

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392837** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.03.05

(51) Int. Cl. *C12N 5/0783* (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.08

(54) **НОВЫЙ СПОСОБ**

(31) **2105113.1**

(32) **2021.04.09**

(33) **GB**

(86) **PCT/GB2022/050886**

(87) **WO 2022/214825 2022.10.13**

(71) Заявитель:

**ГАММАДЕЛЬТА ТЕРАПЬЮТИКС
ЛТД (GB)**

(72) Изобретатель:

**Хаттон Эндрю Джон, Ковач Иштван,
Нусбаумер Оливер (GB)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способам размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, включающим получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками, и культивирование композиции в присутствии питающих клеток. Также предложен способ конструирования $\gamma\delta$ Т-клеток, включающий получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками, трансдукцию композиции для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), специфичного для опухолеассоциированного антигена, и культивирование трансдуцированной композиции для размножения сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток. Также предложены размноженные и сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки, полученные в соответствии с описанными способами, которые находят применение в адоптивной Т-клеточной терапии, терапии химерными рецепторами и т.п.

A1

202392837

202392837

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579492EA/019

НОВЫЙ СПОСОБ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к способам размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии получения композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками, и культивирования указанной композиции в присутствии питающих клеток. Также предусмотрен способ конструирования $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии получения композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками, трансдукции композиции для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), специфичного для опухолеассоциированного антигена, и культивирования трансдуцированной композиции для размножения сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток. Такие $\gamma\delta$ Т-клетки включают клетки, отличные от V δ 2, например, клетки V δ 1, V δ 3 и V δ 5. Размноженные и сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки, полученные в соответствии с описанными в данном документе способами, находят применение в адоптивной Т-клеточной терапии, терапии химерными рецепторами и т.п. Настоящее изобретение также относится как к отдельным клеткам, так и к популяциям клеток, полученным способами, описанными в настоящем документе.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Растущий интерес к Т-клеточной иммунотерапии рака сосредоточен на очевидной способности субпопуляций CD8⁺ и CD4⁺ $\alpha\beta$ Т-клеток распознавать раковые клетки и опосредовать защитные функциональные потенциалы хозяина, особенно когда они подавлены клинически опосредованным антагонизмом ингибирующих путей, обнаруженных посредством PD-1, CTLA-4 и других рецепторов. Однако $\alpha\beta$ Т-клетки ограничены МНС, что может привести к реакции «трансплантат против хозяина» в аллогенных условиях.

Лечение рака с помощью адоптивной клеточной терапии в значительной степени ограничивается платформами, основанными на циркулирующих, полученных от пациента, сконструированных аутологичных $\alpha\beta$ Т-клетках. Несмотря на успех при некоторых гематологических злокачественных новообразованиях, этот подход сопряжен с проблемами, включая связанную с ним токсичность, высокие производственные затраты и необходимость редактирования генов клеток, чтобы избежать реакции «трансплантат против хозяина», если он используется в аллогенных условиях. В то время как сконструированные $\alpha\beta$ Т-клетки продемонстрировали терапевтическую активность при гематологических злокачественных новообразованиях, клиническая активность при солидных опухолях оказалась сложной задачей.

Гамма-дельта-Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки) представляют собой подмножество Т-клеток, которые экспрессируют на своей поверхности особый, определяющий $\gamma\delta$ Т-клеточный рецептор (TCR). Этот TCR состоит из одной гамма-(γ) и одной дельта-(δ)-цепи. Цепи $\gamma\delta$ TCR человека выбраны из трех основных δ -цепей, V δ 1, V δ 2 и V δ 3, и шести γ -цепей. $\gamma\delta$ Т-клетки человека можно широко классифицировать на основе их цепей TCR, поскольку

определенные типы γ и δ обнаруживаются в клетках более широко, хотя и не исключительно, в одном или нескольких типах тканей. Например, большинство резидентных $\gamma\delta$ Т-клеток крови экспрессируют TCR V δ 2, например V γ 9V δ 2, тогда как это менее распространено среди резидентных $\gamma\delta$ Т-клеток ткани, которые чаще используют V δ 1 в коже и V γ 4 в кишечнике.

Таким образом, в отличие от $\alpha\beta$ Т-клеток, V δ 1 $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой подмножество врожденных Т-клеток, определяемых экспрессией Т-клеточных рецепторов, состоящих из γ -цепи, соединенной с V δ 1-цепью. У мышей Т-клетки V δ 1 $\gamma\delta$ преимущественно резидентны в тканях, где они обеспечивают высокую защиту от широкого спектра карцином, опосредуя противоопухолевые ответы посредством распознавания паттернов и естественных рецепторов цитотоксичности. Аналогичным образом, у людей V δ 1 $\gamma\delta$ Т-клетки преимущественно обитают в эпителиальных тканях, опосредуют распознавание клеток-мишеней, которые не ограничены МНС и не являются алло-HLA-реактивными. Таким образом, HLA-типирование пациентов не требуется для адоптивной $\gamma\delta$ Т-клеточной терапии. Врожденная биология $\gamma\delta$ Т-клеток V δ 1, которая обеспечивает независимое от антигена распознавание опухолей, отсутствие необходимости в HLA-типировании, а также природную миграцию и пребывание в тканях человека, делает $\gamma\delta$ Т-клетки V δ 1 привлекательной платформой для клеточной терапии.

Таким образом, существует потребность в способах эффективного размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, чтобы обеспечить их адаптацию в качестве терапии, например, в качестве адоптивной Т-клеточной терапии, а также в способах, которые потенциально могут обеспечить аллогенную «готовую» $\gamma\delta$ Т-клеточную терапию, экспрессирующую химерный антигенный рецептор, например, для лечения солидных опухолей.

WO2017072367 и WO2018202808 относятся к способам размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в некроветворной ткани, *in vitro* путем культивирования лимфоцитов, полученных из негемопоетической ткани, в присутствии по меньшей мере интерлейкина-2 (IL-2) и/или интерлейкина-15 (IL-15). WO2015189356 описывает композицию для размножения лимфоцитов, полученную из образца, полученного методом афереза, содержащую по меньшей мере два типа цитокинов, выбранных из IL-2, IL-15 и IL-21.

Таким образом, хотя эти открытия в некоторой степени способствуют решению вышеупомянутой проблемы, остается потребность в способах размножения и конструирования $\gamma\delta$ Т-клеток, например, из кожи, которые обеспечивают возможность использования таких $\gamma\delta$ Т-клеток в терапии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту изобретения предусмотрен способ размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии:

- (i) получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками; и
- (ii) культивирование композиции в присутствии питающих клеток, причем питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 4:1 (питающие клетки: $\gamma\delta$ Т-клетки).

Согласно другому аспекту изобретения предусмотрен способ размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии:

- (i) получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками; и
- (ii) культивирование композиции в присутствии питающих клеток и среды, содержащей IL-15 и IL-21, причем питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 3:2 (питающие клетки: $\gamma\delta$ Т-клетки).

Согласно дополнительному аспекту изобретения предусмотрен способ размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии:

- (i) получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками за счет истощения $\alpha\beta$ Т-клеток; и
- (ii) культивирование композиции в присутствии питающих клеток, причем питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 3:2 (питающие клетки: $\gamma\delta$ Т-клетки).

Согласно еще дополнительному аспекту изобретения предусмотрен способ конструирования $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии:

- (i) получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками;
 - (ii) трансдукцию композиции для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), распознающего опухолевый антиген, в отсутствие стимуляции TCR; и
 - (iii) культивирование трансдуцированной композиции для размножения сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток,
- при этом стадии (ii) и (iii) могут быть выполнены в любом порядке или одновременно.

Согласно одному аспекту изобретения предусмотрена размноженная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, которую можно получить, например, полученную способами, описанными в настоящем документе. Согласно дополнительному аспекту предусмотрена популяция сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток, которую можно получить, например, полученную способами, описанными в настоящем документе.

Согласно другому аспекту изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая популяцию размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток или популяцию сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток, как описано в настоящем документе.

Согласно еще одному аспекту изобретения предусмотрена популяция размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, популяция сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток или фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства. В другом аспекте предусмотрена размноженная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток или фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, для применения при лечении рака, например, для лечения солидных опухолей.

Также предусмотрен способ размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии:

- (i) получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками; и

(ii) культивирование композиции в присутствии питающих клеток, причем питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 1:2 (питающие клетки: $\gamma\delta$ Т-клетки), особенно по меньшей мере 1:1 (питающие клетки: $\gamma\delta$ Т-клетки), в частности, по меньшей мере 2:1 (питающие клетки: $\gamma\delta$ Т-клетки), например, по меньшей мере 3:1 (питающие клетки: $\gamma\delta$ Т-клетки).

Дополнительно предусмотрен способ размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии:

(i) получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками; и

(ii) культивирование композиции в присутствии питающих клеток и среды, содержащей ИЛ-15 и ИЛ-21, причем питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 1:2 (питающие клетки: $\gamma\delta$ Т-клетки), например, по меньшей мере 1:1 (питающие клетки: $\gamma\delta$ Т-клетки).

Дополнительно предусмотрен способ размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии:

(i) получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками за счет истощения $\alpha\beta$ Т-клеток; и

(ii) культивирование композиции в присутствии питающих клеток, причем питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 1:2 (питающие клетки: $\gamma\delta$ Т-клетки), например, по меньшей мере 1:1 (питающие клетки: $\gamma\delta$ Т-клетки).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1. Сравнение различных источников питающих клеток для размножения $\gamma\delta$ Т-клеток. $\gamma\delta$ Т-клетки выделяли из кожи, обедняли на $\alpha\beta$ Т-клетки и культивировали совместно в течение 7 дней со следующими облученными клетками: аллогенными лимфоцитами периферической крови (PBL), аллогенными моноклеарными клетками периферической крови (PVMC), аллогенными PVMC, активированными против CD3 CD28 (Act PVMC), или аллогенными изолирующими культурами кожи ($\alpha\beta$ кожи/изолирующие клетки кожи) по сравнению с контролем (4СК). **А)** Пролиферация показана с использованием маркера Ki67, а общее количество клеток V δ 1 показано на **В**.

Фигура 2. Размножение $\gamma\delta$ клеток, когда $\gamma\delta$ Т-клетки положительно отобраны из исходной популяции и добавлены обратно к оставшейся популяции питающих клеток в различных пропорциях. **А)** Кратность размножения $\gamma\delta$ Т-клеток определяли после указанных дней культивирования в присутствии питающих клеток (1%, 5%, 10%, 20% или 40% обогащенных $\gamma\delta$ Т-клеток, содержание клеток, отличных от $\alpha\beta$ в D0, причем остальная часть культуры состоит из аутологичных питающих клеток) после положительной селекции $\gamma\delta$ Т-клеток. **В)** Как для **А** в отсутствие питающих клеток.

Фигура 3. Размножение $\gamma\delta$ клеток, когда $\alpha\beta$ клетки истощаются из исходной популяции и добавляются обратно в качестве питающих клеток в различных пропорциях. **А)** Кратность размножения $\gamma\delta$ Т-клеток определяли после указанных дней в культуре в присутствии питающих клеток (1%, 5%, 10%, 20% или 40% содержания клеток, отличных от $\alpha\beta$, в D0, причем остальная часть культуры состоит из аутологичных питающих

клеток). **В)** Как для **А** в отсутствие питающих клеток.

Фигура 4. CD19 CAR⁺ $\gamma\delta$ Т-клетки проявляют цитотоксическую активность против клеток-мишеней NALM6. Композиции $\gamma\delta$ Т-клеток, включая $\alpha\beta$ питающие клетки, трансдуцировали CD19 CAR с последующим удалением питающих клеток из размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток путем истощения $\alpha\beta$ Т-клеток. Трансдуцированные $\gamma\delta$ Т-клетки затем инкубировали с клетками-мишенями NALM6, экспрессирующими CD19, в указанных соотношениях и измеряли степень уничтожения.

Фигура 5. Криоконсервированные трансдуцированные $\gamma\delta$ Т-клетки жизнеспособны, экспрессия CAR стабильна, а цитотоксическая активность сохраняется после оттаивания. **А)** Уровни экспрессии CAR на 14-й день размножения перед замораживанием. **В)** Как для **А**, часть клеток CD19 CAR⁺ измеряли через семь дней после оттаивания, демонстрируя хороший уровень экспрессии даже после замораживания и восстановления.

Фигура 6. После оттаивания CD19 CAR трансдуцировали $\gamma\delta$ Т-клетки, где питающие клетки были удалены путем истощения $\alpha\beta$ Т-клеток, инкубировали с клетками-мишенями NALM6, экспрессирующими CD19, в указанных соотношениях и измеряли степень уничтожения.

Фигура 7. Мезо-CAR трансдуцировали $\gamma\delta$ Т-клетки, где исходная популяция $\gamma\delta$ Т была истощена на $\alpha\beta$, затем трансдуцирована и культивирована, как описано, что привело к получению популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, которая составляет более 40% CAR⁺ мезотелина.

Фигура 8. $\gamma\delta$ Т-клетки, трансдуцированные мезо-CAR, проявляют цитотоксичность в отношении мезотелин-положительных линий раковых клеток. **А)** Жизнеспособность ложных и трансдуцированных клеток после оттаивания. **В)** Цитотоксичность по сравнению с клетками Hela **С)** Цитотоксичность по сравнению с клетками SCOV-3.

