из композиции, *например*, после размножения, с использованием любых подходящих средств, известных в данной области техники (*например*, путем негативной селекции, *например*, с использованием магнитных гранул). Способ лечения может включать: предоставление образца, полученного от донора; культивирование иммунных клеток, полученных из образца, как описано в данном документе, *например*, для получения размноженной популяции; и введение культивированных иммунных клеток индивидууму-реципиенту.

Пациент или субъект, подлежащий лечению, предпочтительно представляет собой пациента-человека с раком (*например*, пациента-человека с раком, у которого лечат

солидную опухоль) или пациента, инфицированного вирусом (*например*, пациента, инфицированного CMV или HIV). В некоторых случаях пациент имеет и/или у него лечат солидную опухоль. Поскольку они обычно находятся в негематопозитических тканях, тканевые V δ 1 T-клетки также с большей вероятностью будут размещаться и удерживаться в опухолевой массе, чем их системные аналоги, присущие крови, и адаптивный перенос этих клеток, вероятно, будет быть более эффективными в отношении солидных опухолей и потенциально других иммунопатологий, ассоциированных с негематопозитическими тканями.

Поскольку $\gamma\delta$ T-клетки и NK-клетки не ограничены по МНС, они не распознают хозяина, в которого они перенесены, как чужеродного, что означает, что они с меньшей вероятностью вызывают реакцию «трансплантат против хозяина». Это означает, что их можно использовать «с полки» и передавать любому реципиенту, *например*, для аллогенной адаптивной T-клеточной терапии.

Неограниченные по МНС лимфоциты, полученные описанными в данном документе способами, могут экспрессировать NKG2D и отвечать на лиганд NKG2D (*например*, МІСА), который сильно ассоциирован со злокачественными опухолями. Они также могут экспрессировать цитотоксический профиль в отсутствие какой-либо активации и, следовательно, вероятно, эффективны для уничтожения опухолевых клеток.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения индивидуума с опухолью может включать; предоставление образца указанной опухоли, полученного от донора, культивирование неограниченных по МНС лимфоцитов, полученных из образца, как описано выше, и; введение популяции неограниченных по МНС лимфоцитов индивидууму с опухолью.

В некоторых случаях терапевтически эффективное количество неограниченных по МНС лимфоцитов, полученных любым из способов, описанных выше, можно вводить субъекту в терапевтически эффективном количестве (*например*, для лечения рака, *например*, для лечения солидной опухоли). В некоторых случаях терапевтически эффективное количество неограниченных по МНС лимфоцитов составляет менее чем 10×10^{12} клеток на дозу (*например*, менее чем 9×10^{12} клеток на дозу, менее чем 8×10^{12} клеток на дозу, менее чем 7×10^{12} клеток на дозу, менее чем 6×10^{12} клеток на дозу, менее чем 5×10^{12} клеток на дозу, менее чем 4×10^{12} клеток на дозу, менее чем 3×10^{12} клеток на дозу, менее чем 2×10^{12} клеток на дозу, менее чем 1×10^{12} клеток на дозу, менее чем 9×10^{11} клеток на дозу, менее чем 8×10^{11} клеток на дозу, менее чем 7×10^{11} клеток на дозу, менее чем 6×10^{11} клеток на дозу, менее чем 5×10^{11} клеток на дозу, менее чем 4×10^{11} клеток на дозу, менее чем 3×10^{11} клеток на дозу, менее чем 2×10^{11} клеток на дозу, менее чем 1×10^{11} клеток на дозу, менее чем 9×10^{10} клеток на дозу, менее чем $7,5 \times 10^{10}$ клеток на дозу, менее чем 5×10^{10} клеток на дозу, менее чем $2,5 \times 10^{10}$ клеток на дозу, менее чем 1×10^{10} клеток на дозу, менее чем $7,5 \times 10^9$ клеток на дозу, менее чем 5×10^9 клеток на дозу, менее чем $2,5 \times 10^9$ клеток на дозу, менее чем 1×10^9 клеток на дозу, менее чем $7,5 \times 10^8$ клеток на дозу, менее чем 5×10^8 клеток на дозу, менее чем $2,5 \times 10^8$ клеток на дозу, менее чем 1×10^8 клеток на

дозу, менее чем $7,5 \times 10^7$ клеток на дозу, менее чем 5×10^7 клеток на дозу, менее чем $2,5 \times 10^7$ клеток на дозу, менее чем 1×10^7 клеток на дозу, менее чем $7,5 \times 10^6$ клеток на дозу, менее чем 5×10^6 клеток на дозу, менее чем $2,5 \times 10^6$ клеток на дозу, менее чем 1×10^6 клеток на дозу, менее чем $7,5 \times 10^5$ клеток на дозу, менее чем 5×10^5 клеток на дозу, менее чем $2,5 \times 10^5$ клеток на дозу или менее чем 1×10^5 клеток на дозу).

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество неограниченных по МНС лимфоцитов составляет менее чем 10×10^{12} клеток в течение курса лечения (*например*, менее чем 9×10^{12} клеток, менее чем 8×10^{12} клеток, менее чем 7×10^{12} клеток, менее чем 6×10^{12} клеток, менее чем 5×10^{12} клеток, менее чем 4×10^{12} клеток, менее чем 3×10^{12} клеток, менее чем 2×10^{12} клеток, менее чем 1×10^{12} клеток, менее чем 9×10^{11} клеток, менее чем 8×10^{11} клеток, менее чем 7×10^{11} клеток, менее чем 6×10^{11} клеток, менее чем 5×10^{11} клеток, менее чем 4×10^{11} клеток, менее чем 3×10^{11} клеток, менее чем 2×10^{11} клеток, менее чем 1×10^{11} клеток, менее чем 9×10^{10} клеток, менее чем $7,5 \times 10^{10}$ клеток, менее чем 5×10^{10} клеток, менее чем $2,5 \times 10^{10}$ клеток, менее чем 1×10^{10} клеток, менее чем $7,5 \times 10^9$ клеток, менее чем 5×10^9 клеток, менее чем $2,5 \times 10^9$ клеток, менее чем 1×10^9 клеток, менее чем $7,5 \times 10^8$ клеток, менее чем 5×10^8 клеток, менее чем $2,5 \times 10^8$ клеток, менее чем 1×10^8 клеток, менее чем $7,5 \times 10^7$ клеток, менее чем 5×10^7 клеток, менее чем $2,5 \times 10^7$ клеток, менее чем 1×10^7 клеток, менее чем $7,5 \times 10^6$ клеток, менее чем 5×10^6 клеток, менее чем $2,5 \times 10^6$ клеток, менее чем 1×10^6 клеток, менее чем $7,5 \times 10^5$ клеток, менее чем 5×10^5 клеток, менее чем $2,5 \times 10^5$ клеток или менее чем 1×10^5 в течение курса лечения).

В некоторых вариантах осуществления доза неограниченных по МНС лимфоцитов, как описано в данном документе, содержит около 1×10^6 , $1,1 \times 10^6$, 2×10^6 , $3,6 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , $1,8 \times 10^7$, 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , или 5×10^8 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза неограниченных по МНС лимфоцитов содержит до около 1×10^6 , $1,1 \times 10^6$, 2×10^6 , $3,6 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , $1,8 \times 10^7$, 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , или 5×10^8 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза неограниченных по МНС лимфоцитов содержит около $1,1 \times 10^6$ - $1,8 \times 10^7$ клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза неограниченных по МНС лимфоцитов содержит около 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 или 5×10^9 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза неограниченных по МНС лимфоцитов содержит по меньшей мере около 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 или 5×10^9 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза неограниченных по МНС лимфоцитов содержит до около 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 или 5×10^9 клеток/кг.

В одном варианте осуществления субъекту вводят от 10^4 до 10^6 неограниченных по МНС лимфоцитов на кг массы тела субъекта. В одном варианте осуществления субъект получает начальное введение популяции неограниченных по МНС лимфоцитов (*например*, начальное введение от 10^4 до 10^6 неограниченных по МНС лимфоцитов на кг массы тела субъекта, *например*, от 10^4 до 10^5 неограниченных по МНС лимфоцитов на кг массы тела субъекта) и одно или большее количество (*например*, 2, 3, 4 или 5)

последовательных введений неограниченных по МНС лимфоцитов (*например*, одно или большее количество последующих введений от 10^4 до 10^6 неограниченных по МНС лимфоцитов на кг массы тела субъекта, *например*, от 10^4 до 10^5 неограниченных по МНС лимфоцитов на кг массы тела субъекта). В одном варианте осуществления одно или большее количество последующих введений осуществляют менее чем через 15 дней, *например*, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения, *например*, менее чем через 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения. В одном варианте осуществления субъект получает в общей сложности около 10^6 неограниченных по МНС лимфоцитов на кг массы тела субъекта в течение по меньшей мере трех введений популяции неограниченных по МНС лимфоцитов, *например*, субъект получает начальную дозу 1×10^5 неограниченных по МНС лимфоцитов, второе введение 3×10^5 неограниченных по МНС лимфоцитов и третье введение 6×10^5 неограниченных по МНС лимфоцитов, и, *например*, каждое введение осуществляют менее чем через 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения.

В некоторых вариантах осуществления субъекту можно вводить один или большее количество дополнительных терапевтических агентов. Дополнительный терапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из иммунотерапевтического агента, цитотоксического агента, агента, подавляющего рост, агента лучевой терапии, ангиогенного агента или комбинации двух или большего количества из них. Дополнительный терапевтический агент можно вводить одновременно, до или после введения неограниченных по МНС лимфоцитов. Дополнительный терапевтический агент может представлять собой иммунотерапевтический агент, который может действовать на мишень в организме субъекта (*например*, на собственную иммунную систему субъекта) и/или на перенесенные, неограниченные по МНС лимфоциты.

Введение композиций можно осуществлять любым удобным способом. Композиции, описанные в настоящем документе, можно вводить пациенту трансартериально, подкожно, внутрикожно, внутриопухолево, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной инъекции или внутрибрюшинно, *например*, путем внутрикожной или подкожной инъекции. Композиции неограниченных по МНС лимфоцитов можно вводить непосредственно в опухоль, лимфатический узел или в область инфекционного процесса.

Генная инженерия

Неограниченные по МНС лимфоциты, полученные с помощью способа по настоящему изобретению, также могут быть подвергнуты генной инженерии для улучшения терапевтических свойств, например, для терапии Т-клетками с химерными антигенными рецепторами (CAR-T). Это включает в себя получение сконструированных рецепторов (*например*, CAR) для перепрограммирования Т-клеток с новой специфичностью, *например*, специфичностью моноклонального антитела. Сконструированный рецептор может сделать лимфоциты специфичными к злокачественным клеткам и, следовательно, пригодными для иммунотерапии рака.

Например, лимфоциты могут распознавать раковые клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, такой как опухолеассоциированный антиген, который не экспрессируется нормальными соматическими клетками из ткани субъекта. Таким образом, CAR-модифицированные лимфоциты можно применять для адоптивной Т-клеточной терапии, например, у пациентов с раком.

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

ПУНКТЫ

Набор пунктов, определяющих настоящее изобретение и его предпочтительные аспекты, является следующим:

1. Выделенная композиция, содержащая клетки естественные киллеры (NK) и $\gamma\delta$ Т-клетки, при этом по меньшей мере 40% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой CD56^{bright}.

2. Выделенная композиция, содержащая NK-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки, при этом по меньшей мере 50% NK-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой CD56^{bright}.

3. Выделенная композиция, содержащая NK-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки, при этом по меньшей мере 50% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, экспрессируют CD56.

4. Выделенная композиция по любому из пунктов 1-3, отличающаяся тем, что по меньшей мере 80% клеток, присутствующих в композиции, составляют NK-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки.

5. Выделенная композиция по любому из пунктов 1-4, отличающаяся тем, что по меньшей мере 90% клеток, присутствующих в композиции, состоят из NK-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток.

6. Выделенная композиция по любому из пунктов 1-5, отличающаяся тем, что по меньшей мере 20% клеток, присутствующих в композиции, представляют собой $\gamma\delta$ Т-клетки.

7. Выделенная композиция по любому из пунктов 1-6, отличающаяся тем, что по меньшей мере 30% клеток, присутствующих в композиции, представляют собой $\gamma\delta$ Т-клетки.

8. Выделенная композиция по любому из пунктов 1-7, отличающаяся тем, что менее чем 80% клеток, присутствующих в композиции, представляют собой $\gamma\delta$ Т-клетки.

9. Выделенная композиция по любому из пунктов 1-8, отличающаяся тем, что $\gamma\delta$ Т-клетки содержат V δ 1 Т-клетки и V δ 2 Т-клетки.

10. Выделенная композиция по любому из пунктов 1-9, отличающаяся тем, что по меньшей мере 20% клеток, присутствующих в композиции, представляют собой NK-клетки.

11. Выделенная композиция по любому из пунктов 1-10, отличающаяся тем, что по меньшей мере 30% клеток, присутствующих в композиции, представляют собой NK-клетки.

12. Выделенная композиция, содержащая клетки, при этом по меньшей мере 90% клеток состоят из NK-клеток и $\gamma\delta$ T-клеток, и при этом по меньшей мере 10% клеток представляют собой V δ 1 T-клетки, по меньшей мере 5% клеток представляют собой V δ 2 T-клетки, и по меньшей мере 30% клеток представляют собой NK-клетки.

13. Выделенная композиция по пункту 12, отличающаяся тем, что по меньшей мере 40% $\gamma\delta$ T-клеток, присутствующих в композиции, экспрессируют CD56.

14. Выделенная композиция по пункту 12 или пункту 13, отличающаяся тем, что менее чем 80% клеток, присутствующих в композиции, представляют собой $\gamma\delta$ T-клетки.

15. Выделенная композиция по любому из пунктов 1-14, отличающаяся тем, что $\gamma\delta$ T-клетки содержат V δ 1 T-клетки, и по меньшей мере 15% указанных V δ 1 T-клеток экспрессируют NKp30.

16. Выделенная композиция по любому из пунктов 1-15, отличающаяся тем, что $\gamma\delta$ T-клетки содержат V δ 1 T-клетки, и менее чем 50% указанных V δ 1 T-клеток экспрессируют CD27.

17. Выделенная композиция по любому из пунктов 1-16, отличающаяся тем, что указанная выделенная композиция содержит сконструированные NK-клетки и $\gamma\delta$ T-клетки.

18. Выделенная композиция по пункту 17, отличающаяся тем, что сконструированные NK-клетки и $\gamma\delta$ T-клетки экспрессируют химерный антигенный рецептор.

19. Выделенная композиция по любому из пунктов 1-18 для применения в терапии.

20. Выделенная композиция по любому из пунктов 1-18 для применения в способе лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

21. Способ размножения неограниченных по МНС не- $\gamma\delta$ + лимфоцитов, включающий стимуляцию смешанной клеточной популяции, содержащей $\gamma\delta$ T-клетки и NK-клетки, с использованием антитела против вариабельной дельта-цепи 1 TCR (анти-V δ 1) или его фрагмента, в присутствии интерлейкина-15 (IL-15) и в отсутствие интерлейкина-4 (IL-4), и культивирование смешанной клеточной популяции.

22. Способ по п. 21, который включает культивирование смешанной клеточной популяции в течение по меньшей мере 7 дней, например, по меньшей мере 14 дней.

23. Способ по любому из пунктов 21 или 22, отличающийся тем, что по меньшей мере 50% размноженных неограниченных по МНС не- $\gamma\delta$ + лимфоцитов, представляют собой CD56^{bright}.

24. Способ приготовления композиции, содержащей клеточную популяцию, обогащенную неограниченными по МНС лимфоцитами, включающий:

(1) культивирование образца, полученного от субъекта, в присутствии:

- (i) антитела анти-V δ 1 или его фрагмента; и
- (ii) IL-15, в отсутствие интерлейкина-4 (IL-4),

с первого дня указанного культивирования; и

(2) выделение клеточной популяции, культивированной из образца.

25. Способ по пункту 24, отличающийся тем, что этап (1) указанного способа включает культивирование образца в течение по меньшей мере 7 дней, например, по меньшей мере 14 дней.

26. Способ по пункту 24 или пункту 25, отличающийся тем, что неограниченные по МНС лимфоциты содержат NK-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки.

27. Способ по любому из пунктов 24-26, отличающийся тем, что по меньшей мере 70% неограниченных по МНС лимфоцитов, присутствующих в клеточной популяции, выделенной на этапе (2), экспрессируют CD56.

28. Способ по любому из пунктов 24-27, отличающийся тем, что клеточная популяция, выделенная на этапе (2), содержит $\gamma\delta$ Т-клетки, и по меньшей мере 40% $\gamma\delta$ Т-клеток экспрессируют CD56.

29. Способ по любому из пунктов 24-28, отличающийся тем, что менее чем 80% клеточной популяции, выделенной на этапе (2), составляют $\gamma\delta$ Т-клетки.

30. Способ по любому из пунктов 24-29, отличающийся тем, что по меньшей мере 90% клеточной популяции, выделенной на этапе (2), состоит из NK-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток, и при этом по меньшей мере 10% клеток представляют собой V δ 1 Т-клетки, по меньшей мере 5% клеток представляют собой V δ 2 Т-клетки, и по меньшей мере 30% клеток представляют собой NK-клетки.

31. Способ по любому из пунктов 21-30, отличающийся тем, что активирующее антитело анти-V δ 1 или его фрагмент связывается с эпитопом варибельной дельта-цепи 1 (V δ 1) $\gamma\delta$ Т-клеточного рецептора (TCR), содержащего один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей:

(i) 3-20 SEQ ID NO: 1; и/или

(ii) 37-77 SEQ ID NO: 1.

32. Способ по пункту 31, отличающийся тем, что эпитоп содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1.

33. Способ по любому из пунктов 21-32, отличающийся тем, что антитело анти-V δ 1 или его фрагмент содержит один или большее количество из следующих элементов:

CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-25;

CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ: A1-A12 (из Таблицы 2); и/или

CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-61.

34. Способ по любому из пунктов 21-33, отличающийся тем, что антитело анти-V δ 1 или его фрагмент содержат область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73.

35. Способ по любому из пунктов 21-34, отличающийся тем, что антитело анти-V δ 1 или его фрагмент содержат область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85.

36. Способ по любому из пунктов 21-35, отличающийся тем, что антитело анти-V δ 1 или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 86-97.

37. Способ по любому из пунктов 24-36, отличающийся тем, что образец представляет собой гематопозитический образец или его фракцию.

38. Способ по пункту 37, отличающийся тем, что указанный гематопозитический образец выбирают из периферической крови, пуповинной крови, лимфоидной ткани, тимуса, костного мозга, ткани лимфатических узлов или их фракций.

39. Способ по пункту 37 или пункту 38, отличающийся тем, что указанный гематопозитический образец состоит из моноклеарных клеток низкой плотности (LDMC) или моноклеарных клеток периферической крови (PBMC).

40. Способ по любому из пунктов 24-39, отличающийся тем, что указанный образец получают из ткани человека или животного, отличного от человека.

41. Способ по любому из пунктов 24-40, отличающийся тем, что образец обогащают T-клетками перед указанным культивированием.

42. Способ по любому из пунктов 24-41, отличающийся тем, что образец обедняют на $\alpha\beta$ T-клетки перед указанным культивированием.

43. Способ по любому из пунктов 24-42, отличающийся тем, что указанное культивирование проводят в среде, содержащей 2,5% плазмы.

44. Композиция, полученная способом по любому из пунктов 21-43.

45. Композиция по пункту 44 для применения в терапии.

46. Композиция по пункту 44 для применения в способе лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

47. Способ лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей NK-клетки и $\gamma\delta$ -T-клетки, при этом по меньшей мере 40% $\gamma\delta$ T-клеток, присутствующих в композиции, экспрессируют CD56.

48. Способ лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей клетки, при этом по меньшей мере 90% клеток состоят из NK-клеток и $\gamma\delta$ T-клеток, и при этом по меньшей мере 10% клеток представляют собой V δ 1 T-клетки, по меньшей мере 5% клеток представляют собой V δ 2 T-клетки, и по меньшей мере 30% клеток представляют собой NK-клетки.

49. Способ по любому из пунктов 24-43, отличающийся тем, что этап (1) указанного способа включает культивирование образца в течение по меньшей мере 12 дней, например, в течение около 12 дней.

50. Клеточная популяция, обогащенная неограниченными по МНС лимфоцитами, полученная способом по любому из пунктов 21-43 или по пункту 49.

51. Клеточная популяция по пункту 50 для применения в терапии.

52. Клеточная популяция по пункту 50 для применения в способе лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

53. Композиция, содержащая клеточную популяцию, которую можно получить способом по любому из пунктов 21-43.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидны из описания, предложенного в данном документе. Однако следует понимать, что описание и конкретные примеры, указывающие на предпочтительные варианты осуществления изобретения, представлены только с целью иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации станут очевидными для специалистов в данной области техники. Далее изобретение будет описано с помощью следующих неограничивающих примеров.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Материалы и способы

Размножение клеток

Клетки размножали в вариантных условиях, описанных ниже и как показано на **Фигуре 1**.

Вариант 1: $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ Т-клетки получали из мононуклеарных клеток периферической крови, обедненных на $\alpha\beta$ -TCR⁺, с использованием культуральной среды без сыворотки (CTS OpTmizer, Thermo Fisher) с добавлением 2,5% объединенной аллогенной плазмы (Octaplas, Octapharma) и GlutaMax (ThermoFisher). Выделенные клетки высевали в присутствии рекомбинантного IL-4, IL-1 β , IL-21 и IFN γ и растворимого моноклонального антитела анти-V $\delta 1$ (1252_P01_C08 - клон антитела собственного изготовления). После установки, культуры инкубировали при 37 °C и 5% CO₂ во влажном инкубаторе. В размножающиеся клетки повторно добавляли свежий IL-15, IL-21 и антитело анти-V $\delta 1$. Клетки собирали через 11-14 дней культивирования и криоконсервировали в виде смешанной популяции в Cryostor5 (STEMCELL Technologies).

Вариант 2: CD56⁺ лимфоциты получали из мононуклеарных клеток периферической крови, обедненных на $\alpha\beta$ -TCR⁺, с использованием культуральной среды без сыворотки (CTS OpTmizer, Thermo Fisher) с добавлением 2,5% объединенной аллогенной плазмы (Octaplas, Octapharma) и GlutaMax (ThermoFisher). Выделенные клетки выращивали в присутствии рекомбинантного IL-15 и растворимого моноклонального антитела анти-V $\delta 1$ (клон антитела собственного изготовления). После установки, культуры инкубировали при 37 °C и 5% CO₂ во влажном инкубаторе. В размножающиеся клетки регулярно добавляли свежий IL-15 и антитело анти-V $\delta 1$. Клетки собирали через 11-14 дней культивирования и криоконсервировали в виде смешанной популяции в Cryostor5 (STEMCELL Technologies).

Вариант 3: $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ Т-клетки получали из мононуклеарных клеток периферической крови, обедненных на $\alpha\beta$ -TCR⁺, как описано для варианта 1. Однако в

дополнение к рекомбинантным IL-4, IL-1 β , IL-21 и IFN γ и растворимому моноклональному антителу анти-V δ 1 (клон антитела собственного изготовления), клетки также высевали в присутствии рекомбинантного IL-15. После установки, культуры инкубировали при 37 °C и 5% CO₂ во влажном инкубаторе. В размножающиеся клетки повторно добавляли свежий IL-15, IL-21 и антитело анти-V δ 1. Клетки собирали через 11-14 дней культивирования и криоконсервировали в виде смешанной популяции в Cryostor5 (STEMCELL Technologies).

Проточная цитометрия для оценки чистоты клеток и фенотипа поверхности

Имунофенотипирование проводили на проточном цитометре MACSQuant16. Мертвые клетки исключали с помощью фиксируемого красителя для определения жизнеспособности eFluor 780. Клетки анализировали на экспрессию поверхностных маркеров с использованием FITC анти-CD45, PE анти-TCR α/β , APC анти-TCR γ/δ , VioBlue анти-TCR V δ 1, FITC анти-CD27, PE анти-NKp30, PE-Vio770 анти-NKG2D, PE анти-CD19, PerCP-Vio770 анти-CD14, PE-Vio770 анти-CD56, APC анти-CD3, PE анти-TCR V δ 3 и PE-Vio770 анти-TCR V δ 2 антител, доступных от Miltenyi and BioLegend.

Трансдукция лентивирусом, кодирующим химерные антигенные рецепторы CD19

Размножающиеся клетки из вариантов 1 и 2 трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими химерные антигенные рецепторы, нацеленные на CD19, в 24-луночных планшетах, обработанных нетканевой культурой, покрытых RetroNectin (20 мкг/мл). Вирусный вектор смешивали с иммунными клетками, разведенными в CTS OptiMizer (с добавлением IL-15 и антитела анти-V δ 1), и спинокулировали при 800 \times g в течение 45 минут при 32 °C. Эффективность трансдукции определяли с помощью проточной цитометрии через четыре дня после трансдукции.

Оттаивание криоконсервированных культур

Замороженные криофлаконы оттаивали на водяной бане при 37°C и добавляли в предварительно подогретую OptiMizer+2,5% аллогенную плазму. Клетки центрифугировали при 300g в течение 7 минут, подсчитывали и оценивали жизнеспособность, а затем ресуспендировали в концентрации 2 \times 10⁶ клеток на мл для фенотипирования и последующих анализов.

Анализ цитотоксичности

Размноженные клетки из вариантов 1-3 культивировали совместно с клетками-мишенями опухоли NALM-6, меченными CellTrace Violet, в 96-луночном круглодонном планшете при различных соотношениях эффектора и мишени. Контроль (Контр) тестировал только клетки-мишени, без присутствия эффекторных клеток. Через 20 часов к культурам добавляли краситель SYTOX AADVANCED Dead Cell Stain перед анализом на проточном цитометре MACSQuant 10. С помощью окрашивания CellTrace Violet (CTV) идентифицировали опухолевые клетки NALM-6, а посредством положительной реакции на SYTOX отличали мертвые клетки от жизнеспособных.

ПРИМЕР 2. Сравнение вариантов культивирования клеток

Клеточные популяции размножали по одному из вариантов 1-3, описанных в

Примере 1 и как продемонстрировано на **Фигуре 1**. Затем размноженные клеточные популяции анализировали и сравнивали.

Выход клеток при сборе продемонстрирован на **Фигуре 2**. Вариант 2 обеспечивает выход клеток, эквивалентный варианту 1. Вариант 3 увеличивает выход клеток по сравнению с вариантом 1.

Была проанализирована композиция иммунных клеток. Варианты 1 и 3 обеспечивают получение популяции, сильно обогащенную V δ 1 Т-клетками, однако вариант 2 обеспечивает получение смешанной популяции, состоящую из клеток V δ 1+, V δ 2+ и НК. Следовательно, вариант 2 неожиданно продемонстрировал одновременное обогащение всех неограниченных по МНС лимфоцитов. Результаты приведены на **Фигуре 3**. Индивидуальная клеточная композиция от трех доноров, культивированных по варианту 2, обобщена в **Таблице 4**.