Фигура 9. Отрицательно выбранные $\gamma\delta$ Т-клетки культивировали либо с находящимися в коже CD4 $\alpha\beta$ Т-клетками («подслой CD4»), либо с находящимися в коже CD8 $\alpha\beta$ Т-клетками («подслой CD8»), либо с CD4 и CD8 $\alpha\beta$ Т-клетками («подслой $\alpha\beta$ »), либо альтернативно культивировали без добавления дополнительных питающих клеток («только $\gamma\delta$ »). Затем культуры размножали либо в течение 14 дней (левый график), либо в течение 21 дня (правый график), прежде чем культуры собирали и рассчитывали скорость размножения $\gamma\delta$.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ранее сообщалось, что популяции $\gamma\delta$ Т-клеток можно размножить до клинических масштабов, используя облученные искусственные антигенпрезентирующие клетки (аАРС) в качестве питающих клеток (Deniger *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2014; 20(22): 5708-5719). Такие аАРС получены из опухолевых клеток K562 и экспрессируют CD137L, который в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-21 приводит к активации и размножению популяции поликлональных $\gamma\delta$ Т-клеток. Однако такие способы требуют генетической модификации опухолевых клеток K562, чтобы они функционировали как аАРС и поддерживали

размножение и активацию $\gamma\delta$ Т-клеток, а также облучение для остановки роста этих аАРС, полученных из опухоли.

Таким образом, согласно первому аспекту изобретения предусмотрен способ размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии:

- (i) получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками; и
- (ii) культивирование композиции в присутствии питающих клеток, причем питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 4:1 (питающие клетки: $\gamma\delta$ Т-клетки).

Описанные в данном документе способы осуществляются вне тела человека или животного, т.е. *in vitro* и/или *ex vivo*. Таким образом, в одном варианте осуществления способы, описанные в настоящем документе, представляют собой способы *in vitro*. В дополнительном варианте осуществления способы, описанные в настоящем документе, представляют собой способы *ex vivo*.

В настоящем документе термины «размноженный», «размноженная популяция» или размноженные $\gamma\delta$ Т-клетки включают популяции клеток, которые крупнее 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 «стадия экспансии» относится к процессам, которые приводят к экспансии или увеличению популяции. Таким образом, размноженная или увеличенная популяция может быть больше по количеству или содержать большее количество клеток по сравнению с популяцией, для которой не была проведена стадия экспансии или перед любой стадией экспансии. Кроме того, следует понимать, что любые количества, указанные в данном документе для обозначения размножения (например, кратное увеличение или кратность размножения), иллюстрируют увеличение количества или размера популяции клеток или количества клеток и указывают на степень размножения.

Следует понимать, что культивирование композиции $\gamma\delta$ Т-клеток осуществляют в течение периода времени, эффективного для получения размноженной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток. В одном варианте осуществления продолжительность времени, эффективная для производства размноженной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, составляет по меньшей мере 7 дней. Таким образом, в одном варианте осуществления композицию $\gamma\delta$ Т-клеток культивируют в течение по меньшей мере 7 дней. В дополнительном варианте осуществления композицию культивируют в течение от 7 до 21 дня, например от 9 до 15 дней. В дополнительных вариантах осуществления композицию культивируют в течение примерно 10, 11, 12, 13 или 14 дней.

В других вариантах осуществления композицию культивируют в течение 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 и по меньшей мере 13 дней, по меньшей мере 14 дней или по меньшей мере 21 день, например около 14 дней или около 21 дня для получения

размноженной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток. В одном варианте осуществления композицию культивируют в течение примерно 10, 11, 12, 13 или 14 дней для получения размноженной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток.

Подходящим образом размножение популяции $\gamma\delta$ Т-клеток обеспечивает по меньшей мере 5-кратное, особенно по меньшей мере 10-кратное, в частности по меньшей мере 20-кратное, такое как по меньшей мере 50-кратное, например по меньшей мере 100-кратное количество $\gamma\delta$ Т-клеток.

В одном варианте осуществления способ включает замораживание размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток. Такие замороженные размноженные $\gamma\delta$ Т-клетки впоследствии могут быть разморожены для последующей обработки или использования, например, для терапевтического применения. Замораживание позволяет легко транспортировать и долговременно хранить размноженные $\gamma\delta$ Т-клетки и хорошо известно в данной области техники. Следовательно, способ, который обеспечивает клетки, которые показывают хорошую жизнеспособность и активность после замораживания и оттаивания, является предпочтительным, и не все способы размножения дают такие клетки (данные не показаны).

Соотношение питающих клеток: $\gamma\delta$ Т-клеток, составляющее по меньшей мере 4:1, равно соотношению по меньшей мере 80% питающих клеток к 20% или менее $\gamma\delta$ Т-клеток в культуре. Такое соотношение питающих клеток: $\gamma\delta$ Т-клеток приводит к значительному усилению размножения популяции $\gamma\delta$ Т-клеток в культуре по сравнению с популяцией $\gamma\delta$ -Т-клеток, культивируемой в отсутствие питающих клеток (фиг. 2-3). Более того, чистота $\gamma\delta$ Т-клеток в популяции CD45⁺ в этих культурах увеличивается даже при самых высоких уровнях добавления питающих клеток (данные не показаны). Эти благоприятные эффекты наблюдаются во все моменты культивирования, особенно на 14-й и 21-й день культивирования.

Таким образом, в одном варианте осуществления культура содержит по меньшей мере 80% питающих клеток. В некоторых вариантах осуществления питающие клетки присутствуют в соотношении от около 10:1 до около 99:1 (питающие клетки : $\gamma\delta$ Т-клетки). В одном варианте осуществления питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 10:1 (питающие клетки : $\gamma\delta$ Т-клетки). Таким образом, в дополнительном варианте осуществления культура содержит по меньшей мере 90% питающих клеток. В дополнительном варианте осуществления питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 20:1 (питающие клетки : $\gamma\delta$ Т-клетки). Таким образом, согласно одному варианту осуществления культура содержит по меньшей мере 95% питающих клеток. В еще одном дополнительном варианте осуществления питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 50:1 (питающие клетки : $\gamma\delta$ Т-клетки). Таким образом, в одном варианте осуществления культура содержит по меньшей мере 98% питающих клеток. В еще одном дополнительном варианте осуществления питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 99:1 (питающие клетки : $\gamma\delta$ Т-клетки). Таким образом, в дополнительном варианте осуществления культура содержит по

меньшей мере 99% питающих клеток. Все протестированные в данном документе соотношения обеспечивают значительно увеличенное размножение популяции $\gamma\delta$ Т-клеток в культуре по сравнению с популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток, культивируемых без питающих клеток (фиг. 1), с особенно хорошим выходом и чистотой $\gamma\delta$ Т-клеток, когда питающие клетки присутствуют в соотношении примерно 10:1, т.е. где культура содержит примерно 90% питающих клеток.

Питающие клетки согласно настоящему изобретению могут представлять собой немодифицированные аутологичные или аллогенные Т-клетки, отличные от $\gamma\delta$, т.е. они представляют собой клетки, полученные от того же или другого донора, что и композиция, обогащенная $\gamma\delta$ Т-клетками. Такие питающие клетки включают $\alpha\beta$ Т-клетки и, необязательно, естественные клетки-киллеры (NK-клетки), полученные из той же ткани или того же типа ткани (независимо от того, получены ли они от того же/одного или другого донора), что и композиция, обогащенная $\gamma\delta$ Т-клетками. Например, если $\gamma\delta$ Т-клетки выделены из некроветворной ткани, такой как кожа, питающими клетками могут быть клетки, отличные от $\gamma\delta$ Т-клеток, также выделенные из указанной некроветворной ткани (например, кожи). Такие питающие клетки, включая $\alpha\beta$ Т-клетки, также могут быть первоначально выделены из кроветворных тканей, но впоследствии модифицированы посредством клеточной культуры или генетических манипуляций, чтобы напоминать фенотип и биологию находящихся в ткани клеток или $\alpha\beta$ Т-клеток памяти, которые обычно не обнаруживаются в кроветворных тканях в больших количествах. Таким образом, в одном варианте осуществления питающие клетки и композиция, обогащенная $\gamma\delta$ Т-клетками, получены из одного донора. В другом варианте осуществления питающие клетки и композиция, обогащенная $\gamma\delta$ Т-клетками, получены из разных доноров.

В одном варианте осуществления композиция $\gamma\delta$ Т-клеток получена от одного донора. В альтернативном варианте осуществления композиция получена от нескольких доноров, т.е. композиция представляет собой «объединенную» композицию. В дополнительном варианте осуществления питающие клетки получены из одного донора. В другом варианте осуществления питающие клетки получены от нескольких доноров, т.е. питающие клетки являются 'объединенными'. Таким образом, в одном варианте осуществления питающие клетки получены от нескольких доноров и композиция, обогащенная $\gamma\delta$ Т-клетками, получена от одного донора. В другом варианте осуществления питающие клетки получены из одного донора и композиция, обогащенная $\gamma\delta$ Т-клетками, получена из нескольких доноров.

В одном варианте осуществления один или несколько доноров могут включать субъекта, которого необходимо лечить клеточными популяциями или композициями по настоящему изобретению. Альтернативно, один донор или несколько доноров не включают субъекта, которого нужно лечить клеточными популяциями или композициями по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления питающие клетки включают популяцию $\alpha\beta$ -обогащенных Т-клеток. В дополнительном варианте осуществления питающие клетки

включают $\alpha\beta$ Т-клетки. В одном варианте осуществления $\alpha\beta$ Т-клетки включают CD4 Т-клетки и/или CD8 Т-клетки. Следует понимать, что ссылка на «CD4 Т-клетки» или «CD4⁺ Т-клетки» относится к типу Т-клеток, которые экспрессируют поверхностный белок CD4. Аналогично, ссылка на «CD8 Т-клетки» или «CD8⁺ Т-клетки» относится к типу Т-клеток, которые экспрессируют поверхностный белок CD8. В конкретном варианте осуществления питающие клетки включают CD4 Т-клетки. В дополнительном варианте осуществления питающие клетки состоят из CD4 Т-клеток.

В еще одном варианте осуществления питающие клетки содержат смешанную популяцию $\alpha\beta$ Т-клеток и клеток-естественных киллеров (NK). Таким образом, в одном варианте осуществления питающие клетки дополнительно содержат клетки-естественные киллеры (NK).

Следует понимать, что питающие клетки, описанные в данном документе, обладают природными антигенпрезентирующими и костимулирующими способностями, не являются генетически модифицированными для функционирования в качестве антигенпрезентирующих клеток и, таким образом, не являются аAPC. Более того, остановка роста питающих клеток, например, с помощью облучения или обработки митомицином-С, не требуется, поскольку они не происходят из опухолевых клеток. Однако в другом варианте осуществления рост питающих клеток задерживается. Способы остановки роста известны в данной области техники и включают, помимо прочего, облучение (например, γ -облучение) и обработку митомицином-С, в результате чего получают питающие клетки, которые не способны к репликации, но остаются метаболически активными, тем самым обеспечивая достаточную поддержку роста $\gamma\delta$ Т-клеток. Остановка роста питающих клеток позволяет длительное время культивировать $\gamma\delta$ Т-клетки без разрастания этих клеток, когда они присутствуют в больших количествах/больших долях по сравнению с $\gamma\delta$ Т-клетками. Таким образом, в дополнительном варианте осуществления питающие клетки облучены. В альтернативном варианте осуществления питающие клетки обработаны митомицином-С.

В одном варианте осуществления питающие клетки получены из некроветворной ткани. В дополнительном варианте осуществления питающие клетки получены из кожи. Примеры такой некроветворной ткани и способы ее получения можно найти в WO 2020095058 и WO 2020095059, описания которых включены во всей своей полноте.

В других вариантах осуществления композиция, обогащенная $\gamma\delta$ Т-клетками, содержит NK-клетки. Таким образом, в одном варианте осуществления стадия (i) включает истощение $\alpha\beta$ Т-клеток, т.е. композицию, обогащенную $\gamma\delta$ Т-клетками, получают путем истощения $\alpha\beta$ Т-клеток. В дополнительном варианте осуществления получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками, согласно стадии (i) включает удаление $\alpha\beta$ Т-клеток из смешанной популяции клеток, полученной из исходного образца, такого как некроветворная ткань, как описано выше. Присутствие NK-клеток в композиции является преимуществом, поскольку эти клетки также являются эффективными цитотоксическими клетками. Следовательно, композиция $\gamma\delta$ Т-клеток,

дополнительно содержащая НК-клетки, может обладать улучшенными цитотоксическими свойствами по сравнению с композицией, состоящей только из $\gamma\delta$ Т-клеток.

НК-клетки (также известные как большие гранулярные лимфоциты (LGL)) представляют собой цитотоксические лимфоциты врожденной иммунной системы. Они обеспечивают быстрое реагирование, например, инфицированные вирусом клетки и опухолевые клетки независимо от экспрессии МНС на поверхности клетки-мишени. Следовательно, как и в случае с $\gamma\delta$ -Т-клетками, распознавание клеток-мишеней НК-клетками не ограничено МНС, и они не являются алло-HLA-реактивными, а это означает, что HLA-типирование пациентов не требуется для терапии на основе НК-клеток.

Таким образом, согласно другому аспекту изобретения предложен способ размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии:

(i) получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками за счет истощения $\alpha\beta$ Т-клеток; и

(ii) культивирование композиции в присутствии питающих клеток, где питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 3:2 (питающие клетки $\gamma\delta$ Т-клетки).

Таким образом, в определенных вариантах осуществления культура содержит по меньшей мере 60% питающих клеток. В других вариантах осуществления культура содержит по меньшей мере 66% питающих клеток, например, по меньшей мере 70% питающих клеток.

В другом варианте осуществления стадия (i) включает положительную селекцию $\gamma\delta$ Т-клеток из смешанной популяции клеток, полученной из исходного образца.

В определенных вариантах осуществления исходный образец представляет собой ткань человека. В дополнительных вариантах осуществления исходный образец представляет собой некроветворную ткань, такую как описанная выше. В конкретном варианте осуществления исходным образцом является кожа.

В определенных вариантах осуществления способ включает удаление питающих клеток из размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток путем истощения $\alpha\beta$ Т-клеток. Такое удаление путем истощения $\alpha\beta$ Т-клеток приводит к образованию популяции размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, продуцируемых описанными в данном документе способами, которые дополнительно включают НК-клетки. Как описано выше, НК-клетки являются хорошими эффекторными клетками, которые, подобно $\gamma\delta$ Т-клеткам, не ограничены МНС и не являются реактивными по алло-HLA. Следовательно, в конкретном варианте осуществления популяция размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток включает НК-клетки. В альтернативном варианте осуществления способ включает удаление питающих клеток из размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток путем положительной селекции $\gamma\delta$ Т-клеток. Такая положительная селекция $\gamma\delta$ Т-клеток приводит к получению высокоочищенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, которая может быть более подходящей для последующей обработки или применения в терапии по сравнению с популяцией, содержащей другие/дополнительные типы клеток.

В одном варианте осуществления композиция культивируется в среде, содержащей IL-15. В дополнительном варианте осуществления композиция культивируется в среде,

содержащей IL-21. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления среда содержит IL-15 и IL-21. В еще одном варианте осуществления среда дополнительно содержит IL-2. В еще одном варианте осуществления среда дополнительно содержит IL-4. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления среда дополнительно содержит IL-2 и IL-4. В дополнительных вариантах осуществления среда содержит IL-15, IL-21, IL-2 и IL-4.

В конкретном варианте осуществления композицию, обогащенную $\gamma\delta$ Т-клетками, культивируют на стадии (ii) в присутствии среды, содержащей IL-15 и IL-21. В дополнительных вариантах осуществления стадия (ii) включает условия и/или способы размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, раскрытые в WO2017072367 и WO2018202808, содержание которых включено во всей полноте.

Таким образом, согласно другому аспекту изобретения предложен способ размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии:

- (i) получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками; и
- (ii) культивирование композиции в присутствии питающих клеток и среды, содержащей IL-15 и IL-21, причем питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 3:2 (питающие клетки: $\gamma\delta$ Т-клетки).

В контексте данного документа термин «IL-15» относится к нативному или рекомбинантному IL-15 или его варианту, который действует как агонист одной или большего количества субъединиц рецептора IL-15 (IL-15R) (например, мутантов, мутеинов, аналогов, субъединиц, рецепторных комплексов, фрагментов, изоформ и их пептидомиметиков). IL-15, как и IL-2, является известным фактором роста Т-клеток, который может поддерживать пролиферацию IL-2-зависимой линии клеток, CTLL-2. Впервые об IL-15 сообщили Grabstein, *et al.* (Grabstein, *et al. Science* 1994, 264.5161: 965-969) как 114-аминокислотный зрелый белок. Термин "IL-15", используемый в данном документе, означает нативный или рекомбинантный IL-15 и мутеины, аналоги, его субъединицы или их комплексы (например, рецепторные комплексы, например, пептиды sushi, как описано в WO 2007/046006), и каждый из которые могут стимулировать пролиферацию клеток CTLL-2. В анализах пролиферации CTLL-2 супернатанты клеток, трансфицированных рекомбинантно экспрессированным предшественником и слияниями зрелых форм IL-15 внутри рамки считывания, могут индуцировать пролиферацию клеток CTLL-2.

Человеческий IL-15 можно получить согласно процедурам, описанным Grabstein *et al.* или с помощью обычных процедур, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР). кДНК IL-15 человека была депонирована в ATCC® 19 февраля 1993 г., и ей был присвоен номер доступа 69245.

Аминокислотная последовательность IL-15 человека (Gene ID 3600) находится в Genbank под номером доступа NP000576.1 GI: 10835153 (изоформа 1) и NP_751915.1 GI: 26787986 (изоформа 2). Аминокислотная последовательность IL-15 мыши (*Mus musculus*) (Gene ID 16168) находится в Genbank под номером доступа NP_001241676.1 GI: 363000984.

IL-15 также может относиться к IL-15, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быков, свиней, лошадей и мышей. «Мутеин» или «вариант» IL-15, как упоминается в данном документе, представляет собой полипептид, по существу гомологичный последовательности нативного IL-15 млекопитающих, но имеющий аминокислотную последовательность, отличную от нативного полипептида IL-15 млекопитающих из-за аминокислотной делеции, вставки или замены. Варианты могут включать консервативно замещенные последовательности, что означает замену данного аминокислотного остатка остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замену одного полярного остатка на другой, например, замену между Lys и Arg; Glu и Asp; или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих сходные характеристики гидрофобности. Встречающиеся в природе варианты IL-15 также охватываются настоящим изобретением. Примерами таких вариантов являются белки, которые возникают в результате явлений альтернативного сплайсинга мРНК или в результате протеолитического расщепления белка IL-15, при этом свойство связывания IL-15 сохраняется. В результате альтернативного сплайсинга мРНК можно получить укороченный, но биологически активный белок IL-15. Вариации, связанные с протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах при экспрессии в различных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или большего количества концевых аминокислот из белка IL-15 (обычно от 1 до 10 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления конец белка можно модифицировать для изменения его физических свойств, например, с помощью химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, *et al. Cancer* 1995. 76: 687-694). В некоторых вариантах осуществления конец или внутреннюю часть белка можно модифицировать дополнительными аминокислотами (Clark-Lewis, *et al. PNAS* 1993. 90:3574-3577).

В некоторых вариантах осуществления способы, определенные в настоящем документе, включают IL-15 обычно в концентрации по меньшей мере 0,1 нг/мл, например, по меньшей мере 10 нг/мл (например, от 0,1 нг/мл до 10,000 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 1,000 нг/мл, от 5 нг/мл до 800 нг/мл, от 10 нг/мл до 750 нг/мл, от 20 нг/мл до 500 нг/мл, от 50 нг/мл до 400 нг/мл или от 100 нг/мл до 250 нг/мл, например, от 0,1 нг/мл до 1,0 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 5,0 нг/мл, от 5,0 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 100 нг/мл, от 20 нг/мл до 50 нг/мл, от 40 нг/мл до 70 нг/мл, от 50 нг/мл до 100 нг/мл, от 50 нг/мл до 60 нг/мл, от 100 нг/мл до 200 нг/мл, от 200 нг/мл до 500 нг/мл или от 500 нг/мл до 1,000 нг/мл). В дополнительных вариантах осуществления способы, определенные в настоящем документе, обычно включают IL-15 в концентрации менее 500 нг/мл, например менее 100 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-15 составляет около 50 нг/мл. В другом варианте осуществления концентрация IL-15 составляет около 55 нг/мл.

В контексте данного документа термин «IL-21» относится к нативному или рекомбинантному IL-21 или его варианту, который действует как агонист одной или большего количества субъединиц рецептора IL-21 (IL-21R) (например, мутантов, мутеинов, аналогов, субъединиц, рецепторных комплексов, фрагментов, изоформ и их пептидомиметиков). Такие агенты могут поддерживать пролиферацию натуральных киллеров (NK) и цитотоксических (CD8⁺) Т-клеток. Зрелый IL-21 человека встречается в виде последовательности из 133 аминокислот (за вычетом сигнального пептида, состоящего из дополнительных 22 N-концевых аминокислот). Мутеин IL-21 представляет собой полипептид, в котором были сделаны специфические замены белка интерлейкина-21 с сохранением способности связывать IL-21R α , такие как описанные в патент США № 9388241. Мутеины IL-21 могут характеризоваться аминокислотными вставками, делециями, заменами и модификациями в одном или более сайтах или в других остатках цепи нативного полипептида IL-21. В соответствии с данным изобретением любые такие вставки, делеции, замены и модификации приводят к образованию мутеина IL-21, который сохраняет активность связывания IL-21R. Примеры мутеинов могут включать замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую человеческий IL-21, можно получить с помощью стандартных процедур, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Аминокислотная последовательность IL-21 человека (Gene ID 59067) находится в Genbank под номером доступа NC_000004.12. Аминокислотная последовательность IL-21 мыши (*Mus musculus*) (Gene ID 60505) находится в Genbank под номером доступа NC_000069.6.

IL-21 также может относиться к IL-21, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быков, свиней, лошадей и мышей. Варианты могут включать консервативно замещенные последовательности, что означает замену данного аминокислотного остатка остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замену одного полярного остатка на другой, например, замену между Lys и Arg; Glu и Asp; или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих сходные характеристики гидрофобности. Встречающиеся в природе варианты IL-21 также охватываются настоящим изобретением. Примерами таких вариантов являются белки, которые возникают в результате явлений альтернативного сплайсинга мРНК или в результате протеолитического расщепления белка IL-21, при этом свойство связывания IL-21 сохраняется. В результате альтернативного сплайсинга мРНК можно получить укороченный, но биологически активный белок IL-21. Вариации, связанные с протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах при экспрессии в различных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или большего количества концевых аминокислот из белка IL-21 (обычно от 1 до 10 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления конец белка можно модифицировать для изменения его физических свойств, например, с

помощью химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, *et al. Cancer* 1995. 76: 687-694). В некоторых вариантах осуществления конец или внутреннюю часть белка можно модифицировать дополнительными аминокислотами (Clark-Lewis, *et al. PNAS* 1993. 90:3574-3577).

В дополнительных вариантах осуществления способы, определенные в настоящем документе, включают IL-21 обычно в концентрации по меньшей мере 0,1 нг/мл, например, по меньшей мере 1,0 нг/мл (например, от 0,1 нг/мл до 1,000 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 100 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 50 нг/мл, от 2 нг/мл до 50 нг/мл, от 3 нг/мл до 10 нг/мл, от 4 нг/мл до 8 нг/мл, от 5 нг/мл до 10 нг/мл, от 6 нг/мл до 8 нг/мл, например, от 0,1 нг/мл до 10 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 5 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 10 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 20 нг/мл). В дополнительных вариантах осуществления способы, определенные в данном документе, включают IL-21 обычно в концентрации менее 100 нг/мл, например менее 50 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-21 составляет около 6 нг/мл, например, около 6,25 нг/мл.

В контексте данного документа термин «IL-2» относится к нативному или рекомбинантному IL-2 или его варианту, который действует как агонист одной или большего количества субъединиц рецептора IL-2 (IL-2R) (например, мутантов, мутеинов, аналогов, субъединиц, рецепторных комплексов, фрагментов, изоформ и их пептидомиметиков). Такие агенты могут поддерживать пролиферацию IL-2-зависимой линии клеток, STLL-2 (33; Американская коллекция типовых культур (ATCC®) TIB 214). Зрелый человеческий IL-2 встречается в виде последовательности из 133 аминокислот (за вычетом сигнального пептида, состоящего из дополнительных 20 N-концевых аминокислот), как описано у Fujita, *et al. Cell* 1986. 46.3:401-407. Мутеин IL-2 представляет собой полипептид, в котором были сделаны специфические замены белка интерлейкина-2 с сохранением способности связывать IL-2R β , такие как описанные в US 2014/0046026. Мутеины IL-2 могут характеризоваться аминокислотными вставками, делециями, заменами и модификациями в одном или более сайтах или в других остатках цепи нативного полипептида IL-2. В соответствии с данным изобретением любые такие вставки, делеции, замены и модификации приводят к образованию мутеина IL-2, который сохраняет активность связывания IL-2R β . Примеры мутеинов могут включать замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую человеческий IL-2, можно получить с помощью стандартных процедур, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Аминокислотная последовательность IL-2 человека (Gene ID 3558) находится в Genbank под номером доступа NP_000577.2 GI: 28178861. Аминокислотная последовательность IL-2 мыши (*Mus musculus*) (Gene ID 16183) находится в Genbank под номером доступа NP_032392.1 GI: 7110653.

IL-2 также может относиться к IL-2, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быков, свиней, лошадей и мышей. Варианты могут включать консервативно замещенные последовательности, что

означает замену данного аминокислотного остатка остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замену одного полярного остатка на другой, например, замену между Lys и Arg; Glu и Asp; или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих сходные характеристики гидрофобности. Встречающиеся в природе варианты IL-2 также охватываются настоящим изобретением. Примерами таких вариантов являются белки, которые возникают в результате явлений альтернативного сплайсинга мРНК или в результате протеолитического расщепления белка IL-2, при этом свойство связывания IL-2 сохраняется. В результате альтернативного сплайсинга мРНК можно получить укороченный, но биологически активный белок IL-2. Вариации, связанные с протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах при экспрессии в различных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или большего количества концевых аминокислот из белка IL-2 (обычно от 1 до 10 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления конец или внутреннюю часть белка можно модифицировать для изменения его физических свойств, например, с помощью химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, *et al. Cancer* 1995. 76: 687-694). В некоторых вариантах осуществления конец или внутреннюю часть белка можно модифицировать дополнительными аминокислотами (Clark-Lewis, *et al. PNAS* 1993. 90:3574-3577).