Таблица 4. Клеточная композиция, полученная от 3 доноров по варианту 2

Донор #	НК-клетки (%)	$\gamma\delta$ Т-клетки (%)	V δ 1+ Т-клетки (%)	V δ 2+ Т-клетки (%)	V δ 3+ Т-клетки (%)	V δ 1- V δ 2- V δ 3- $\gamma\delta$ Т-клетки (%)
LK012R2-01	38,3	54,5	19,1	34,7	0,3	0,1
LK033R1-01	64,1	31,02	13,07	15,34	2,2	0,23
LK021R2-01	36	58,8	51,27	7,06	0,13	0,27

Был проанализирован поверхностный фенотип V δ 1 Т-клеток. V δ 1+ Т-клетки, полученные в вариантах 1 и 3, являются положительными по CD27 и NKG2D. V δ 1 Т-клетки, полученные по варианту 2, экспрессируют меньше CD27, но больше NKp30, по сравнению с вариантами 1 и 3, что согласуется с эффекторным фенотипом. Результаты приведены на **Фигуре 4**.

ПРИМЕР 3. Сравнение антител анти-V δ 1

Клеточные популяции размножали по варианту 2, но в присутствии разных антител. Результаты приведены на **Фигуре 5**. Использование двух отдельных клонов антител анти-V δ 1 собственного изготовления (1252_P01_C08 и 1245_P01_B07) в условиях варианта 2 обеспечивает обогащение НК-клеток, а также $\gamma\delta$ -клеток. Это наблюдается по сравнению с антителом анти-CD3 (ОКТ-3, BioLegend), которое эффективно обогащает только $\gamma\delta$ Т-клетки.

ПРИМЕР 4. Цитотоксичность клеточной композиции

Клеточные композиции, полученные по вариантах 1-3, тестировали в анализе цитотоксичности, как описано в Примере 1, с использованием низкого отношения эффектор:мишень 1:1. Вариант 2 продемонстрировал наибольшую цитотоксическую активность, хотя варианты 1 и 3 заметно усиливали цитотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам NALM-6 (**Фигура 6А**). Усиленное уничтожение клеток коррелирует с экспрессией CD56 между вариантами (**Фигура 6В**).

Поверхностную экспрессию CD56 также определяли посредством анализа

интенсивности окрашивания с помощью проточной цитометрии. Вариант 2 сильно увеличивал интенсивность экспрессии CD56 на клетках V δ 1 и V δ 2 по сравнению с их собственным уровнем РМВС (**Фигура 7**). Кроме того, повышенное количество CD56-bright клеток определялось среди популяций как $\gamma\delta$ -, так и NK-клеток, полученных из пула по варианту 2, по сравнению с исходным материалом первичных РМВС (**Фигура 8**).

ПРИМЕР 5. Функциональность клеток после хранения

Также исследовали функциональность клеток после этапа хранения путем замораживания и последующего оттаивания. Часть клеток, культивируемых по варианту 1 и 2, удаляли на 11-14 сутки и замораживали. Затем клетки оттаивали, как описано в Примере 1. Жизнеспособность и восстановление клеток эквивалентны между вариантами 1 и 2 после криоконсервации (**Фигура 9**).

Также проанализировали фенотип клеток, криоконсервированных после размножения по варианту 2. Вариант 2 демонстрирует эквивалентную композицию иммунных клеток и фенотип маркеров клеточной поверхности до и после криоконсервации (**Фигура 10**).

Наконец, исследовали цитотоксичность клеток после криоконсервации. Вариант 2 демонстрирует повышенную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток NALM-6 после криоконсервации в диапазоне соотношений эффектора и мишени по сравнению с вариантом 1 (**Фигура 11**).

ПРИМЕР 6. Трансдукция клеточной композиции

Композицию клеток, полученную по варианту 2, трансдуцировали лентивирусным вектором, как описано в Примере 1. Клетки, полученные по варианту 2, демонстрируют повышенную способность к трансдукции по сравнению с вариантом 1 (**Фигура 12**). Кроме того, CAR-трансдуцированный вариант 2 дополнительно усиливает цитотоксичность по отношению к клеткам NALM-6, при этом наблюдается уничтожение при соотношении эффектора к мишени всего лишь 1:100 (**Фигура 13**).

ПРИМЕР 7. Варианты оптимизированного способа

Способ дополнительно оптимизировали. CD56+ лимфоциты получали из мононуклеарных клеток периферической крови, обедненных на $\alpha\beta$ -TCR+, как описано в Варианте 2 Примера 1 со следующими изменениями. Питательная среда включала добавку 1x NK (NK MACS®, Miltenyi Biotec). Если не указано иное, растворимое моноклональное антитело анти-V δ 1 вводили только в начале культивирования и больше не добавляли. Как C08, так и G04 растворимые моноклональные антитела анти-V δ 1 собственного изготовления (описанные в WO 2021032961) тестировали с аналогичными результатами, но, если не указано иное, использовали C08. Клетки собирали в день 11 (12 день размножения), если не указано иное, на основании наблюдения, что экспрессия Ki-67, которая указывает на пролиферативный статус, снижается.

Было обнаружено, что описанный способ является надежным, с более коротким сбором в Д11 и однократным введением растворимого моноклонального антитела анти-V δ 1 в день 0, что обеспечивает хорошее размножение клеток с правильными типами

клеток (Фигура 14). Повторные эксперименты с использованием дополнительных доноров дополнительно демонстрируют надежность описанного способа (Фигура 15). Другие параметры, такие как объем культуры, исходная плотность клеток, тип сосуда и добавление добавок НК либо не оказывали отрицательного влияния, либо оказывали некоторое положительное влияние (данные не представлены).

Кроме того, клетки из каждого типа клеток увеличивали экспрессию CD56 как по уровням экспрессии (что подтверждалось повышенным значением MFI, Фигура 16А), так и по проценту положительных результатов на CD56 для фракций $\gamma\delta$ клеток, которые обычно не являются высокими экспрессорами CD56 (Фигура 16В). Повышенная экспрессия CD56 коррелирует с повышенной цитотоксичностью (Фигура 16С).

В завершение, уровни экспрессии хемокиновых рецепторов на поверхности клеток приведены на Фигуре 17. Они указывают на то, что эти клетки потенциально могут быть нацелены на широкий спектр типов клеток.

ПРИМЕР 8. Трансдукция γ -ретровирусными векторами

Клетки культивировали, как описано на Фигуре 14А. Для сравнения клетки высевали и культивировали, как описано в Варианте 2 Примера 1, за следующим исключением: вместо растворимого моноклонального антитела анти-V δ 1 использовали растворимое моноклональное антитело анти-CD3 (клон ОКТ3). Затем клетки трансдуцировали псевдотипированными γ -ретровирусными векторами GALV или RD114, кодирующими химерные антигенные рецепторы, нацеленные на CD19. Вирусный вектор разбавляли в CTS OpTmizer и прикрепляли к покрытым RetroNectin (20 мкг/мл) 6-луночным планшетам, не покрытым тканевой культурой, путем центрифугирования (2000 x g в течение 2 ч при 32 °C). Культивируемые клетки переносили на предварительно нагруженный вирусом планшет. Клетки центрифугировали при 800 x g в течение 45 минут при 32 °C («вращение») или оставляли в статическом положении («без вращения»). Эффективность трансдукции определяли с помощью проточной цитометрии через 6 дней после трансдукции (Фигура 18А).

Также было продемонстрировано, что клетки CD56+ в соответствии с настоящими способами были гораздо более трансдуцируемыми, чем клетки CD56- (Фигура 18В). Это отличается от клеток, полученных с помощью способов, описанных в публикации WO 2021032961, на которые в меньшей степени влиял статус CD56 (Фигура 18С).

Ранее было продемонстрировано, что клеточная композиция при трансдукции CAR, нацеленным на гем (CD19), способна уничтожать гематологические мишени. На Фигуре 19 продемонстрировано, что клеточная композиция при трансдукции CAR, нацеленным на мезотелин, может эффективно уничтожать мишени солидных опухолей. Действительно, популяция нетрансдуцированных комбинированных клеток по настоящему изобретению работает так же или лучше, чем традиционные CAR-экспрессирующие $\alpha\beta$ Т-клетки (самая нижняя линия), в то время как CAR-экспрессирующая популяция комбинированных клеток существенно превосходит обе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная композиция, содержащая клетки естественные киллеры (NK) и $\gamma\delta$ Т-клетки, при этом по меньшей мере 40% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, представляют собой CD56^{bright}.
2. Выделенная композиция, содержащая NK-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки, при этом по меньшей мере 50% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, экспрессируют CD56.
3. Выделенная композиция по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что по меньшей мере 90% клеток, присутствующих в композиции, состоят из NK-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток.
4. Выделенная композиция по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что по меньшей мере 30% клеток, присутствующих в композиции, представляют собой $\gamma\delta$ Т-клетки.
5. Выделенная композиция по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что $\gamma\delta$ Т-клетки содержат V δ 1 Т-клетки и V δ 2 Т-клетки.
6. Выделенная композиция по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что по меньшей мере 30% клеток, присутствующих в композиции, представляют собой NK-клетки.
7. Выделенная композиция, содержащая клетки, при этом по меньшей мере 90% клеток состоят из NK-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток, и при этом по меньшей мере 10% клеток представляют собой V δ 1 Т-клетки, по меньшей мере 5% клеток представляют собой V δ 2 Т-клетки, и по меньшей мере 30% клеток представляют собой NK-клетки.
8. Выделенная композиция по п. 7, отличающаяся тем, что по меньшей мере 40% $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в композиции, экспрессируют CD56.
9. Выделенная композиция по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что $\gamma\delta$ Т-клетки содержат V δ 1 Т-клетки, и по меньшей мере 15% указанных V δ 1 Т-клеток экспрессируют NKp30.
10. Выделенная композиция по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что $\gamma\delta$ Т-клетки содержат V δ 1 Т-клетки, и менее чем 50% указанных V δ 1 Т-клеток экспрессируют CD27.
11. Выделенная композиция по любому из пп. 1-10, отличающаяся тем, что содержит сконструированные NK-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки.
12. Выделенная композиция по любому из пп. 1-11 для применения в терапии.
13. Выделенная композиция по любому из пп. 1-12 для применения в способе лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.
14. Способ размножения неограниченных по МНС не- $\gamma\delta$ ⁺ лимфоцитов, включающий стимуляцию смешанной клеточной популяции, содержащей $\gamma\delta$ Т-клетки и NK-клетки, с использованием антитела против вариабельной дельта-цепи 1 TCR (анти-V δ 1) или его фрагмента, в присутствии интерлейкина-15 (IL-15) и в отсутствие интерлейкина-4 (IL-4), и культивирование смешанной клеточной популяции.
15. Способ приготовления композиции, содержащей клеточную популяцию, обогащенную неограниченными по МНС лимфоцитами, включающий:

(1) культивирование образца, полученного от субъекта, в присутствии:

- (i) антитела анти-V δ 1 или его фрагмента; и
 - (ii) IL-15, в отсутствие интерлейкина-4 (IL-4),
- с первого дня указанного культивирования; и

(2) выделение клеточной популяции, культивированной из образца.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что этап (1) указанного способа включает культивирование образца в течение по меньшей мере 7 дней, например, по меньшей мере 14 дней.

17. Способ по п. 15 или по п. 16, отличающийся тем, что по меньшей мере 70% неограниченных по МНС лимфоцитов, присутствующих в клеточной популяции, выделенной на этапе (2), экспрессируют CD56.

18. Способ по любому из пп. 15-17, отличающийся тем, что клеточная популяция, выделенная на этапе (2), содержит $\gamma\delta$ Т-клетки, и по меньшей мере 40% $\gamma\delta$ Т-клеток экспрессируют CD56.

19. Способ по любому из пп. 15-18, отличающийся тем, что по меньшей мере 90% клеточной популяции, выделенной на этапе (2), состоит из NK-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток, и при этом по меньшей мере 10% клеток представляют собой V δ 1 Т-клетки, по меньшей мере 5% клеток представляют собой V δ 2 Т-клетки, и по меньшей мере 30% клеток представляют собой NK-клетки.

20. Способ по любому из пп. 14-19, отличающийся тем, что активирующее антитело анти-V δ 1 или его фрагмент связывается с эпитопом варибельной дельта-цепи 1 (V δ 1) $\gamma\delta$ -Т-клеточного рецептора (TCR), содержащего один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей:

- (i) 3-20 SEQ ID NO: 1; и/или
- (ii) 37-77 SEQ ID NO: 1.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что эпитоп содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69, из SEQ ID NO: 1.

22. Способ по любому из пп. 14-21, отличающийся тем, что антитело анти-V δ 1 или его фрагмент содержит один или большее количество из следующих элементов:

CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-25;

CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ: A1-A12 (из Таблицы 2); и/или

CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-61.

23. Способ по любому из пп. 15-22, отличающийся тем, что образец представляет собой гематопозитический образец или его фракцию.

24. Способ по любому из пп. 15-23, отличающийся тем, что образец обедняют на

$\alpha\beta$ Т-клетки перед указанным культивированием.

25. Способ по любому из пп. 15-24, отличающийся тем, что культивирование проводят в среде, содержащей 2,5% плазмы.

26. Способ по любому из пп. 15-25, отличающийся тем, что этап (1) способа включает культивирование образца в течение около 12 дней, например, в течение 12 дней.

27. Клеточная популяция, обогащенная неограниченными по МНС лимфоцитами, полученными, например, с помощью способа по любому из пп. 14-26.