В некоторых вариантах осуществления способы, определенные в данном документе, включают IL-2, как правило, в концентрации по меньшей мере 10 МЕ/мл, например, по меньшей мере 100 МЕ/мл (например, от 10 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл, от 20 МЕ/мл до 800 МЕ/мл, от 25 МЕ/мл до 750 МЕ/мл, от 30 МЕ/мл до 700 МЕ/мл, от 40 МЕ/мл до 600 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 75 МЕ/мл до 250 МЕ/мл или от 100 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, например, от 10 МЕ/мл до 20 МЕ/мл, от 20 МЕ/мл до 30 МЕ/мл, от 30 МЕ/мл до 40 МЕ/мл, от 40 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 75 МЕ/мл, от 75 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 150 МЕ /мл, от 150 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 200 МЕ/мл до 500 МЕ/мл или от 500 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл). В некоторых вариантах осуществления способы, определенные в данном документе, включают IL-2, как правило, в концентрации менее 1000 МЕ/мл, например, менее 500 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-2 составляет около 100 МЕ/мл.

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

полипептид, в котором были сделаны специфические замены белка интерлейкина-4 с сохранением способности связывать IL-4R α , такие как описанные в патент США № 6313272. Мутеины IL-4 могут характеризоваться аминокислотными вставками, делециями, заменами и модификациями в одном или более сайтах или в других остатках цепи нативного полипептида IL-4. В соответствии с данным изобретением любые такие вставки, делеции, замены и модификации приводят к образованию мутеина IL-4, который сохраняет активность связывания IL-2R α . Примеры мутеинов могут включать замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую человеческий IL-4, можно получить с помощью стандартных процедур, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Аминокислотная последовательность человеческого IL-4 (Gene ID 3565) находится в Genbank под номером доступа NG_023252. Аминокислотная последовательность IL-4 мыши (*Mus musculus*) (Gene ID 16189) находится в Genbank под номером доступа NC_000077.6.

IL-4 также может относиться к IL-4, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быков, свиней, лошадей и мышей. Варианты могут включать консервативно замещенные последовательности, что означает замену данного аминокислотного остатка остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замену одного полярного остатка на другой, например, замену между Lys и Arg; Glu и Asp; или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих сходные характеристики гидрофобности. Встречающиеся в природе варианты IL-4 также охватываются настоящим изобретением. Примерами таких вариантов являются белки, которые возникают в результате явлений альтернативного сплайсинга мРНК или в результате протеолитического расщепления белка IL-4, при этом свойство связывания IL-4 сохраняется. В результате альтернативного сплайсинга мРНК можно получить укороченный, но биологически активный белок IL-4. Вариации, связанные с протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах при экспрессии в различных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или большего количества концевых аминокислот из белка IL-4 (обычно от 1 до 10 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления конец белка можно модифицировать для изменения его физических свойств, например, с помощью химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, *et al. Cancer* 1995. 76: 687-694). В некоторых вариантах осуществления конец или внутреннюю часть белка можно модифицировать дополнительными аминокислотами (Clark-Lewis, *et al. PNAS* 1993. 90:3574-3577).

В дополнительных вариантах осуществления способы, определенные в настоящем документе, включают IL-4 обычно в концентрации по меньшей мере 0,1 нг/мл, например, по меньшей мере 10 нг/мл (например, от 0,1 нг/мл до 1000 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 100

нг/мл, от 1,0 нг/мл до 50 нг/мл, от 2 нг/мл до 50 нг/мл, от 3 нг/мл до 40 нг/мл, от 4 нг/мл до 30 нг/мл, от 5 нг/мл до 20 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, например, от 0,1 нг/мл до 50 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 25 нг/мл, от 5 нг/мл до 25 нг/мл). В дополнительных вариантах осуществления способы, определенные в настоящем документе, обычно включают IL-4 в концентрации менее 100 нг/мл, например менее 50 нг/мл, в частности менее 20 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-4 составляет около 15 нг/мл.

Описанные в данном документе $\gamma\delta$ Т-клетки также могут быть генно-сконструированными для улучшения терапевтических свойств, например, для терапии CAR-T. Это включает создание сконструированных клеточных рецепторов, таких как химерные антигенные рецепторы (CAR) или сконструированные рецепторы Т-клеток (TCR), для перепрограммирования Т-клетки с новой специфичностью, например, специфичностью моноклональных антител. Сконструированный CAR или TCR может сделать Т-клетки специфичными к злокачественным клеткам и, следовательно, полезными для иммунотерапии рака. Например, Т-клетки могут распознавать раковые клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, такой как опухолеспецифический антиген, который не экспрессируется здоровыми соматическими клетками из рассматриваемой ткани, опухолеассоциированный антиген, который преимущественно сверхэкспрессируется на раковых клетках по сравнению со здоровыми соматическими клетками или антигенами, экспрессируемыми в контексте стрессовых событий, таких как окислительный стресс, повреждение ДНК, УФ-излучение, стимуляция рецептора EGF; или другие средства идентификации раковых и нераковых клеток. Таким образом, CAR-модифицированные Т-клетки можно использовать для адоптивной Т-клеточной терапии, например, пациентов со злокачественным новообразованием.

Следовательно, в одном варианте осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают трансдукцию композиции $\gamma\delta$ Т-клеток для экспрессии представляющего интерес поверхностного рецептора, такого как химерный антигенный рецептор (CAR), распознающий опухолевый антиген. Любой такой CAR может быть использован в настоящем изобретении, включая CAR, нацеленные на CD19 или другие известные опухолеассоциированные антигены.

Описано использование находящихся в крови $\gamma\delta$ Т-клеток для CAR-T-терапии. Однако некроветворные $\gamma\delta$ Т-клетки, полученные способом по изобретению, вероятно, будут особенно хорошими носителями для подходов CAR-T, поскольку их можно трансдуцировать с помощью химерных антигенспецифических рецепторов, сохраняя при этом свои врожденные способности узнавать трансформированные клетки и, вероятно, обладают лучшими способностями проникновения и удержания в опухоли, чем находящиеся в крови $\gamma\delta$ Т-клетки или обычные системные $\alpha\beta$ Т-клетки. Кроме того, отсутствие у них MHC-зависимой презентации антигена снижает вероятность реакции «трансплантат против хозяина» и позволяет им нацеливаться на опухоли, экспрессирующие низкие уровни MHC. Аналогичным образом, их независимость от обычной костимуляции, например, посредством вовлечения CD28, , усиливает

нацеливание на опухоли, экспрессирующие низкие уровни лигандов для костимулирующих рецепторов.

Согласно дополнительному аспекту изобретения предусмотрен способ конструирования $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии:

- (i) получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками;
 - (ii) трансдукцию композиции для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), распознающего опухолевый антиген; и
 - (iii) культивирование трансдуцированной композиции для размножения сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток,
- при этом стадии (ii) и (iii) могут быть выполнены в любом порядке или одновременно.

В одном варианте осуществления стадию (ii) выполняют до стадии (iii). Таким образом, согласно этому варианту осуществления трансдукцию композиции осуществляют в отсутствие каких-либо питающих клеток, которые могут присутствовать в культуре. Следовательно, количество материала, используемого для трансдукции, может быть уменьшено за счет трансдукции только $\gamma\delta$ Т-клеток. В альтернативном варианте осуществления стадию (ii) выполняют одновременно со стадией (iii). Согласно этому варианту осуществления трансдукцию композиции осуществляют в присутствии любых питающих клеток в культуре. Следовательно, хотя количество материала для трансдукции может потребоваться увеличить по сравнению с тем, где стадию (ii) выполняют перед стадией (iii), следует понимать, что обработка может быть уменьшена, что приведет к более простому способу в целом и уменьшению потерь, которые могут быть связаны с указанной обработкой.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления стадия (iii) включает культивирование трансдуцированной композиции в присутствии питающих клеток. В дополнительных вариантах осуществления способ согласно этому аспекту включает любую из стадий, описанных выше.

Неожиданно было обнаружено, что композиция, обогащенная $\gamma\delta$ Т-клетками, особенно $\gamma\delta$ Т-клетками, полученными из некроветворной ткани, не требует стимуляции TCR (рецептора Т-клеток), в отличие от ранее известных способов трансдукции Т-клеток, включая трансдукцию $\gamma\delta$ Т-клеток, которые требуют стимуляции TCR, например, антитело против CD3, такое как ОКТ-3, или антитело против $\gamma\delta$ TCR, такое как антитело против V δ 1. Таким образом, способы, описанные в настоящем документе, включают преобразование композиции $\gamma\delta$ Т-клеток в отсутствие стимуляции TCR.

В определенных вариантах осуществления композиция трансдуцируется с использованием вирусного вектора. Такие вирусные векторы известны в данной области техники, и специалист в данной области техники сможет распознать подходящий вирусный вектор, который будет использоваться, в зависимости от трансдуцируемых клеток. В одном варианте осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или ретровирусный вектор, такой как гаммаретровирусный вектор.

В дополнительном варианте осуществления вирусный вектор представляет собой гаммаретровирусный вектор, такой как вирус стволовых клеток мыши (MSCV) или вирус мышинового лейкоза Молони (MLV). В еще одном варианте осуществления вирусный вектор псевдотипирован с оболочкой, отличной от вируса везикулярного стоматита-G (VSV-G), например, с бетаретровирусной оболочкой, такой как эндогенный вирус павиана (BaEV) или RD114.

В некоторых вариантах осуществления стадию (ii) выполняют с использованием от 1×10^6 до 1×10^8 TU/мл, например, около 1×10^6 , около 5×10^6 , около 1×10^7 , около 5×10^7 или около 1×10^8 TU/мл вирусного вектора. В конкретном варианте осуществления стадию (ii) выполняют с использованием 1×10^7 TU/мл вирусного вектора. В других вариантах осуществления стадию (ii) выполняют с использованием MOI вирусного вектора от 0,5 до 50, например, MOI около 0,5, около 1, около 1,5, около 2,5, около 5, около 10, около 25, около 40 или около 50. В одном варианте осуществления стадию (ii) выполняют с использованием MOI вирусного вектора 2,5. В другом варианте осуществления стадию (ii) выполняют с использованием MOI вирусного вектора, равного 5. В дополнительном варианте осуществления стадию (ii) выполняют с использованием MOI вирусного вектора, равного 10.

В одном варианте осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой антиген, ассоциированный с солидной опухолью. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления опухоль и/или рак представляют собой солидную опухоль. Конститутивная экспрессия CD70, члена семейства некротических опухолей, была описана как при гематологическом, так и при солидном раке, где она увеличивает выживаемость опухолевых клеток и регуляторных Т-клеток в микроокружении опухоли путем передачи сигналов через его рецептор CD27. Таким образом, в дополнительном варианте осуществления солидная опухоль представляет собой опухоль CD70⁺. Следует понимать, что CD70 можно использовать для нацеливания сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток на указанные опухоли. Следовательно, в еще одном варианте осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой CD70.

В альтернативном варианте осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой мезотелин. Мезотелин представляет собой белок массой 40 кДа, который экспрессируется в мезотелиальных клетках и сверхэкспрессируется в нескольких опухолях, включая мезотелиому, рак яичников, аденокарциному поджелудочной железы, аденокарциному легких и холангиокарциному. Поэтому он был предложен в качестве опухолевого маркера или опухолеассоциированного антигена, на который можно воздействовать при иммунотерапии (Hassan *et al. Clin. Cancer Res.*, 2004, 10(12):3937-3942). Экспрессия мезотелина в этих опухолях может способствовать имплантации и распространению опухолей по брюшине за счет клеточной адгезии (Rump *et al., Biological Chemistry*, 2004, 279(10):9190-9198).

Согласно одному аспекту изобретения предусмотрена размноженная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, полученная способами, описанными в настоящем документе. Согласно

дополнительному аспекту предусмотрена сконструированная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, полученная способами, описанными в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления размноженная/сконструированная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток содержит более 50% $\gamma\delta$ Т-клеток, например, более 75% $\gamma\delta$ Т-клеток, в частности более 85% $\gamma\delta$ Т-клеток. В одном варианте осуществления размноженная/сконструированная популяция включает клетки V δ 1, при этом менее 50%, например менее 25% клеток V δ 1, экспрессируют TIGIT. В одном варианте осуществления размноженная/сконструированная популяция включает клетки V δ 1, при этом более 50%, например, более 60% клеток V δ 1 экспрессируют CD27.

Размноженная/сконструированная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, полученная способами, описанными в настоящем документе, может быть использована в качестве лекарственного средства, например, для адоптивной Т-клеточной терапии. Это предполагает перенос размноженной/сконструированной популяции, полученной с помощью этих способов, пациенту. Терапия может быть аутологичной, то есть $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть перенесены обратно тому же пациенту, от которого они были получены, или терапия может быть аллогенной, то есть $\gamma\delta$ Т-клетки от одного человека могут быть перенесены другому пациенту. В случаях, связанных с аллогенным переносом, размноженная/сконструированная популяция может по сути не содержать $\alpha\beta$ Т-клеток. Например, $\alpha\beta$ Т-клетки могут быть удалены из размноженной/сконструированной популяции, например, после проектирования с использованием любых подходящих средств, известных в данной области техники (например, путем отрицательной селекции, например, с использованием магнитных шариков). Способ лечения может включать: предоставление образца некроветворной ткани, полученного от индивидуума-донора; размножение и/или конструирование $\gamma\delta$ Т-клеток, как описано в настоящем документе, для получения размноженной/сконструированной популяции; и введение размноженной/сконструированной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток индивидууму-реципиенту.

Пациент или субъект, подлежащий лечению, предпочтительно представляет собой больного раком человека (например, больного раком человека, проходящего лечение по поводу солидной опухоли) или инфицированного вирусом пациента (например, ЦМВ-инфицированного или ВИЧ-инфицированного пациента). В некоторых случаях пациент имеет солидную опухоль и/или проходит лечение от солидной опухоли. Поскольку они обычно находятся в некроветворных тканях, тканевые Т-клетки V δ 1 также с большей вероятностью приживаются и сохраняются внутри опухолевых масс, чем их системные коллеги, находящиеся в крови, и адоптивный перенос этих клеток, вероятно, будет более эффективным при нацеливании на солидные опухоли и, возможно, на другие иммунопатологии, не связанные с кроветворной тканью.

Поскольку $\gamma\delta$ Т-клетки не ограничены МНС, они не распознают хозяина, которому они передаются, как чужеродного, а это означает, что они с меньшей вероятностью вызовут реакцию «трансплантат против хозяина». Это означает, что их можно использовать «серийно» и передавать любому получателю, например, для аллогенной

адоптивной Т-клеточной терапии.

$\gamma\delta$ Т-клетки, полученные способами, описанными в настоящем документе, экспрессируют NKG2D и реагируют на лиганд NKG2D (например, MICA), который тесно связан со злокачественными новообразованиями. Они также обладают цитотоксическим профилем в отсутствие какой-либо активации и, следовательно, могут быть эффективны при уничтожении опухолевых клеток. Например, размноженные/сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки, полученные, как описано в настоящем документе, могут экспрессировать один или несколько, предпочтительно все, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, CCL4, IL-13, гранулизин, гранзим А и В и перфорин при отсутствии какой-либо активации. IL-17A может не экспрессироваться.

Таким образом, результаты, представленные в настоящем документе, предоставляют убедительные доказательства практичности и пригодности для клинического применения размноженных/сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток, полученных способами, описанными в настоящем документе, в качестве «готового» иммунотерапевтического реагента. Эти клетки обладают свойством врожденного уничтожения, не имеют ограничений МНС и демонстрируют улучшенный хоуминг в опухоли и/или удержание внутри них, чем другие Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения индивидуума с солидной опухолью в некроветворной ткани может включать: размножение/конструирование $\gamma\delta$ Т-клеток из образца от индивидуума, как описано в настоящем документе, для получения размноженной/сконструированной популяции; и введение индивидууму размноженной/сконструированной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток. В альтернативных вариантах осуществления способ лечения включает размножение/конструирование $\gamma\delta$ Т-клеток из образца от другого индивидуума, как описано в настоящем документе, для получения размноженной/сконструированной популяции; и введение размноженной/сконструированной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток индивидууму с солидной опухолью. В одном варианте осуществления количество размноженных/сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток, вводимых индивидууму, представляет собой терапевтически эффективное количество.

В дополнительных вариантах осуществления способ лечения и/или терапевтически эффективное количество включают те, что раскрыты в WO 2020095058, содержание которой включено во всей полноте.

Фармацевтические композиции могут включать размноженные и/или сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки, как описано в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Такие композиции могут содержать 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 средства, такие как ЭДТА или глутатион; адьюванты (например, гидроксид алюминия); и

консерванты. Растворы для криоконсервации, которые можно применять в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают, например, ДМСО. Композиции могут быть составлены, например для внутривенного введения.

Таким образом, согласно другому аспекту изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая популяцию размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток или популяцию сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток, как описано в настоящем документе.

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

Согласно еще одному аспекту изобретения предусмотрена популяция размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, популяция сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток или фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства. В другом аспекте предусмотрена размноженная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, сконструированная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток или фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, для применения при лечении рака.

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

В контексте настоящего документа термин «около» включает в себя значение вплоть до 10% больше и вплоть до 10% меньше, чем указанное значение, предпочтительно, вплоть до 5% больше и вплоть до 5% меньше, чем указанное значение, особенно указанное значение. Термин «между» включает в себя значения в указанных границах.

Некоторые аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения далее будут проиллюстрированы в качестве следующих примеров и со ссылкой на графические материалы, описанные выше.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Размножение $\gamma\delta$ -клеток, полученных из кожи, с использованием питающих клеток.

Находящиеся в коже клетки выделяли, как описано ранее в WO2020095058 и WO2020095059. Находящиеся в коже лимфоциты размораживали и немедленно обрабатывали для удаления питающих клеток $\alpha\beta$ Т-клеток с получением культур, обогащенных $\gamma\delta$ Т-клетками. Затем культуры, обедненные $\alpha\beta$, размножали в присутствии облученной популяции питающих клеток. В этом эксперименте были опробованы облученные питающие клетки различного происхождения; аллогенные лимфоциты периферической крови (PBL), аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), аллогенные PBMC, активированные против CD3 CD28 (Act PBMC), или аллогенные изолирующие культуры кожи. Затем совместные культуры инкубировали в течение 7 дней перед сбором и анализом потока на маркеры клеточной линии и ядерную экспрессию Ki67. Измеряли уровень экспрессии внутриядерного Ki67 в $\gamma\delta$ Т-клетках, а также общее количество V δ 1 $\gamma\delta$ Т-клеток на лунку. Как внутриклеточная экспрессия Ki67

$\gamma\delta$ -Т-клеток, так и общее количество V δ 1 $\gamma\delta$ -Т-клеток были самыми высокими в культурах, стимулированных облученными выделенными клетками кожи в качестве питающих клеток, что указывает на пролиферацию $\gamma\delta$ Т-клеток. Эти результаты демонстрируют превосходство находящихся в коже лимфоцитов над лейкоцитами крови в качестве компонента питающих клеток в стимулировании пролиферации $\gamma\delta$ Т-клеток, полученных из кожи. (фиг. 1А-В)

В отдельных экспериментах находящиеся в коже лимфоциты были разморожены и немедленно обработаны с помощью двух различных стратегий селекции для получения культур, обогащенных $\gamma\delta$ Т-клетками и обедненных $\alpha\beta$ Т-клетками. Обогащение $\gamma\delta$ Т-клетками осуществляли либо путем положительной селекции $\gamma\delta$ Т-клеток (фиг. 2А-В), либо посредством отрицательной селекции $\gamma\delta$ Т-клеток путем положительного отбора фракции $\alpha\beta$ Т-клеток (фиг. 3А-В). Затем эти культуры размножали либо без присутствия $\alpha\beta$ Т-клеток в качестве питающих клеток, либо в виде набора исходной популяции, выраженной в % популяции клеток, отличных от $\alpha\beta$ Т-клеток, по отношению к аутологичным питающим клеткам $\alpha\beta$ Т-клеток (1%, 5%, 10% 20% или 40% содержания клеток, отличных от $\alpha\beta$ -клеток, в D0, а остальная часть культуры состоит из аутологичных питающих клеток). Для положительно отобранных $\gamma\delta$ Т-клеток отрицательная фракция, содержащая преимущественно $\alpha\beta$ Т-клетки кожи, служила слоем питающих клеток. В этих экспериментах слои питающих клеток не облучались. Для отрицательно отобранных $\gamma\delta$ Т-клеток положительно выбранные $\alpha\beta$ Т-клетки служили слоем питающих клеток. Культуры впоследствии размножали в течение 14 дней в присутствии цитокинов роста ИЛ-15 и ИЛ-21. После сбора на D14 регистрировали процентное содержание $\gamma\delta$ Т-клеток фракции лимфоцитов CD45, а также общее кратное увеличение роста $\gamma\delta$ Т-клеток от D0 до D14. Результаты ясно показывают повышенный кратный рост $\gamma\delta$ Т-клеток в течение периода размножения, когда питающие клетки присутствуют в культуре. 21-дневное размножение превосходило 14-дневное размножение с точки зрения общего кратного роста $\gamma\delta$ Т-клеток во всех случаях. Как отрицательная, так и положительная стратегии обогащения $\gamma\delta$ Т-клеток на D0 привели к успешному размножению как в культурах питающих клеток, так и в культурах, не содержащих питающих клеток.

Пример 2. Трансдукция $\gamma\delta$ -клеток кожного происхождения с использованием CD19 CAR

Находящиеся в коже лимфоциты размораживали и культивировали в течение 7 дней в присутствии ИЛ-15 и ИЛ-21. На 7-й день все клетки собирали и трансдуцировали вектором, кодирующим конструкцию CAR, специфичную для CD19. Затем клетки размножали еще в течение 7 дней в присутствии ИЛ-15 и ИЛ-21 перед сбором и криоконсервацией. Трансдукционное вмешательство не влияло на размножение находящихся в коже $\gamma\delta$ Т-клеток (данные не показаны). Для функциональных анализов криоконсервированные клетки размораживали и $\alpha\beta$ Т-клетки сортировали посредством обработки MACS позитивной селекции, получая положительно отобранные находящиеся в коже $\alpha\beta$ Т-клетки и отрицательно отобранные находящиеся в коже $\gamma\delta$ Т-клетки.

Популяции $\gamma\delta$ Т-клеток или $\alpha\beta$ Т-клеток совместно культивировали вместе с линией гематологических опухолевых клеток NALM6 при различных соотношениях эффектор:мишень. Затем совместные культуры инкубировали в течение 18 часов и лизис клеток-мишеней определяли с помощью окрашивания SYTOX™ (Thermofisher) методом проточной цитометрии. CAR-трансдуцированные находящиеся в коже $\gamma\delta$ Т-клетки продемонстрировали высокую функциональность против клеточной линии NALM6. Этот уровень функциональности был сопоставим с уровнем функциональности соответствующих донору CAR-трансдуцированных $\alpha\beta$ Т-клеток кожи. (фиг. 4)

В отдельных экспериментах находящиеся в коже лимфоциты были разморожены и немедленно обработаны для истощения $\alpha\beta$ Т-клеток посредством положительной селекции $\alpha\beta$ Т-клеток с помощью MACS. Эти популяции, обедненные $\alpha\beta$ Т-клетками и обогащенные $\gamma\delta$ Т-клетками, культивировали в течение 2 дней в присутствии IL-15 и IL-21 перед генной инженерией. Через 2 дня культуры собирали и трансдуцировали вектором, кодирующим CD19-специфическую конструкцию CAR. Для 2 из 4 доноров были созданы имитационные культуры трансдукции, в которых клетки подвергались тому же протоколу трансдукции, но без присутствия вектора. После трансдукции клетки впоследствии размножали в течение следующих 12 дней, после чего их собирали, фенотипировали с помощью проточной цитометрии на предмет экспрессии клеточной линии и CD19-специфического CAR, а затем криоконсервировали. Результаты показывают, что трансдуцированные $\gamma\delta$ Т-клетки экспрессируют конструкцию CAR, специфичную для CD19, в то время как имитационные трансдуцированные контрольные клетки (которые были применимы) не экспрессируют (фиг. 5A). Более того, после того, как криоконсервированные клетки были разморожены и культивированы в течение следующих 7 дней с IL-15 и IL-21, процент CAR⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток стал стабильным (фиг. 5B). Криоконсервированные клетки также использовались в анализах функциональности. Клетки размораживали и культивировали вместе с линией гематологических опухолевых клеток NALM6 при различных соотношениях эффектор:мишень в течение 18 часов. Результаты показывают, что у двух протестированных доноров трансдуцированные CAR $\gamma\delta$ Т-клетки имели улучшенные показатели цитотоксичности в отношении NALM6 по сравнению с соответствующими нетрансдуцированными контролями (фиг. 6).

Пример 3. Трансдукция и размножение $\gamma\delta$ -клеток кожного происхождения с использованием мезотелина-CAR

Находящиеся в коже лимфоциты были разморожены и немедленно обработаны для истощения $\alpha\beta$ Т-клеток посредством положительной селекции $\alpha\beta$ Т-клеток с помощью MACS. Эти популяции, обедненные $\alpha\beta$ Т-клетками и обогащенные $\gamma\delta$ Т-клетками, культивировали в течение 2 дней в присутствии IL-15 и IL-21 перед генной инженерией. На день 2 клетки собирали из культуры и трансдуцировали псевдотипированным вектором γ -ретровируса RD-114, кодирующим мезотелин-специфическую конструкцию CAR. В качестве контроля были созданы имитационные культуры трансдукции, в которых клетки подвергались тому же протоколу трансдукции, но без присутствия вектора. Клетки

впоследствии размножали в течение следующих 12 дней чего их собирали, фенотипировали с помощью проточной цитометрии на предмет экспрессии клеточной линии и CAR, а затем криоконсервировали. Трансдуцированные клетки экспрессировали конструкцию CAR, тогда как имитация трансдуцированных контрольных клеток этого не делала (фиг. 7). После размораживания как клетки с имитацией, так и трансдуцированные CAR клетки демонстрировали высокую жизнеспособность (согласно подсчету жизнеспособных клеток NC250) (фиг. 8А).

Трансдуцированные клетки и клетки с имитацией трансдукции затем размораживали и немедленно тестировали на цитотоксичность в отношении клеточных линий солидной опухоли (аденокарциномы), экспрессирующих мезотелин (Hela и SCOV-3). В дополнение к трансдуцированным $\gamma\delta$ Т-клеткам $\alpha\beta$ Т-клетки, полученные из недонорских сопоставленных РВМС, трансдуцированные тем же связующим веществом и размноженные в IL-2, также были протестированы на цитотоксичность против тех же линий клеток-мишеней солидной опухоли. Клетки культивировали при соотношениях эффектор:мишень 5:1, 2,5:1, 1,25:1, 0,625:1, 0,312:1 и 0,156:1. Совместные культуры цитотоксичности инкубировали в течение 18 часов перед анализом конечной точки. Цитотоксичность клеток-мишеней солидной опухоли определяли путем подсчета жизнеспособных мишеней с использованием системы анализа CellTitre GLO® (Promega). $\gamma\delta$ Т-клетки, трансдуцированные CAR, демонстрировали улучшенное уничтожение клеточных линий HeLa и SCOV-3 по сравнению с контрольными клетками с имитацией трансдукции (фиг. 8В-С). Поскольку нетрансдуцированные $\gamma\delta$ -Т-клетки обладают некоторой активностью в отношении линий опухолевых клеток, они проявляют такую же цитотоксичность в отношении линий опухолевых клеток, что и трансдуцированные CAR $\alpha\beta$ -Т-клетки. Однако трансдуцированные CAR $\gamma\delta$ Т-клетки демонстрируют увеличение цитотоксичности по сравнению с нетрансдуцированными $\gamma\delta$ -Т-клетками и трансдуцированными CAR $\alpha\beta$ Т-клетками.