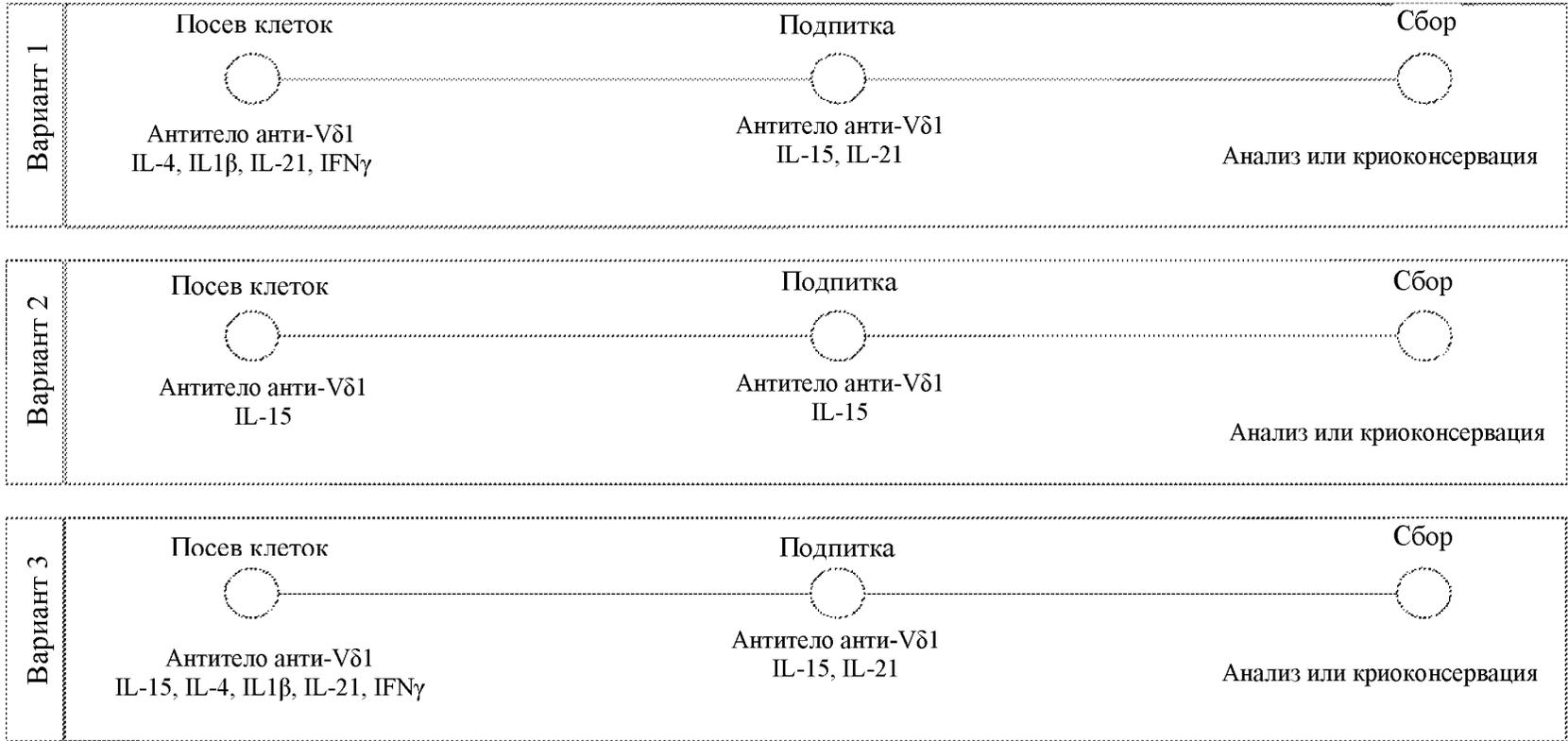
28. Композиция, содержащая клеточную популяцию, полученную, например, с помощью способа по любому из пп. 14-26.

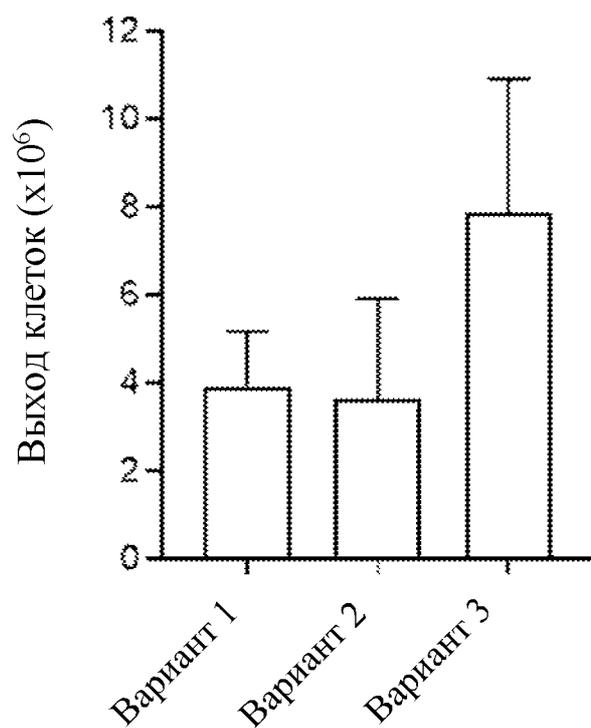
29. Клеточная популяция по п. 27 или композиция по п. 28 для применения в терапии.

30. Клеточная популяция по п. 27 или композиция по п. 28 для применения в способе лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