Пример 4. Находящиеся в коже клетки выделяли и замораживали, как описано в примере 1. После оттаивания $\gamma\delta$ Т-клетки обогащали посредством отрицательной селекции посредством активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) и затем совместно культивировали с множеством различных аутологичных положительно отобранных популяций $\alpha\beta$ Т-клеток и влияние совместного культивирования с $\alpha\beta$ Т-клетками на скорость размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, измеренную в течение 14 и 21 дней культивирования. Сначала $\gamma\delta$ Т-клетки обогащали из замороженных выделенных клеток путем истощения $\alpha\beta$ Т-клеток посредством MACS. Это привело к образованию популяций нетронутых (т.е. немеченных какими-либо магнитно-мечеными антителами) $\gamma\delta$ и TCR-отрицательных клеток. Эти популяции, обогащенные $\gamma\delta$ -Т-клетками, затем совместно культивировали с аутологичными CD4- $\alpha\beta$ -Т-клетками («подслой CD4»), CD8- $\alpha\beta$ -Т-клетками («подслой CD8») или с CD4- и CD8- $\alpha\beta$ -Т-клетками («подслой $\alpha\beta$). Все слои питающих клеток были очищены от находящихся в коже клеток путем селекции MACS с положительной меткой. Во всех совместных культурах клетки выращивали в

соотношении 10% популяции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками, а остальные 90% культуры составляли слой аутологичных питающих клеток, при этом культуры обрабатывались в среде TechMACS с добавлением 5% аллогенной плазмы и 80 нг/мл IL-15 и 11,25 нг/мл IL-21. Затем культуры размножали в течение 14 или 21 дня и размножение $\gamma\delta$ Т-клеток в каждой культуральной установке регистрировали в каждый момент времени. Культуры подвергались 48-часовому режиму питания с удалением 50% среды и пополнением 50% среды с добавлением цитокинов, достаточных для возврата культуры к исходной концентрации цитокинов. Питающие клетки не добавляли в культуры после установки D0. Были созданы контрольные популяции культур, обогащенных $\gamma\delta$ Т-клетками, размножавшихся без добавления каких-либо питающих клеток $\alpha\beta$ («только $\gamma\delta$ »).

Кратное размножение $\gamma\delta$ Т-клеток усиливалось при совместном культивировании с любой из тестируемых культур питающих клеток $\alpha\beta$ -Т-клеток. Использование обогащенных CD4 $\alpha\beta$ Т-клеток вызывало наибольшее кратное размножение $\gamma\delta$ в течение как 14, так и 21 дня в культуре. Результаты показывают, что $\alpha\beta$ Т-клетки служат эффективным слоем питающих клеток, способствующим размножению $\gamma\delta$ Т-клеток, причем CD4 $\alpha\beta$ Т-клетки превосходят CD8 $\alpha\beta$ Т-клетки в стимулировании размножения (фиг. 9).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии:
 - (i) получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками; и
 - (ii) культивирование композиции в присутствии питающих клеток, причем питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 4:1 (питающие клетки: $\gamma\delta$ Т-клетки).
2. Способ размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии:
 - (i) получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками; и
 - (ii) культивирование композиции в присутствии питающих клеток и среды, содержащей IL-15 и IL-21, причем питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 3:2 (питающие клетки: $\gamma\delta$ Т-клетки).
3. Способ размножения $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии:
 - (i) получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками за счет истощения $\alpha\beta$ Т-клеток; и
 - (ii) культивирование композиции в присутствии питающих клеток, причем питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 3:2 (питающие клетки: $\gamma\delta$ Т-клетки).
4. Способ по любому из пп. 1-3, где питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 4:1 (питающие клетки : $\gamma\delta$ Т-клетки).
5. Способ по любому из пп. 1-4, где питающие клетки присутствуют в соотношении по меньшей мере 10:1 (питающие клетки : $\gamma\delta$ Т-клетки).
6. Способ по любому из пп. 1-5, где питающие клетки присутствуют в соотношении от около 10:1 до около 99:1 (питающие клетки : $\gamma\delta$ Т-клетки).
7. Способ по любому из пп. 1-6, где питающие клетки содержат $\alpha\beta$ Т-клетки.
8. Способ по п. 7, где $\alpha\beta$ Т-клетки содержат CD4 Т-клетки.
9. Способ по п. 7 или п. 8, где питающие клетки дополнительно содержат естественные клетки-киллеры (NK).
10. Способ по любому из пп. 1-9, где питающие клетки облучены.
11. Способ по любому из пп. 1-10, где питающие клетки получены из некроветворной крови.
12. Способ по п. 11, где питающие клетки получены из кожи.
13. Способ по любому из пп. 1-12, где питающие клетки получены из одного донора.
14. Способ по любому из пп. 1-12, где питающие клетки получены из нескольких доноров.
15. Способ по любому из пп. 1-14, где $\gamma\delta$ Т-клетки получены из одного донора.
16. Способ по любому из пп. 1-14, где $\gamma\delta$ Т-клетки получены из нескольких доноров.
17. Способ по любому из пп. 1-16, где питающие клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки получены от одного и того же донора(-ов).

18. Способ по любому из пп. 1-16, где питающие клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки получены из разных доноров.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где способ включает удаление питающих клеток из размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток путем истощения $\alpha\beta$ Т-клеток.

20. Способ по любому из пп. 1-18, где способ включает удаление питающих клеток из размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток путем положительной селекции $\gamma\delta$ Т-клеток.

21. Способ конструирования $\gamma\delta$ Т-клеток, причем указанный способ включает стадии:

(i) получение композиции, обогащенной $\gamma\delta$ Т-клетками;

(ii) трансдукцию композиции для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), распознающего опухолевый антиген, в отсутствие стимуляции TCR; и

(iii) культивирование трансдуцированной композиции для размножения сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток,

при этом стадии (ii) и (iii) могут быть выполнены в любом порядке или одновременно.

22. Способ по п. 21, где стадию (ii) выполняют перед стадией (iii).

23. Способ по п. 21, где стадию (ii) выполняют одновременно со стадией (iii).

24. Способ по любому из пп. 21-23, где композиция трансдуцируется с использованием вирусного вектора, такого как ретровирусный вектор, такой как гаммаретровирусный вектор или лентивирусный вектор.

25. Способ по п. 24, где вирусный вектор представляет собой гаммаретровирусный вектор, такой как вирус стволовых клеток мыши (MSCV) или вирус мышиного лейкоза Молони (MLV).

26. Способ по п. 24 или п. 25, где вирусный вектор псевдотипирован с оболочкой, отличной от вируса везикулярного стоматита-G (VSV-G), например, с бетаретровирусной оболочкой, такой как эндогенный вирус павиана (BaEV) или RD114.

27. Способ по любому из пп. 24-26, где стадию (ii) выполняют с использованием 1×10^7 ME/мл вирусного вектора.

28. Способ по любому из пп. 21-27, где опухолевый антиген представляет собой опухолеспецифический антиген, который не экспрессируется нормальными соматическими клетками ткани субъекта.

29. Способ по любому из пп. 21-27, где опухолевый антиген представляет собой опухолеассоциированный антиген, который преимущественно сверхэкспрессируется на раковых клетках по сравнению со здоровыми соматическими клетками.

30. Способ по любому из пп. 21-27, где опухолевый антиген представляет собой антиген, экспрессируемый в контексте стрессовых событий, таких как окислительный стресс, повреждение ДНК, УФ-излучение, стимуляция рецептора EGF.

31. Способ по любому из пп. 21-30, где опухолевый антиген представляет собой антиген, связанный с солидной опухолью.

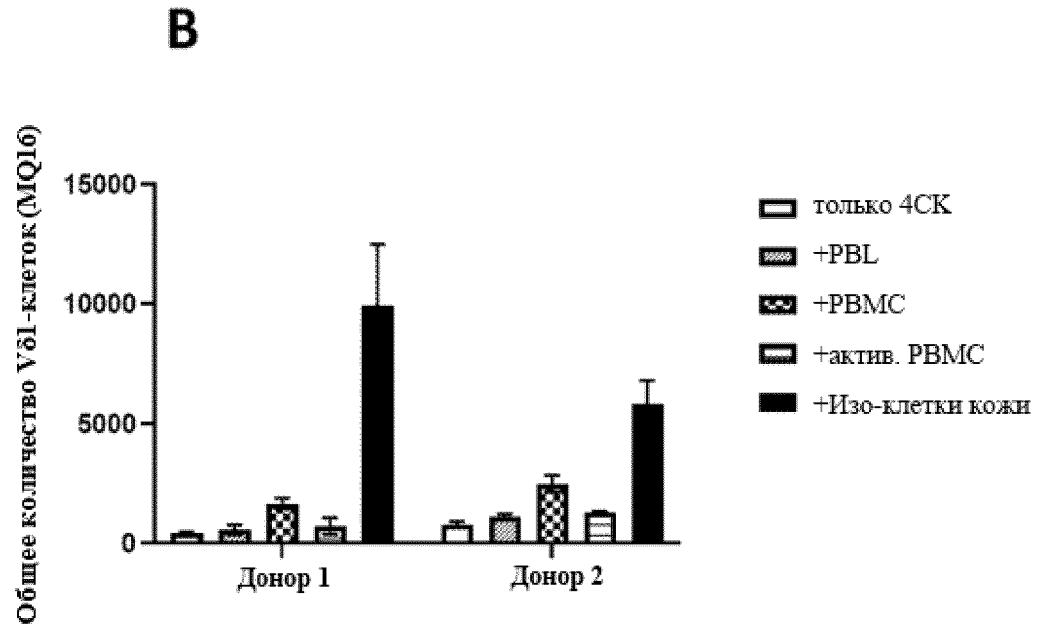
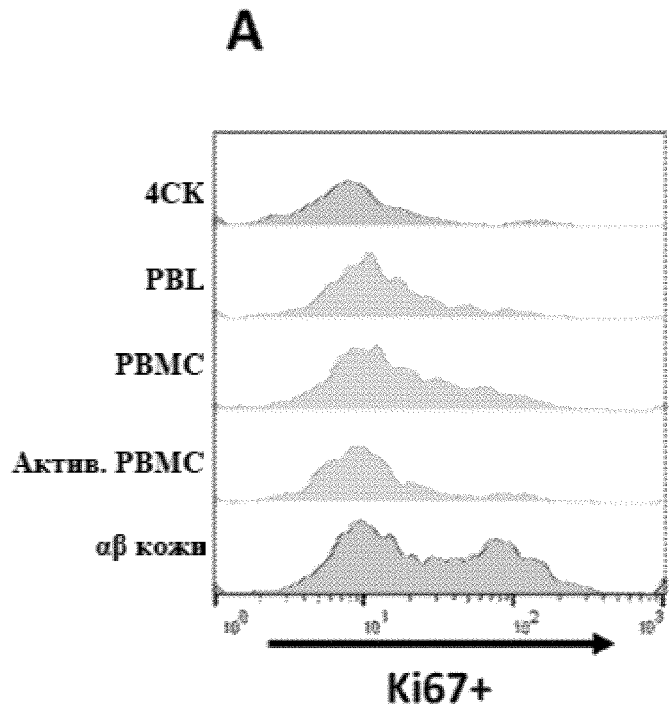
32. Способ по п. 31, где солидная опухоль представляет собой мезотелин⁺ опухоль.