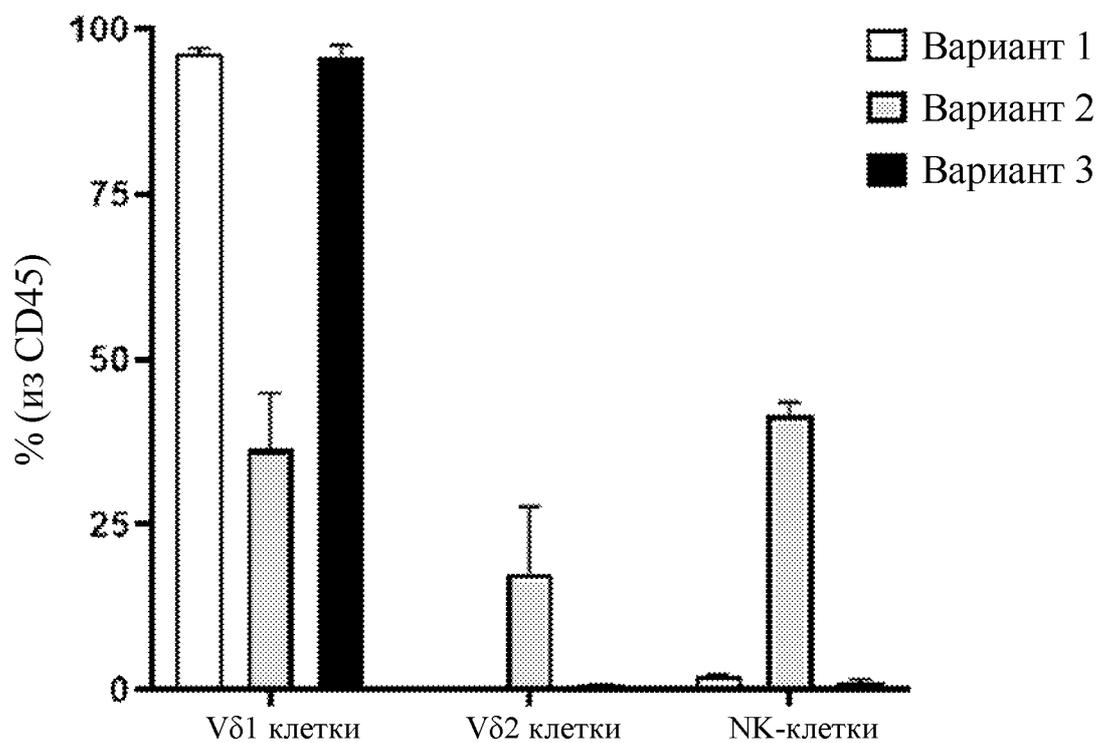
По доверенности

ФИГУРА 1

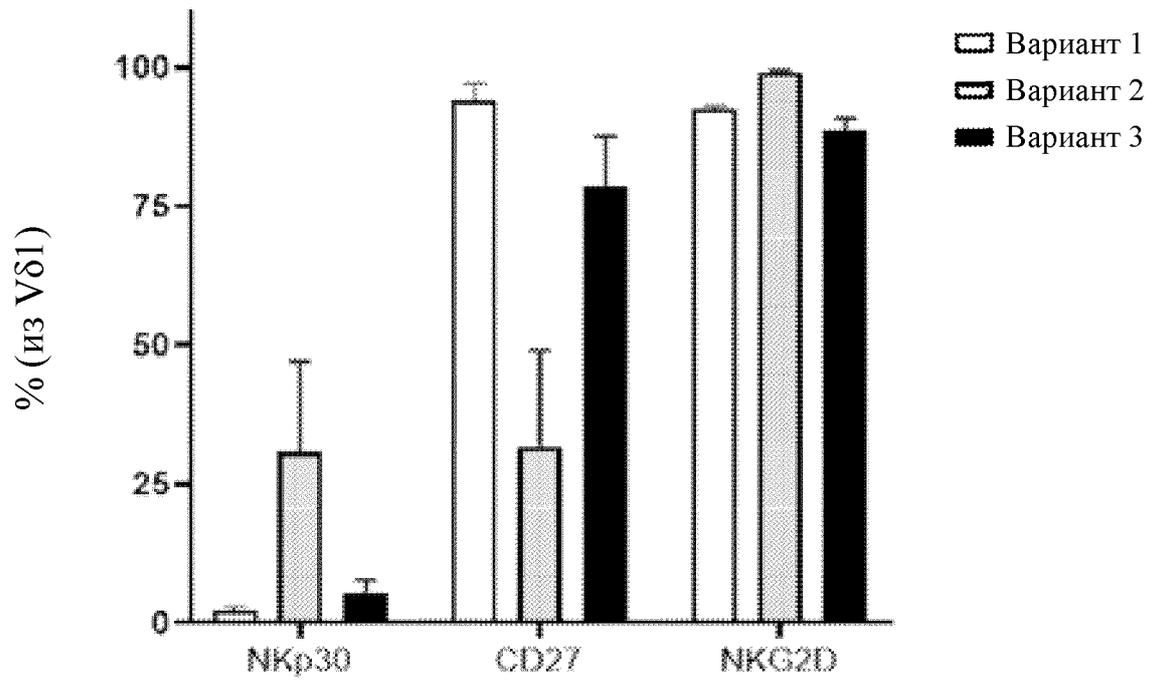




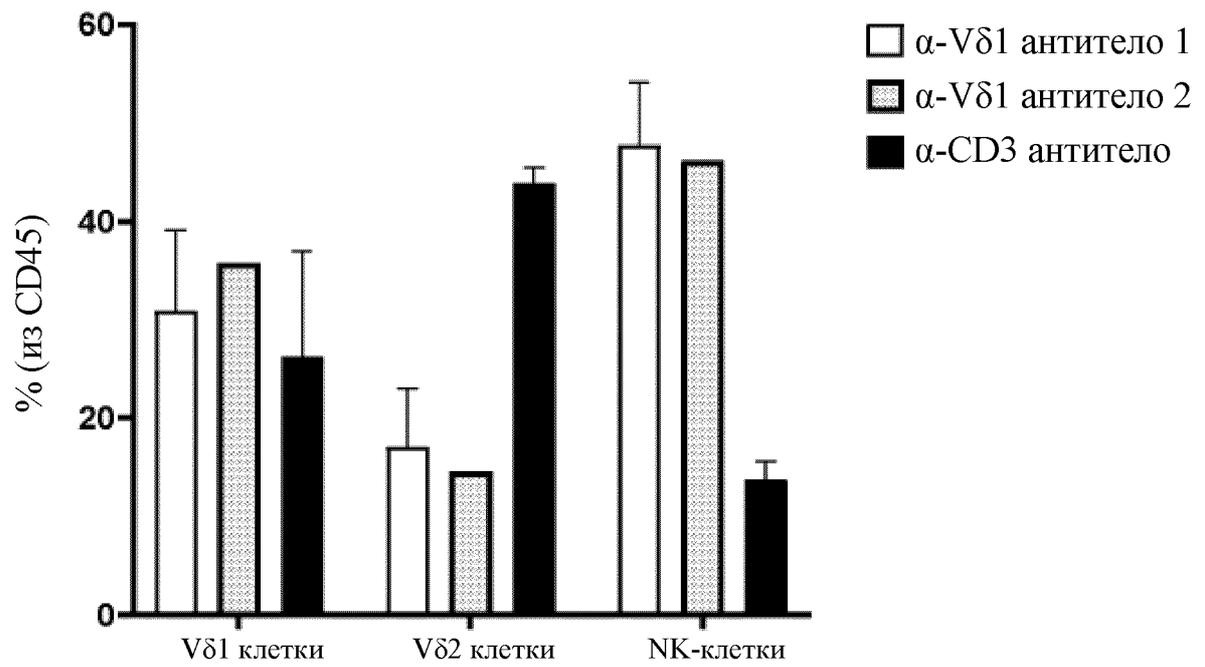
ФИГУРА 2



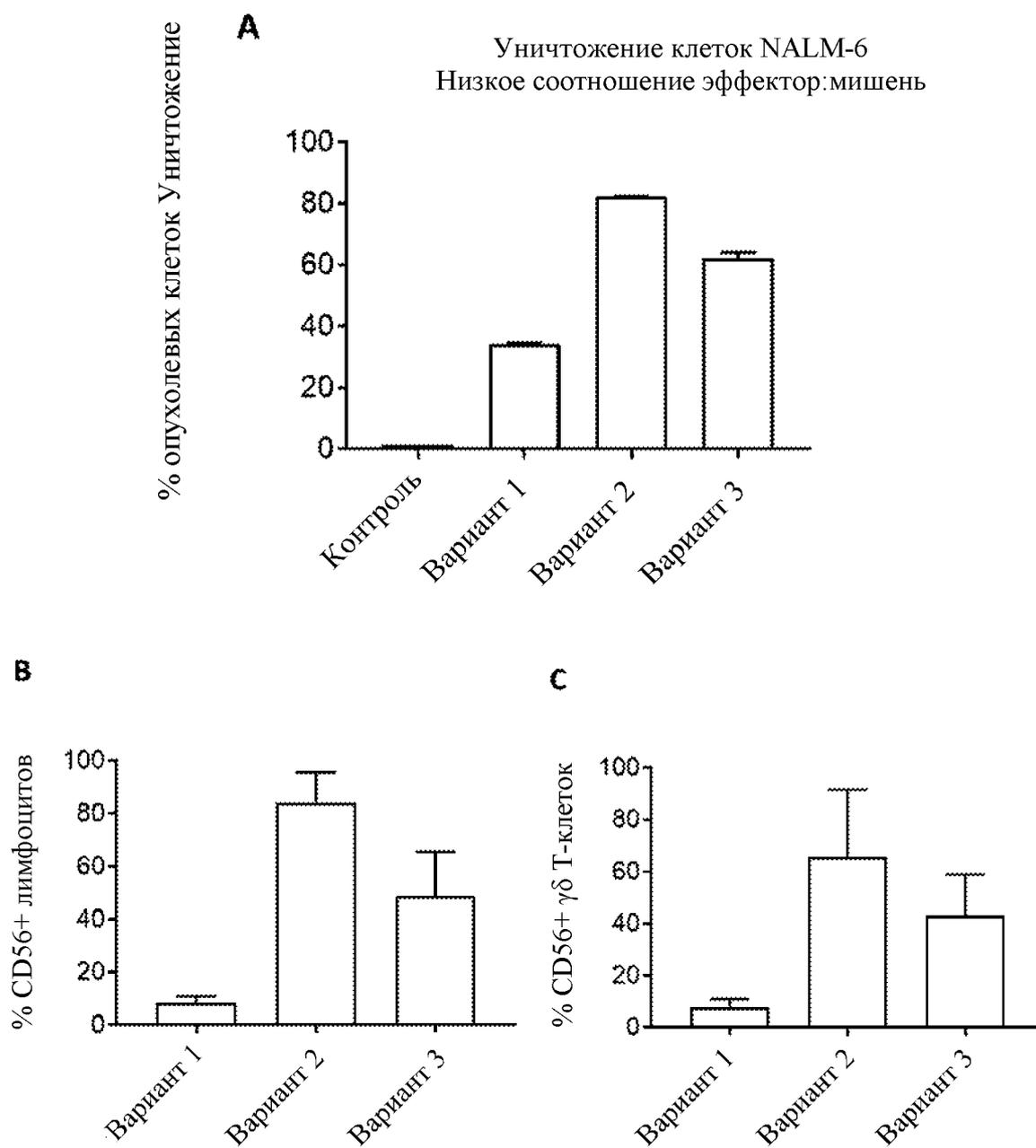
ФИГУРА 3



ФИГУРА 4

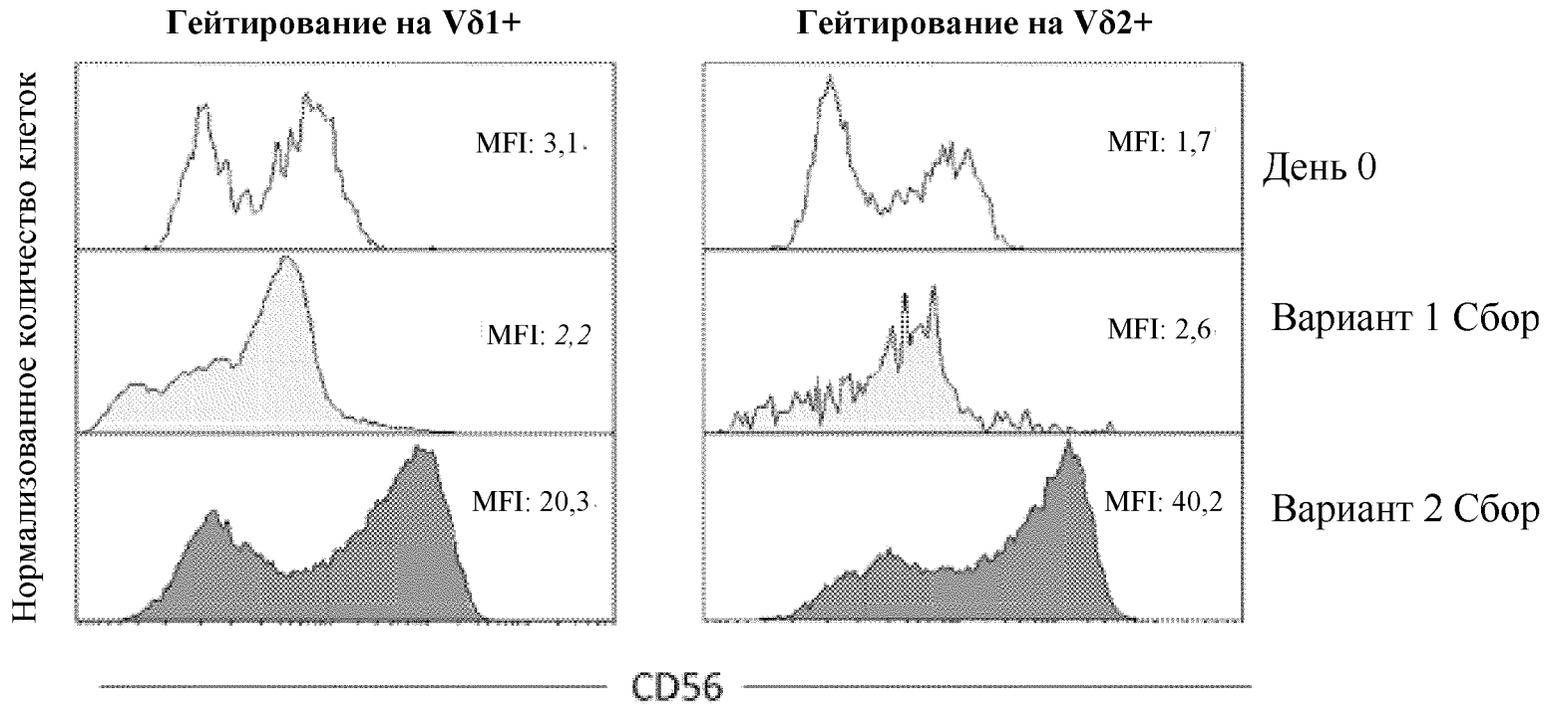


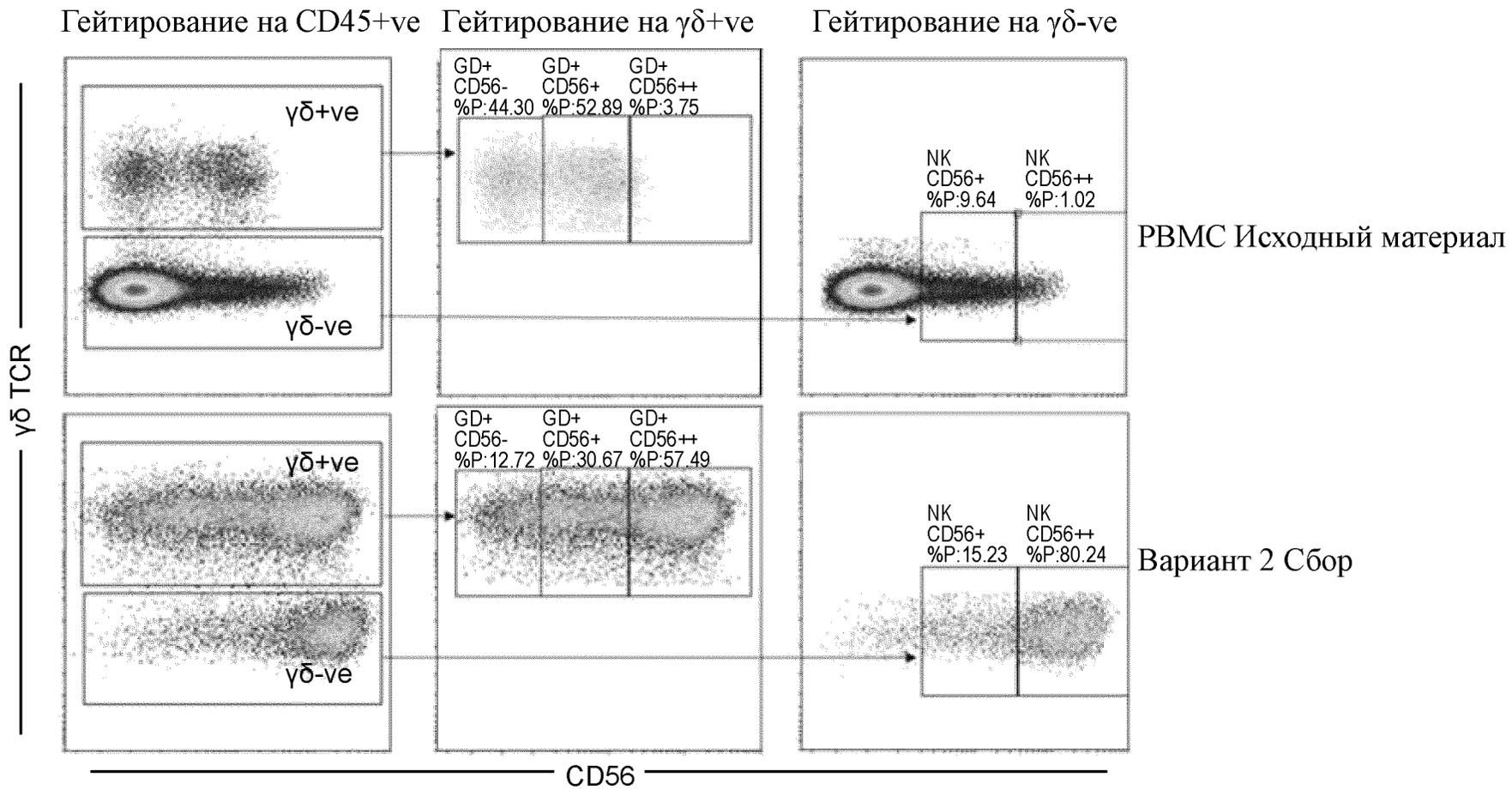
ФИГУРА 5



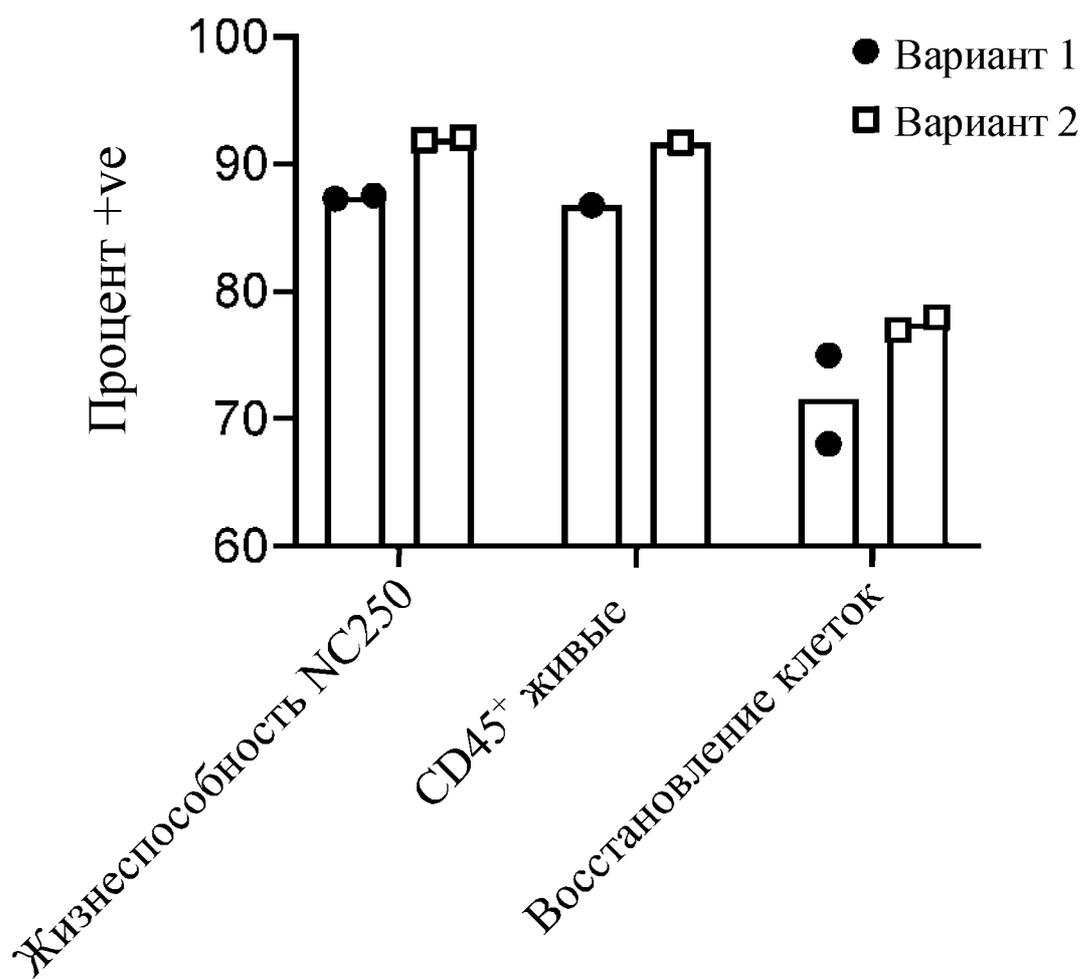
ФИГУРА 6

ФИГУРА 7

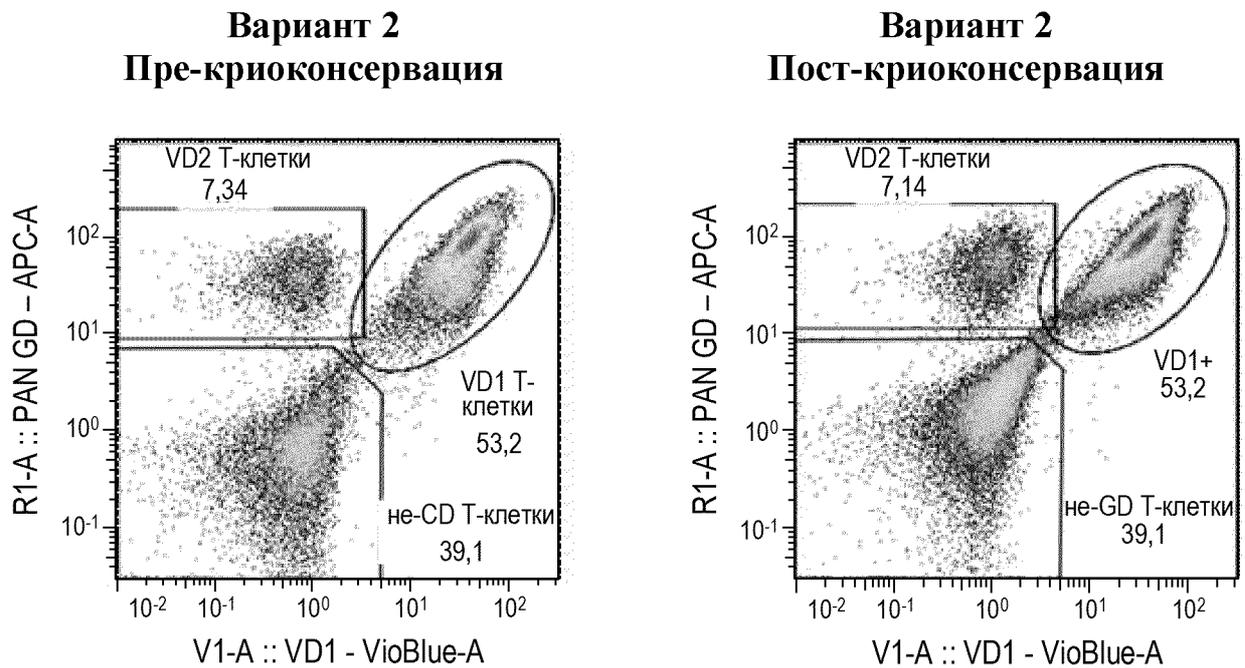




ФИГУРА 8

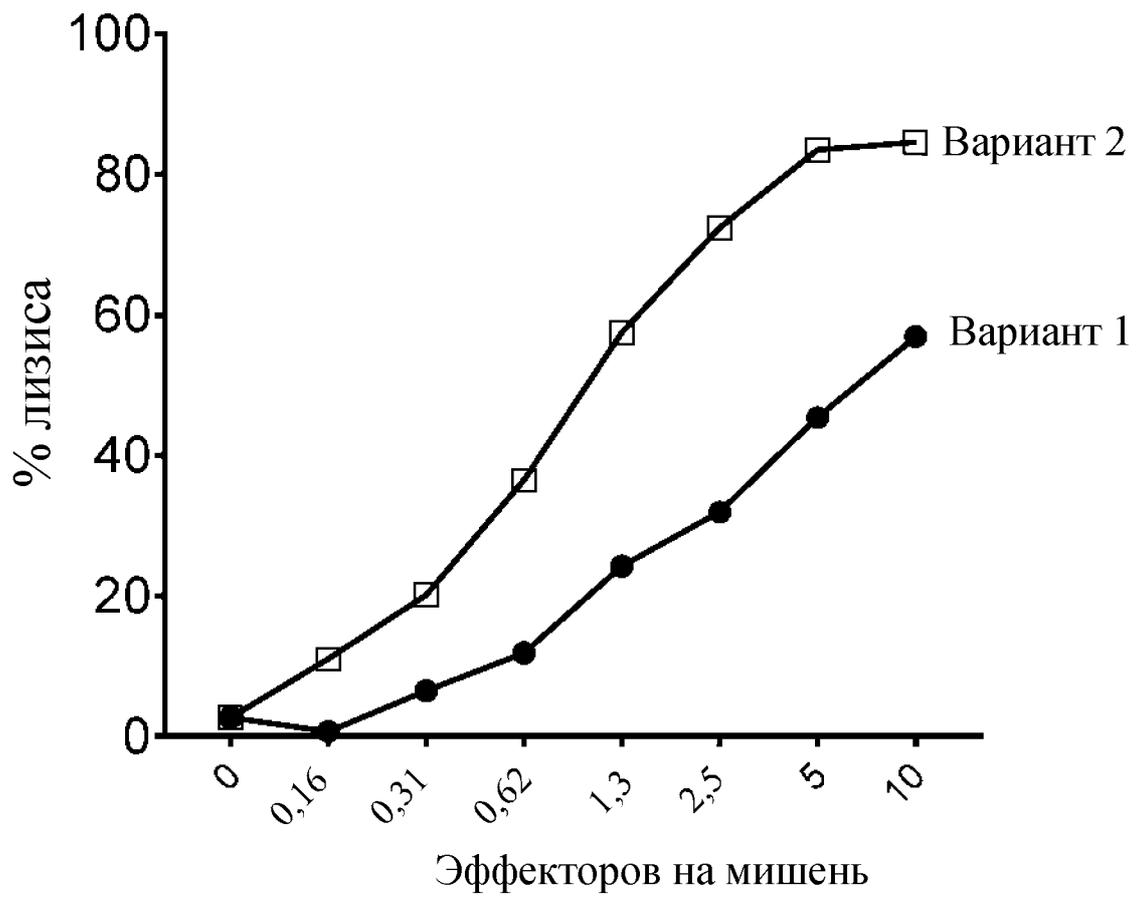


ФИГУРА 9

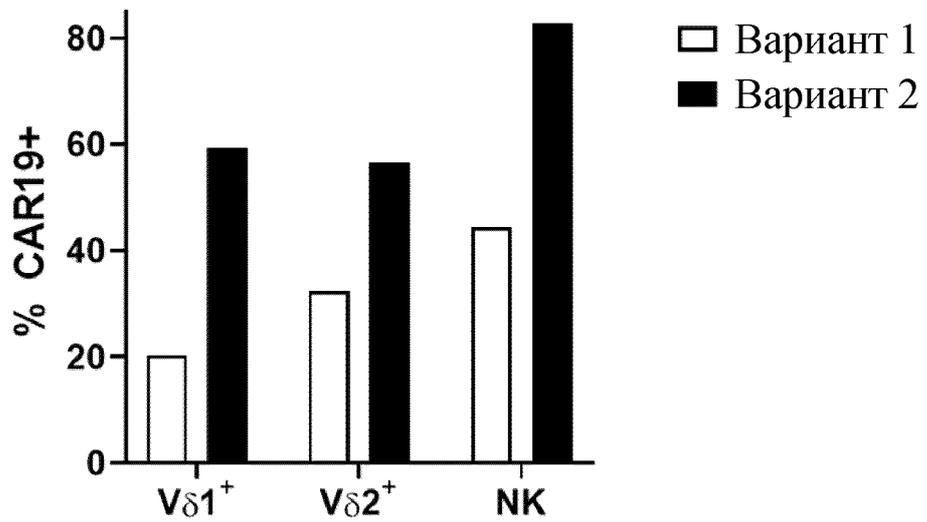
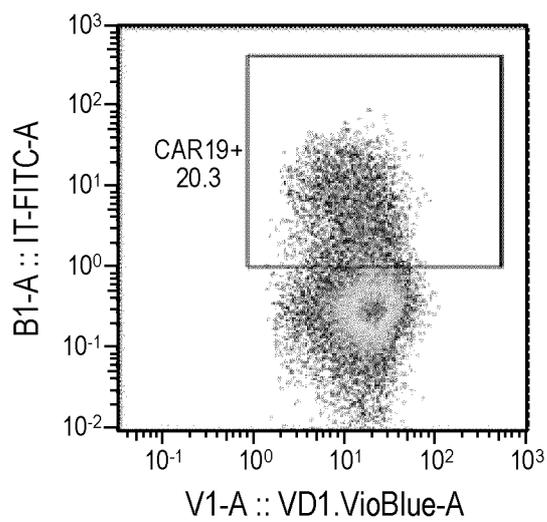
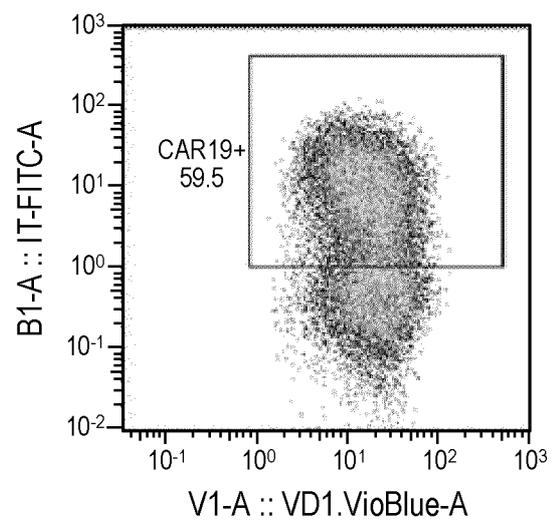
A**B**

Маркер	Пре-крио	Пост-крио
CD27+ (на VD1)	73,0%	73,2%
NKp30+ (на VD1)	76,1%	82,8%
NKG2D (на VD1)	99,8%	99,7%
CD27+ (на VD2)	19,1%	24,6%
NKp30+ (на VD2)	9,17%	11,9%
NKG2D (на VD2)	97,8%	98,8%
CD56+ (на CD3)	95,4%	94,6%
CD56+ (из CD3-)	37,6%	37,7%