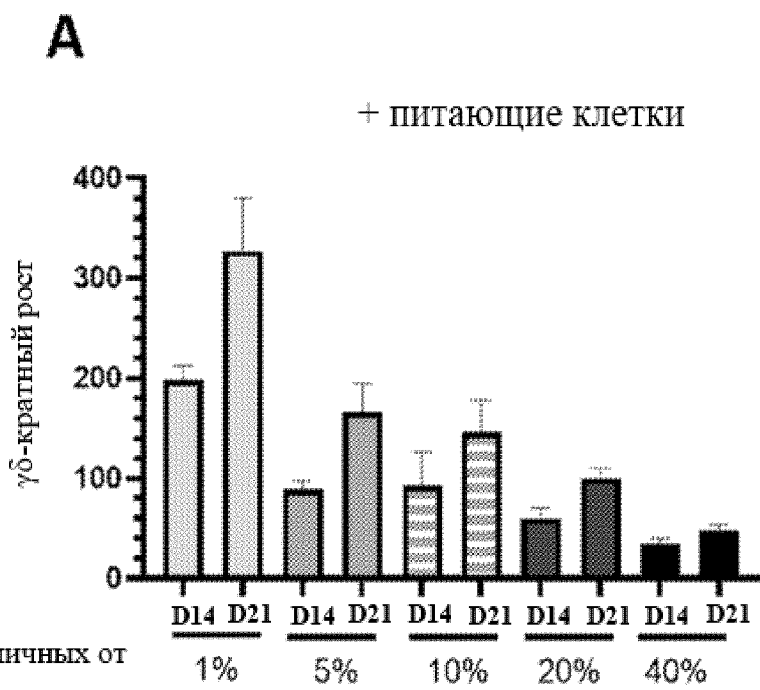
33. Способ по любому из пп. 21-32, где опухолеассоциированный антиген представляет собой мезотелин.
34. Способ по любому из пп. 21-33, где стадия (iii) включает культивирование трансдуцированной композиции в отсутствие питающих клеток.
35. Способ по любому из пп. 21-33, где стадия (iii) включает культивирование трансдуцированной композиции в присутствии питающих клеток.
36. Способ по п. 32, включающий стадии способа по любому из пп. 1-20.
37. Способ по любому из пп. 1-36, где стадия (i) включает удаление $\alpha\beta$ Т-клеток из смешанной популяции клеток, полученной из исходного образца.
38. Способ по любому из пп. 1-36, где стадия (i) включает положительную селекцию $\gamma\delta$ Т-клеток из смешанной популяции клеток, полученной из исходного образца.
39. Способ по п. 37 или п. 38, где исходный образец представляет собой кожу человека.
40. Способ по любому из пп. 37-39, где исходный образец представляет собой некроветворную ткань.
41. Способ по п. 40, где исходный образец представляет собой кожу.
42. Способ по любому из пп. 1 или 3-41, где композиция культивирована в среде, содержащей ИЛ-15 или ИЛ-21.
43. Способ по п. 42, где среда содержит ИЛ-15 и ИЛ-21.
44. Способ по любому из пп. 42 или 43, где среда дополнительно содержит ИЛ-2 и/или ИЛ-4.
45. Способ по любому из пп. 1-44, где способ включает культивирование композиции в течение от 7 до 21 дня.
46. Способ по любому из пп. 1-45, где способ включает культивирование композиции в течение около 10, 11, 12, 13 или 14 дней.
47. Способ по любому из пп. 1-42, где размножение популяции $\gamma\delta$ Т-клеток обеспечивает по меньшей мере 5-кратное, особенно по меньшей мере 10-кратное, в частности по меньшей мере 20-кратное, такое как по меньшей мере 50-кратное, например по меньшей мере 100-кратное количество $\gamma\delta$ Т-клеток.
48. Способ по любому из пп. 1-47, где способ включает замораживание размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток.
49. Размноженная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, которую можно получить, например, полученная способом по любому из пп. 1-20 или 36-48.
50. Сконструированная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, которую можно получить, например, полученная способом по любому из пп. 21-48.
51. Фармацевтическая композиция, содержащая размноженную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток по п. 48 или сконструированную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток по п. 50.
52. Применение размноженной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток по п. 49, сконструированной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток по п. 50 или фармацевтической композиции по п. 51 в качестве лекарственного средства.

53. Применение размноженной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток по п. 49, сконструированной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток по п. 50 или фармацевтической композиции по п. 51 для лечения рака.

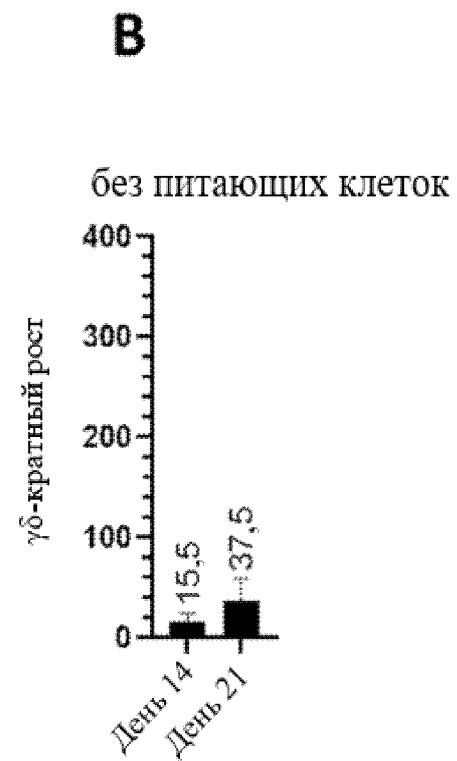
54. Применение размноженной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, сконструированной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток или фармацевтической композиции по п. 53, где рак представляет собой солидную опухоль.

По доверенности





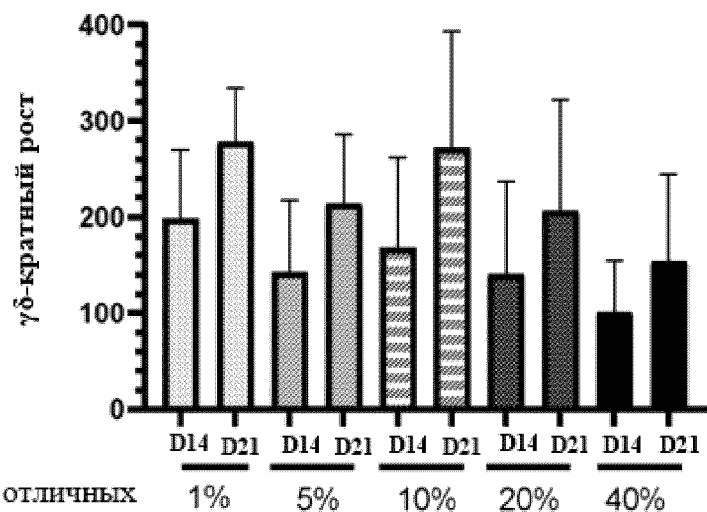
Содержание клеток, отличных от αβ, в день D0



Размножение положительной селекцией γδ

A

+ питающие клетки

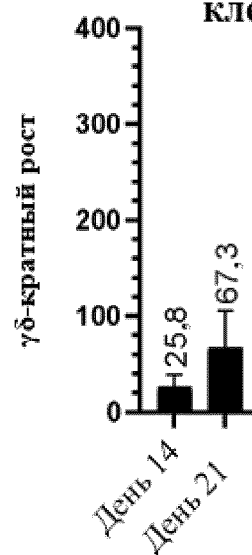


Содержание клеток, отличных от $\alpha\beta$, в день D0

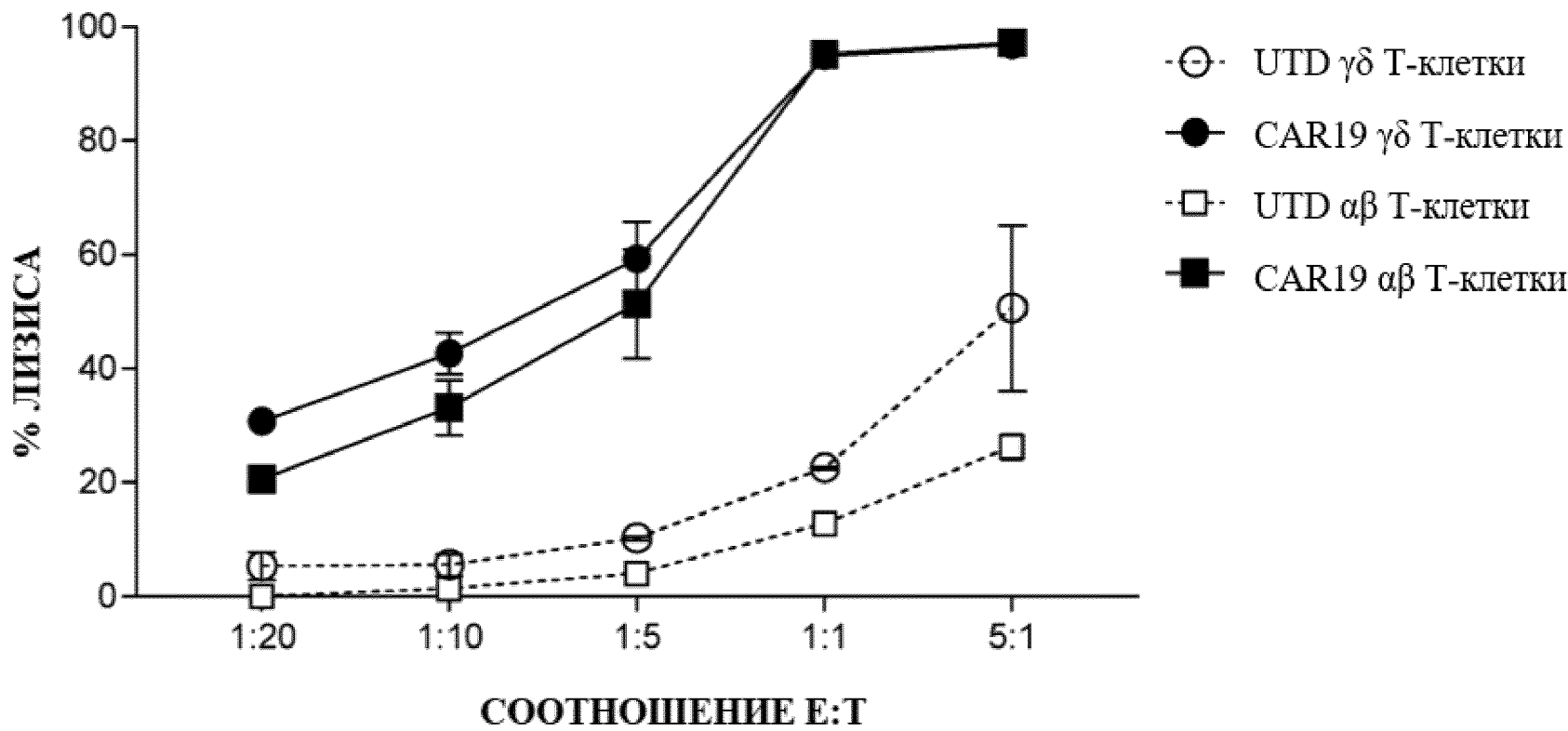
$\alpha\beta$ -обедненное размножение

B

без питающих клеток

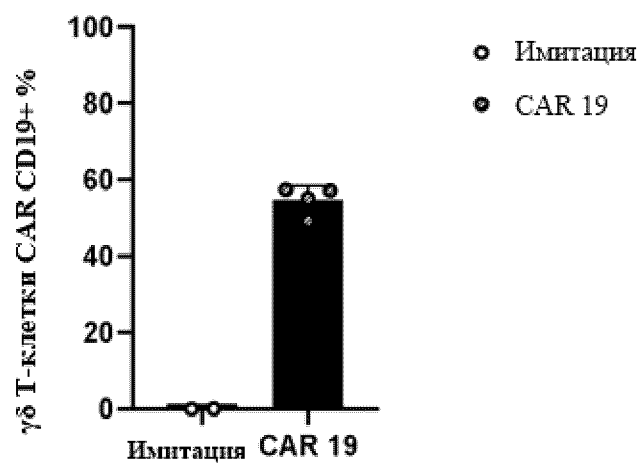


Цитотоксичность (мишень NALM6)