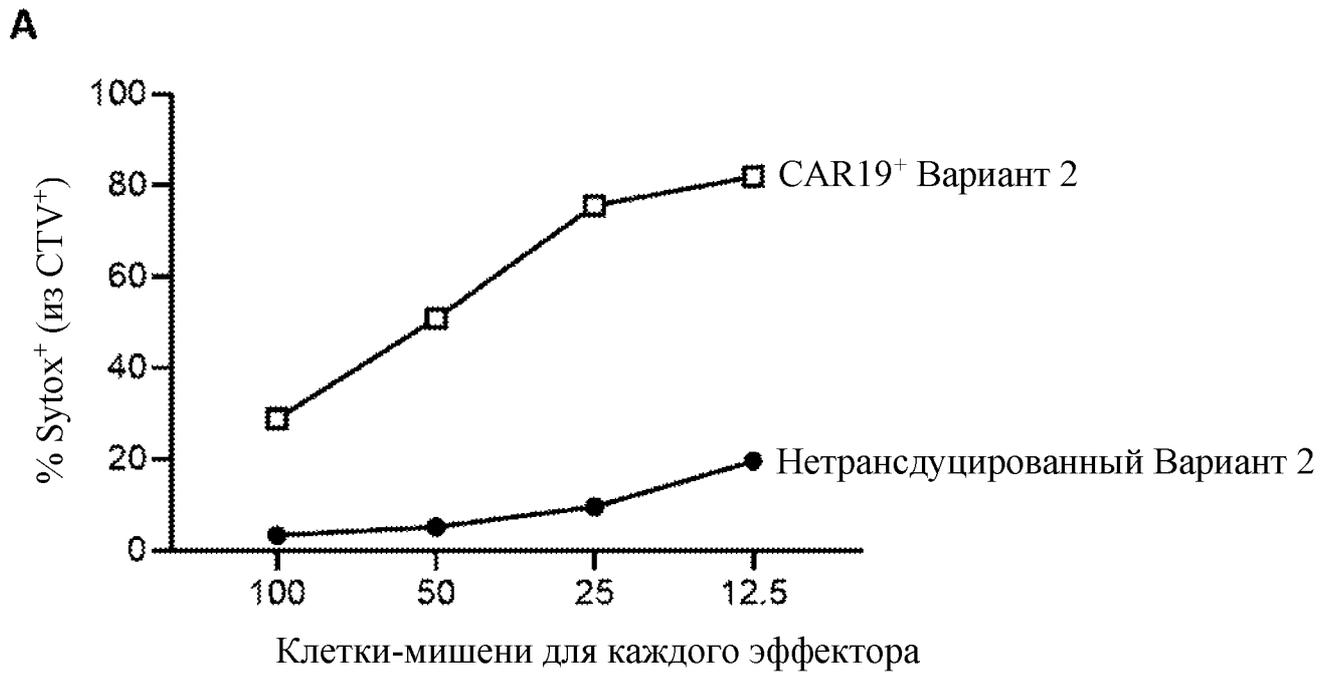
ФИГУРА 10



ФИГУРА 11

A**Незащищенная конструкция CAR19****B****Вариант 1****Вариант 2**

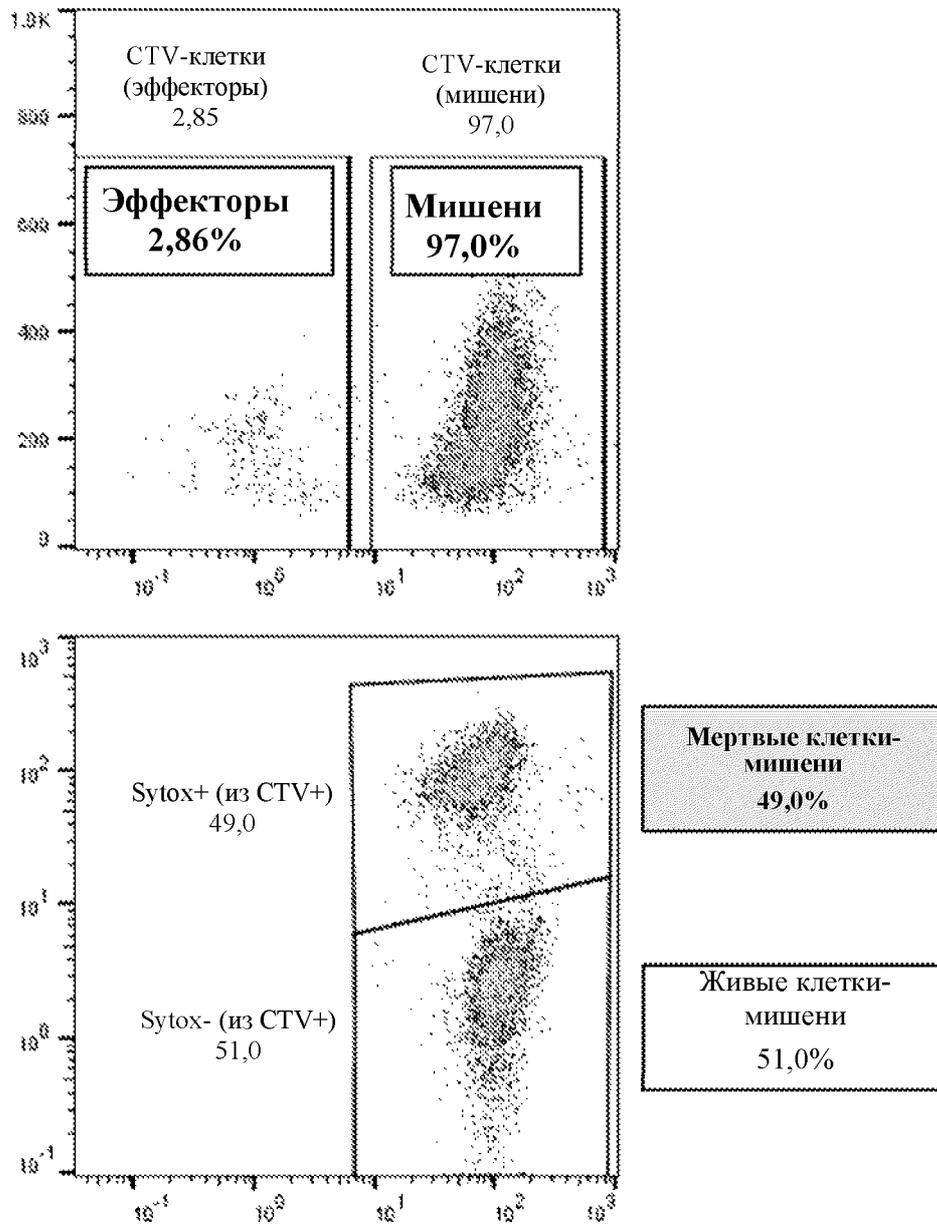
ФИГУРА 12



ФИГУРА 13

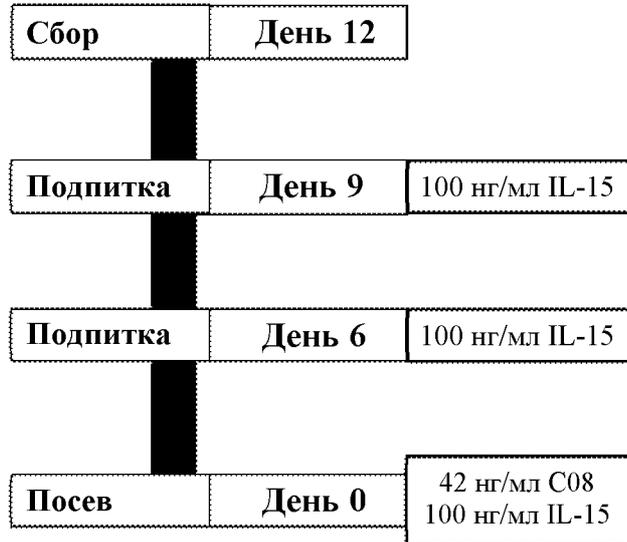
Nalm-6 1:50 E:T

B



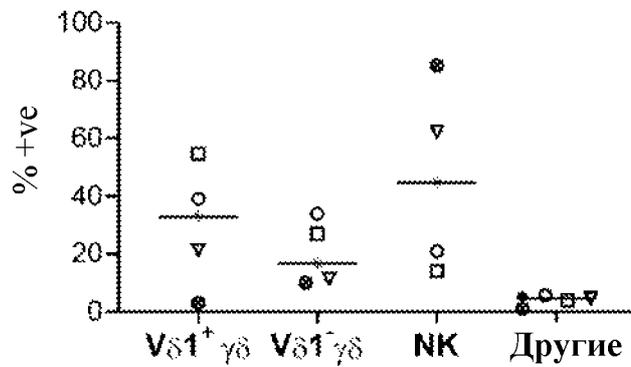
ФИГУРА 13 (продолжение)

A

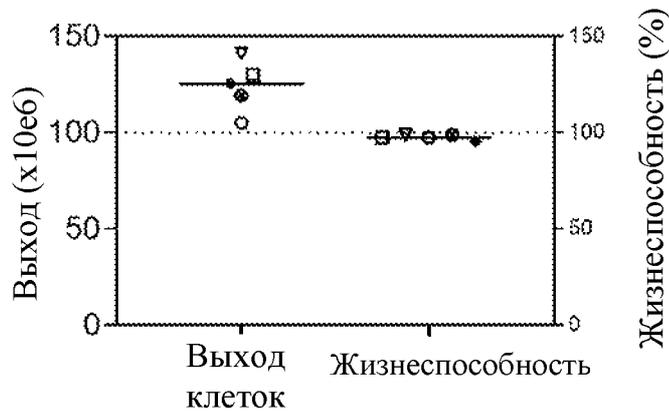


B

Пропорции клеток

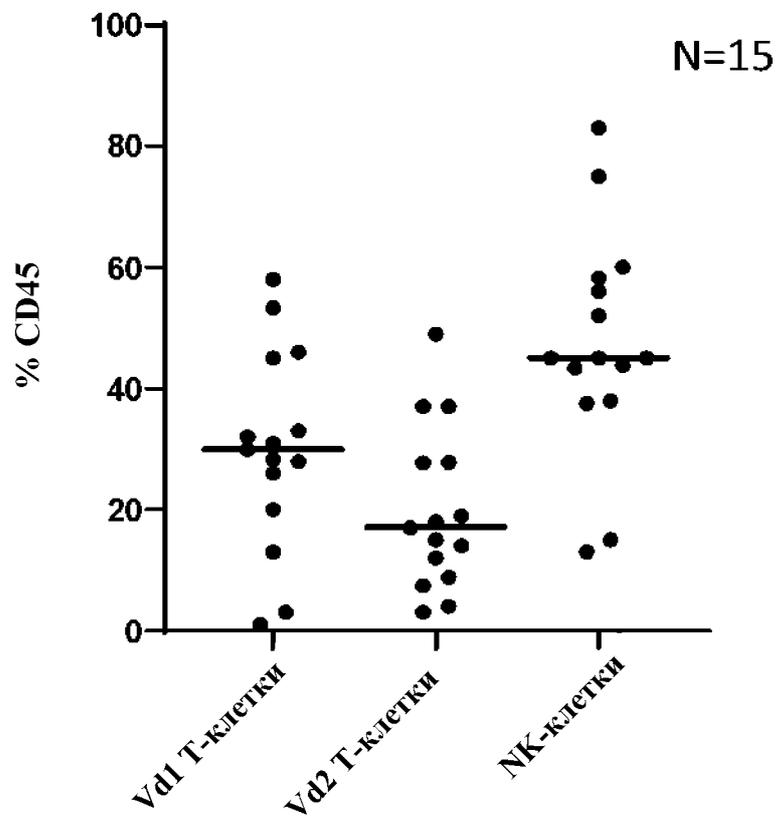


Выход



ФИГУРА 14

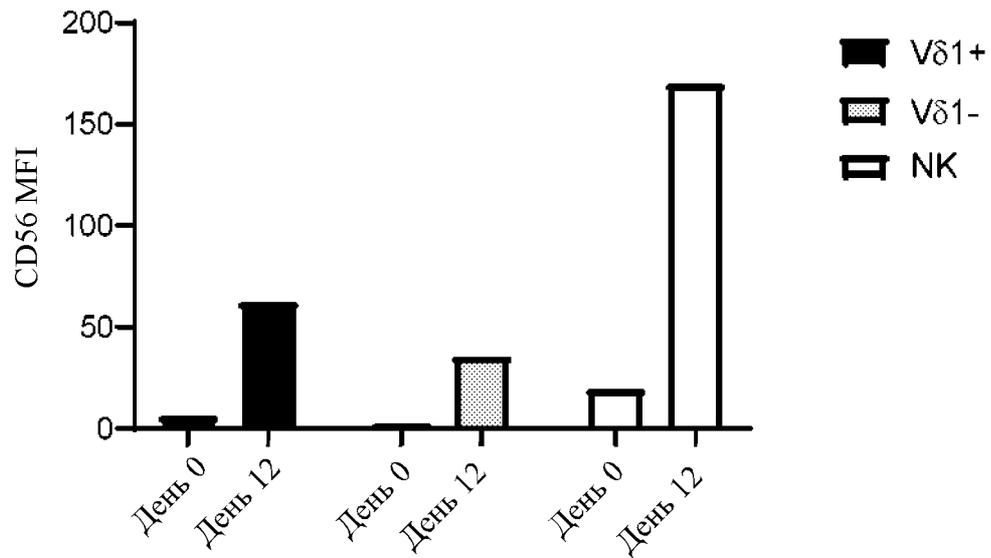
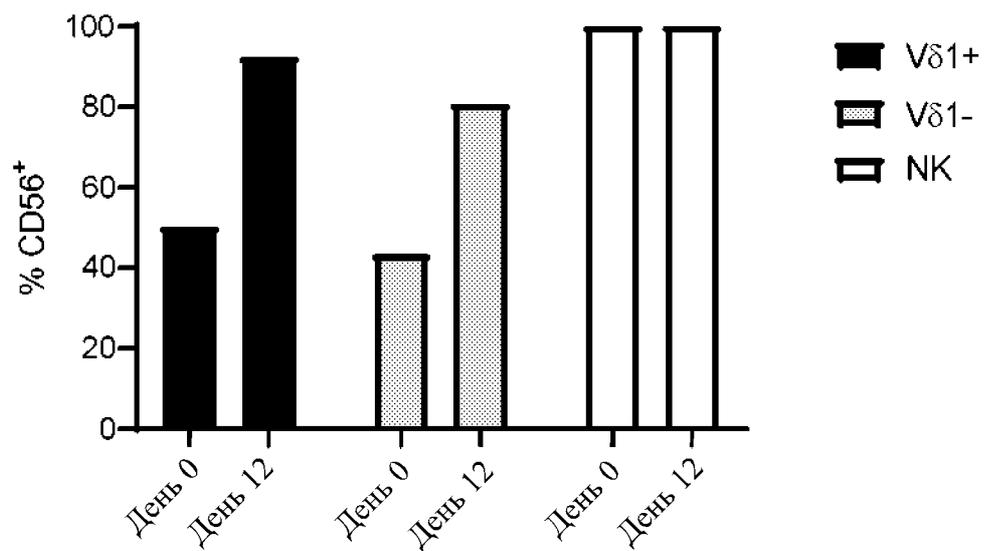
A



B

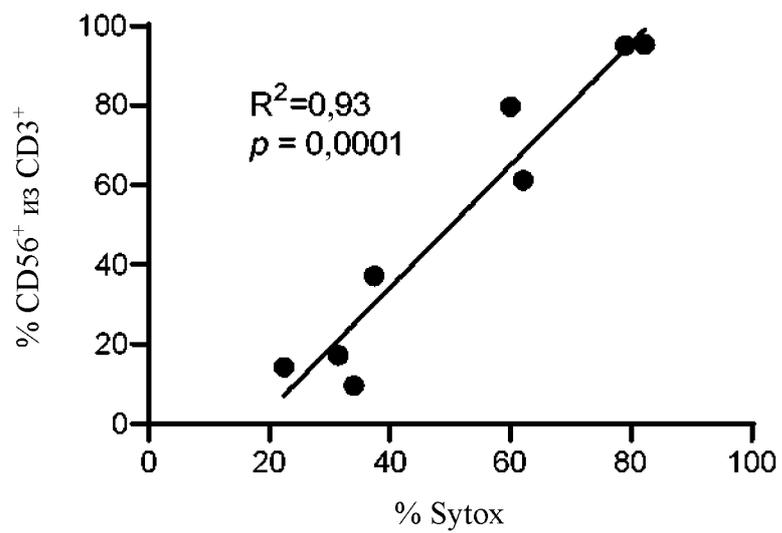
ID донора	Vδ1 T-клетки	Vδ2 T-клетки	NK-клетки
008	27,9	27,8	43,78
012	28,3	27,7	43,3
021	53,3	7,37	37,6
037	1	19	75
046 (2)	46	37	15
049	45	3	45
052	31	18	45
058	32	17	45
045	20	49	38
070	58	14	13
038	3	37	56
052 (2)	33	15	52
061	13	4	83
047	26	12	60
050 (3)	29,9	8,8	58,2