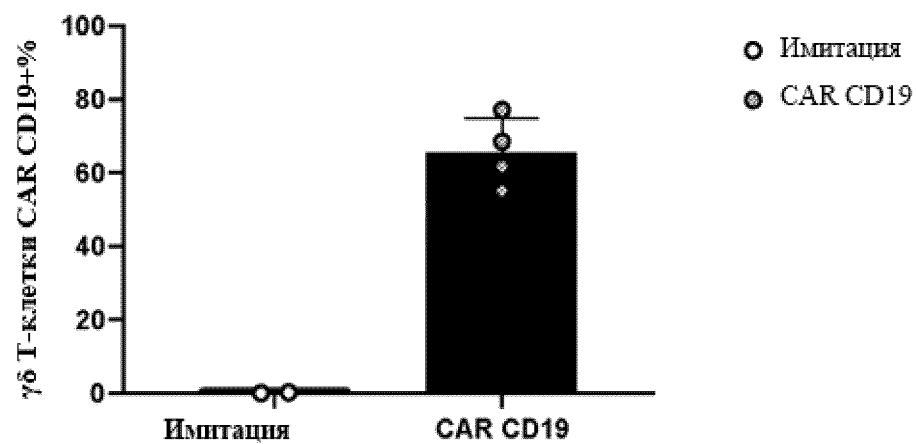


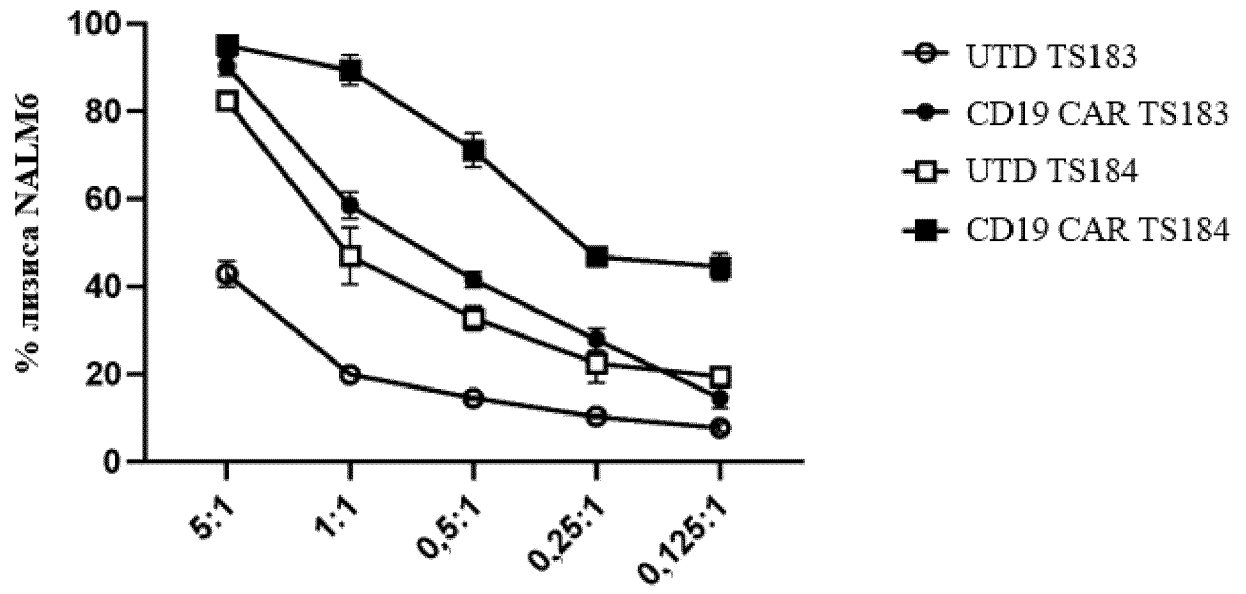
Фиг. 4

А
% трансдукции Сбор в день D14
размножения

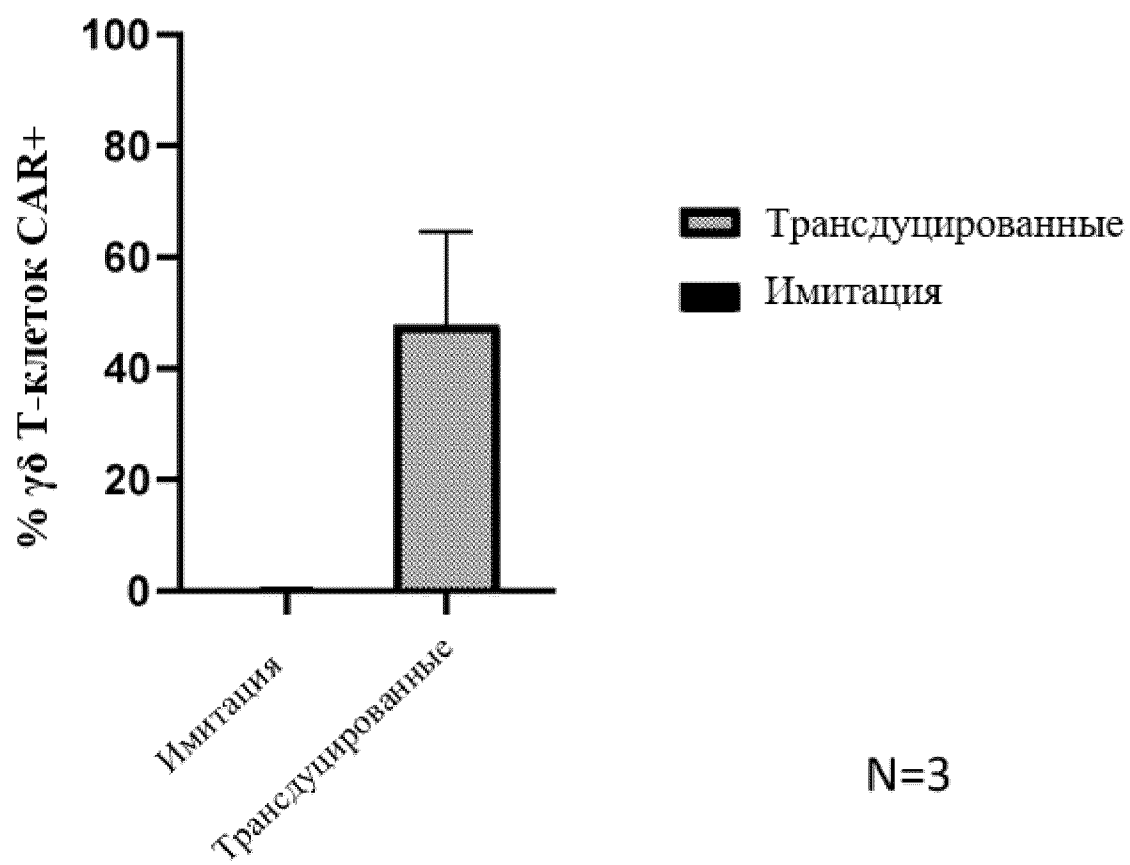


В
% трансдукции Лекарственный продукт после
оттаивания в D7

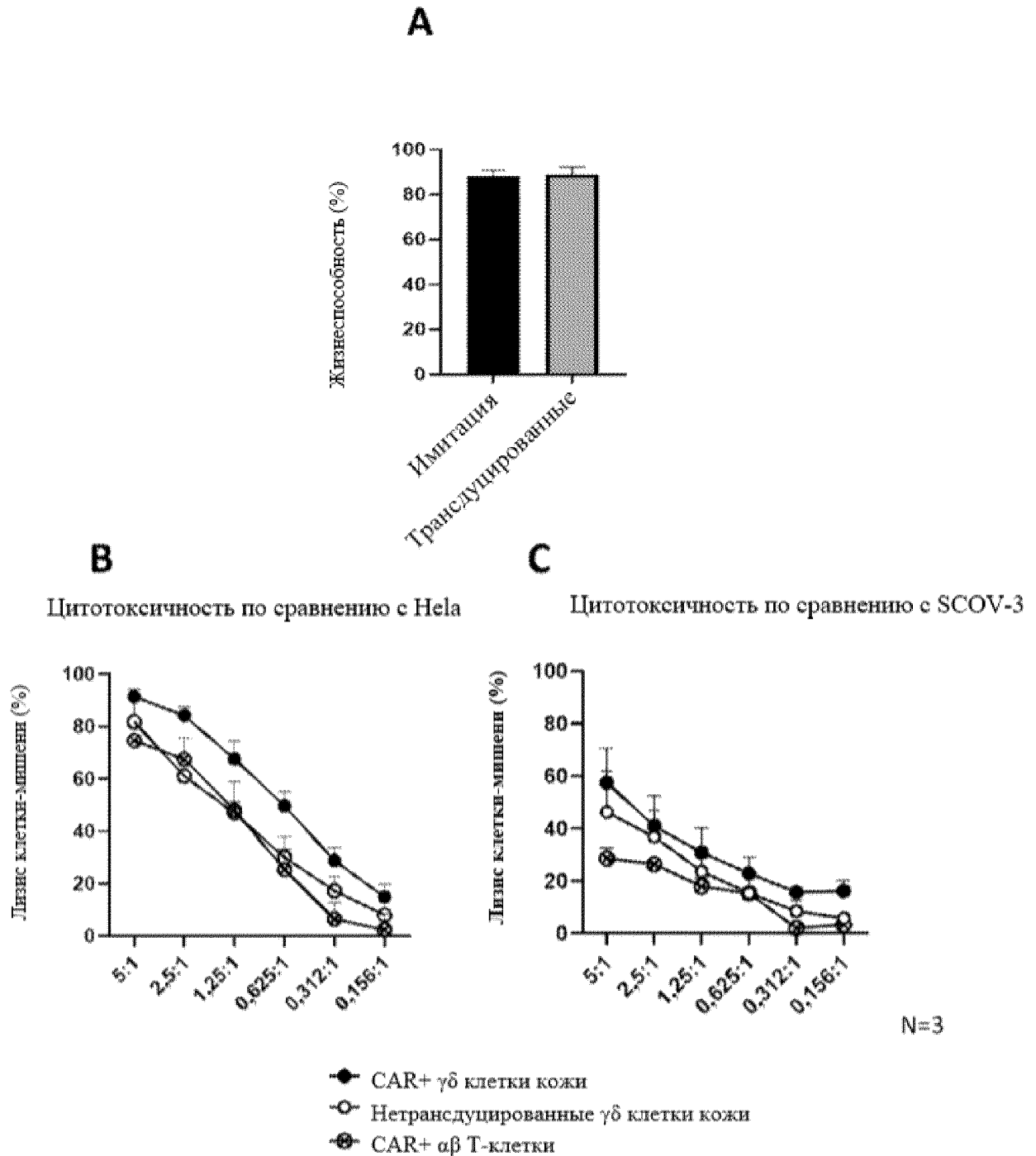




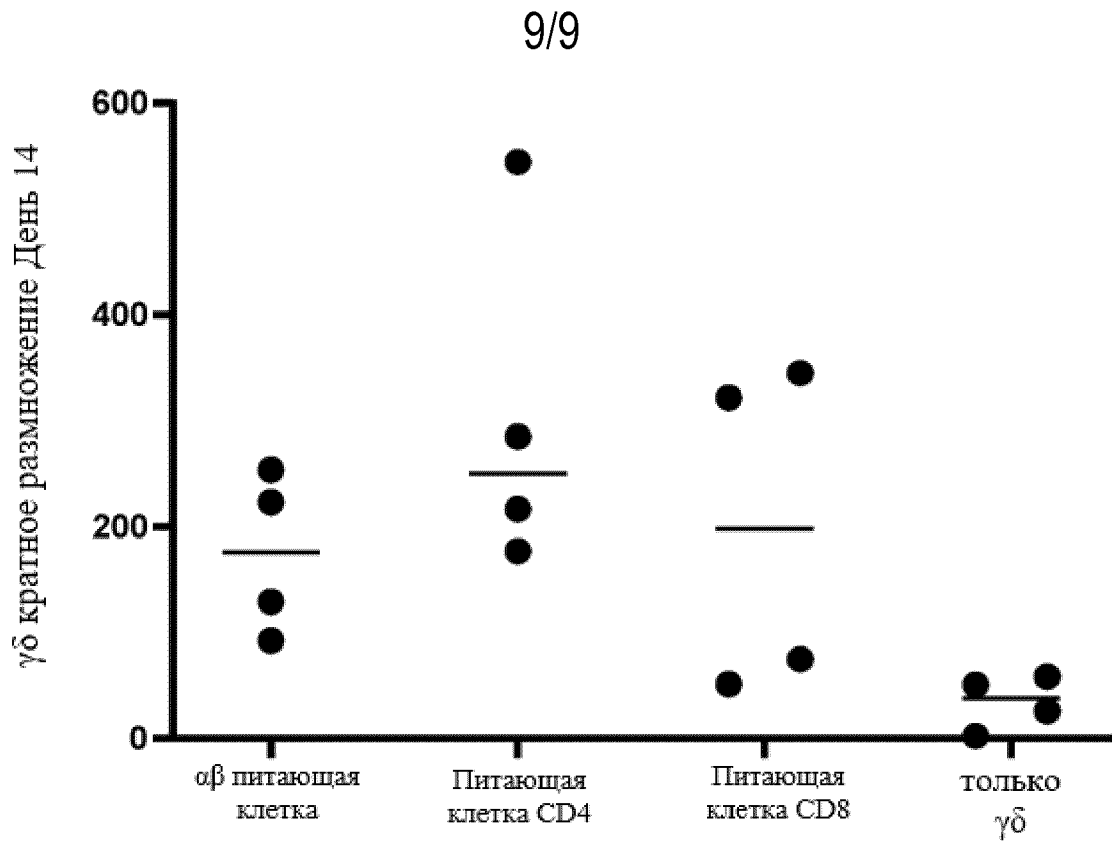
Фиг. 6



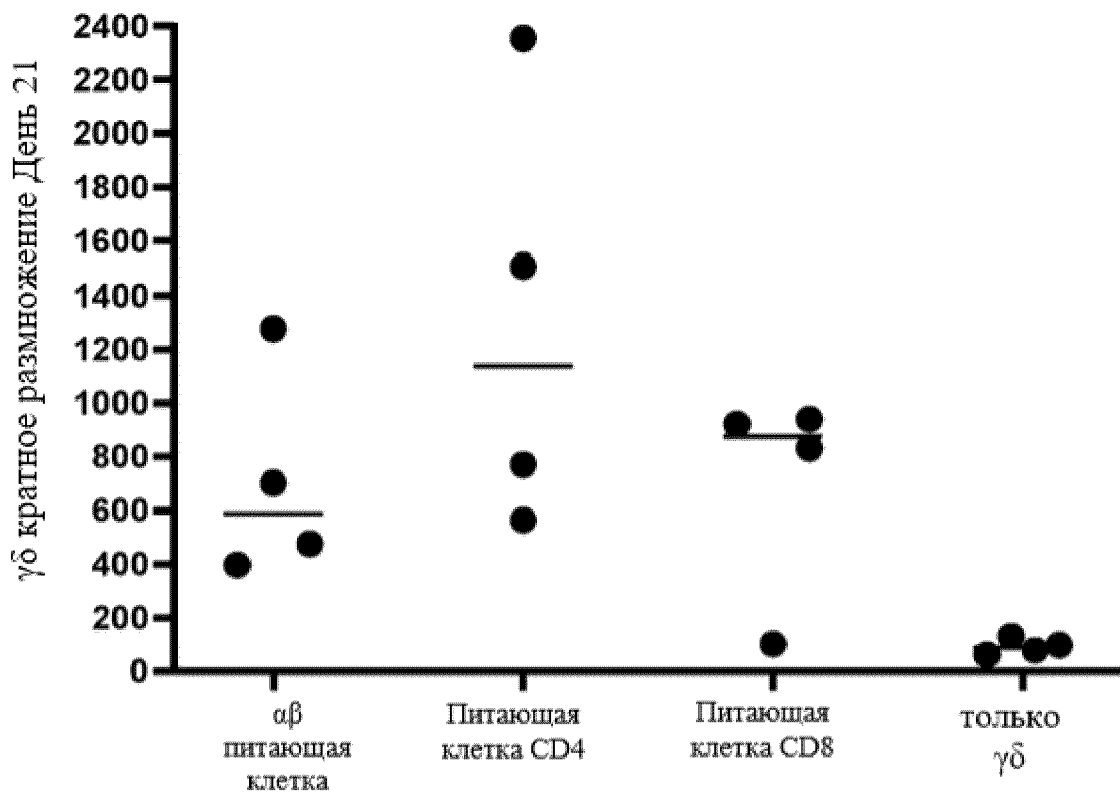
Фиг. 7



Фиг. 8



Первичная подготовка совместной культуры



Первичная подготовка совместной культуры

Фиг. 9