ФИГУРА 15

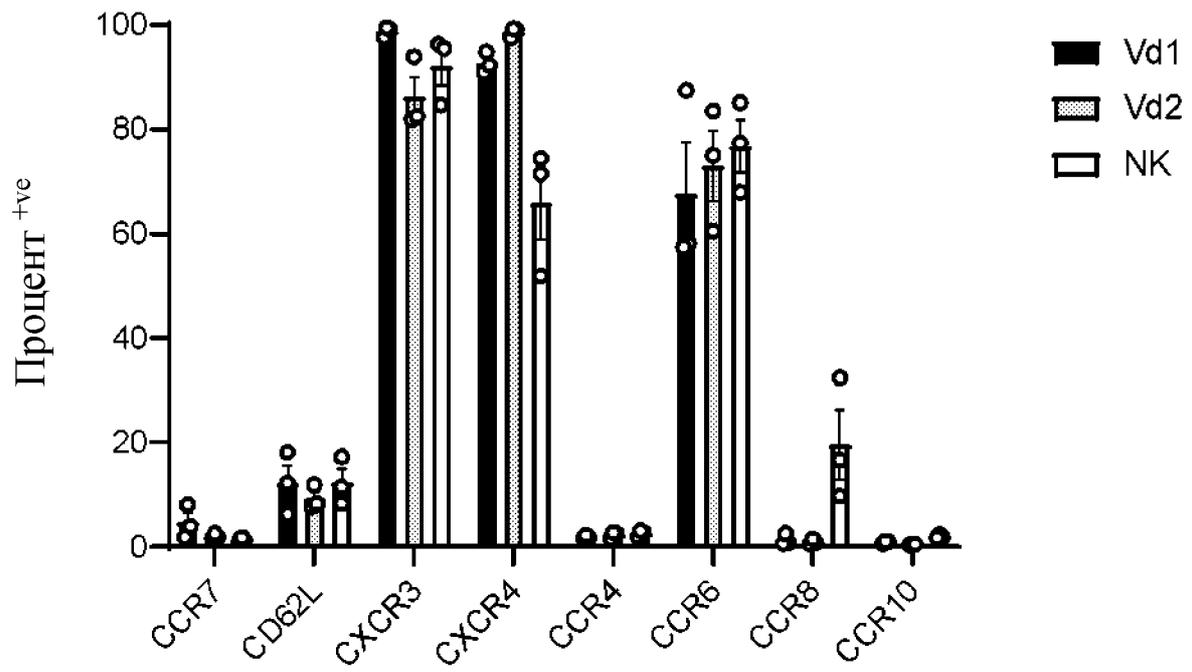
A**D0 v D12 CD56 MFI****B****D0 v D12 CD56%**

ФИГУРА 16

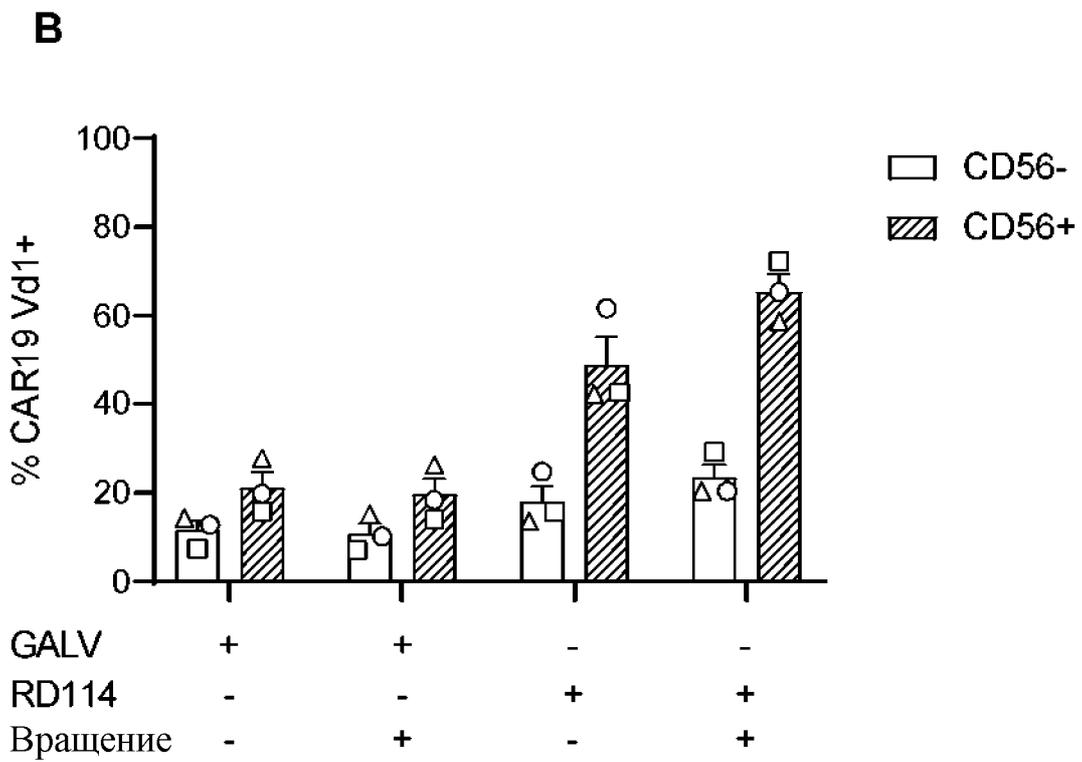
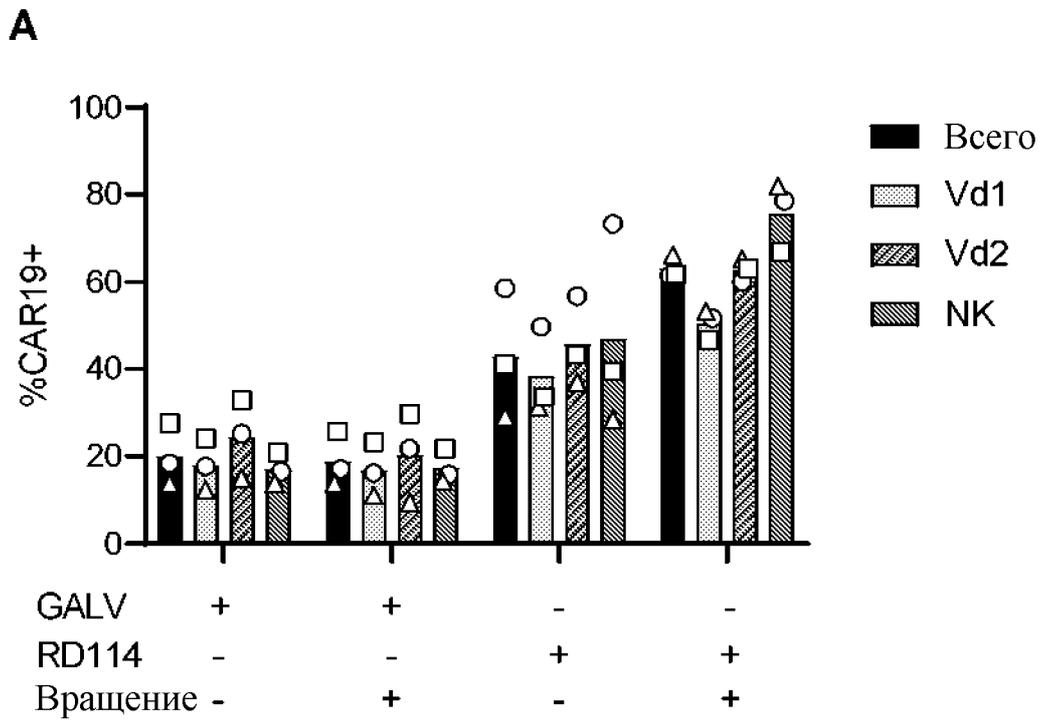
C



ФИГУРА 16 (продолжение)

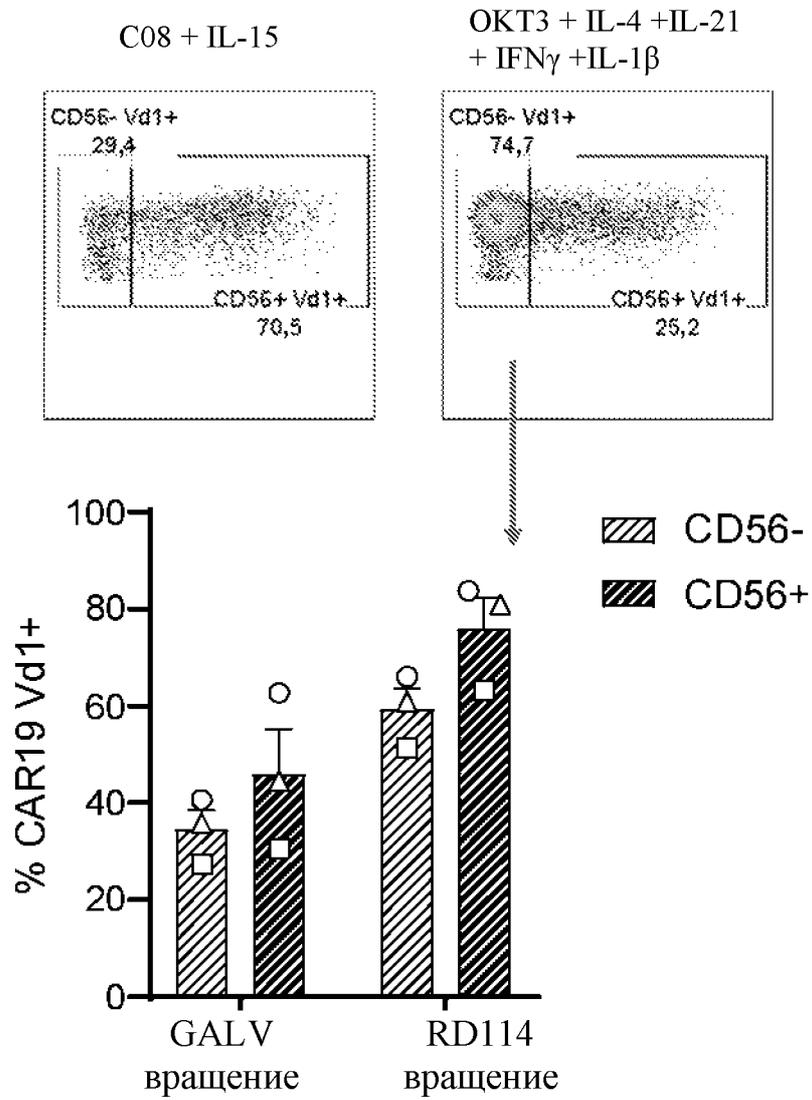


ФИГУРА 17



ФИГУРА 18

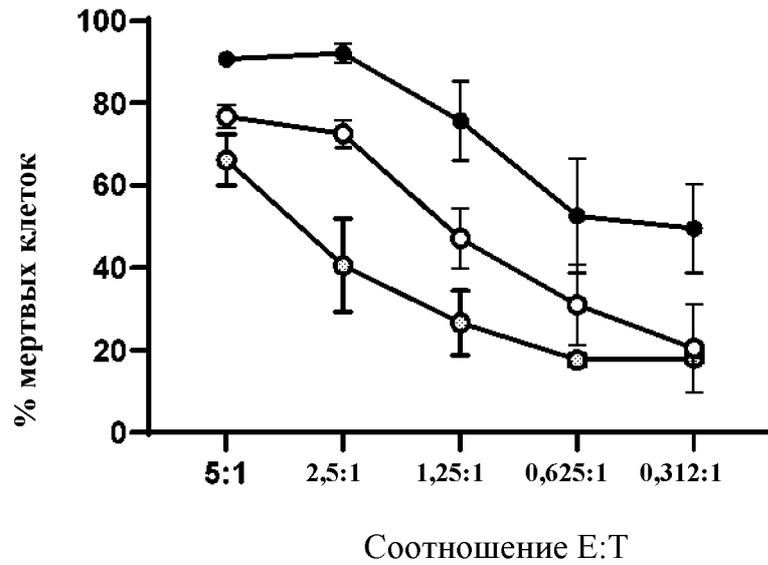
C



ФИГУРА 18 (продолжение)

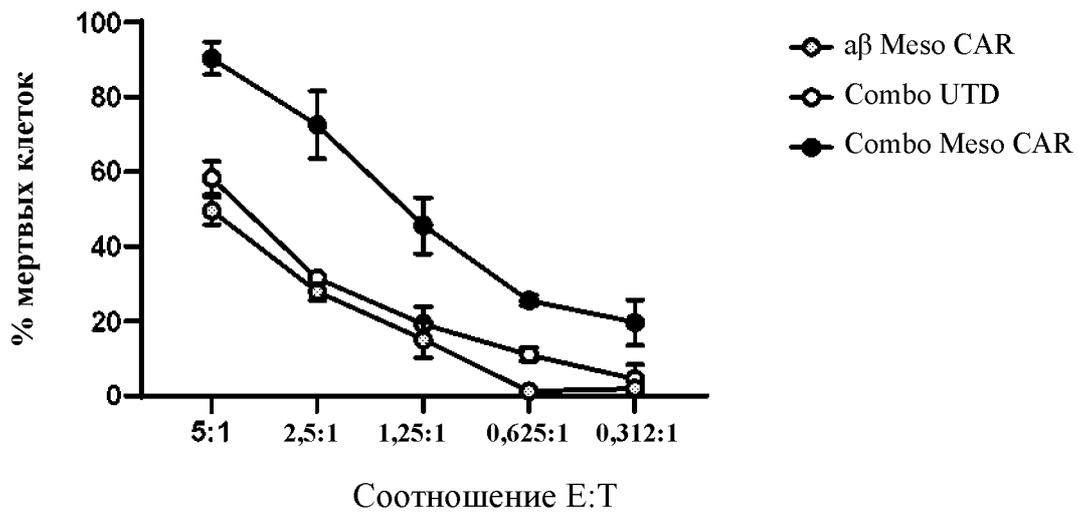
A

OVCAR



B

HELA по сравнению с LK046-02 UTD и MESO



ФИГУРА 19