

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202490440** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.07.31**

(51) Int. Cl. *C12N 5/0783* (2010.01)  
*C07K 14/435* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2019.03.25**

---

(54) **ЛИМФОЦИТЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ НАЦЕЛЕННЫЕ  
КОНСТРУКЦИИ**

---

(31) **1804701.9**

(32) **2018.03.23**

(33) **GB**

(62) **202092261; 2019.03.25**

(71) Заявитель:  
**ГАММАДЕЛЬТА ТЕРАПЬЮТИКС  
ЛТД (GB)**

(72) Изобретатель:  
**Нусбаумер Оливер, Ковач Иштван,  
Пиццитола Ирене, Мехта Радж (GB)**

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

---

(57) Настоящее изобретение относится к сконструированным лимфоцитам (например, Т-клеткам  $\gamma\delta$ , NK-клеткам, NK-подобным Т-клеткам, сконструированным лимфоидным клеткам врожденного иммунитета, или МАИТ-клеткам), содержащим гетерологичную нацеленную конструкцию без внутриклеточного сигнального домена, который способен активировать лимфоцит, на котором экспрессируется конструкция. Дополнительно изобретение относится к композициям сконструированных лимфоцитов (например, Т-клеткам  $\gamma\delta$ ) и способам применения сконструированных лимфоцитов (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ ), например в качестве части адоптивной Т-клеточной терапии.

---

**202490440**

**A1**

**A1**

**202490440**

## **ЛИМФОЦИТЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ НАЦЕЛЕННЫЕ КОНСТРУКЦИИ**

### **ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Злокачественные опухоли представляют собой группу заболеваний, связанных с аномальным ростом клеток со способностью метастазировать в другие части организма. Разнообразие типов злокачественных опухолей хорошо известно, и многие типы злокачественных опухолей могут резко различаться по своему генетическому составу у разных пациентов. Это различие является тяжким бременем для определения эффективных терапевтических стратегий нацеливания на определенные злокачественные опухоли. В частности, существует необходимость в создании персонализированных терапевтических стратегий для любой данной злокачественной опухоли-мишени. В результате возник растущий интерес к Т-клеточной иммунотерапии, основанный на идентификации того, что мы можем использовать клетки иммунной системы для распознавания и уничтожения чужеродных или патогенных клеток. На сегодняшний день Т-клеточная иммунотерапия включает разработку Т-клеток  $\alpha\beta$  для экспрессии химерных антигенных рецепторов (CAR). Такие Т-клетки с CAR могут идентифицировать злокачественную опухоль-мишень на основании экспрессии целевого антигена (например, опухолеассоциированного антигена), распознаваемого химерным антигенным рецептором. После связывания со своим антигеном-мишенью один или несколько внутриклеточных доменов CAR распространяют активацию сигнала 1 и/или активацию сигнала 2 (костимуляцию) для активации Т-клетки с CAR, тем самым запуская дегрануляцию и лизис клетки-мишени. Однако с такими подходами с Т-клетками с CAR остается несколько проблем. Например, есть риск наделить Т-клетки с CAR нецелевой цитотоксичностью из-за умеренной экспрессии целевого антигена здоровыми клетками. Таким образом, существует необходимость в улучшенных способах создания этих мощных компонентов иммунной системы, одновременно повышая безопасность и эффективность лечения.

### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к альтернативному подходу к Т-клеткам с CAR. В частности, в настоящем документе представлены гетерологичные нацеленные конструкции, в которых отсутствует функциональный внутриклеточный домен, способный активировать клетку, на которой он экспрессируется. При экспрессии на лимфоцитах, обладающих врожденными эффекторными функциями и/или не рестриктированных по МНС, таких как Т-клетки  $\gamma\delta$ , НК-клетки, НК-подобные Т-клетки, лимфоидные клетки врожденного иммунитета и сконструированные инвариантные Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой (MAIT), сконструированный лимфоцит может проявлять повышенную специфичность к больным клеткам, избегая нарушенной активации TCR при связывании с низкими уровнями целевого антигена на здоровых клетках.

В первом аспекте изобретение относится к сконструированной Т-клетке гамма-дельта ( $\gamma\delta$ ), содержащей гетерологичную нацеленную конструкцию, где гетерологичная нацеленная конструкция содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен, функционально связанный с антигенсвязывающим доменом, где гетерологичная нацеленная конструкция не имеет внутриклеточного домена, способного активировать сконструированную Т-клетку  $\gamma\delta$  (например, внутриклеточный домен, если он присутствует, не передает активацию сигнала 1 и не распространяет костимуляцию сигнала 2). В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нацеленная конструкция дополнительно содержит стеблевой домен, функционально связывающий антигенсвязывающий домен с трансмембранным доменом.

В другом аспекте изобретение относится к сконструированной Т-клетке  $\gamma\delta$ , содержащей гетерологичную нацеленную конструкцию, где гетерологичная нацеленная конструкции содержит антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен, где трансмембранный домен представляет собой терминальный трансмембранный домен (т.е. трансмембранный домен с несвязанным терминальным концом, например, с С-концом, который не связан с пептидом или белком). Таким образом, терминальный трансмембранный домен не связан с внутриклеточным доменом, таким как внутриклеточный сигнальный домен. Трансмембранный домен не распространяет активацию сигнала 1. В некоторых вариантах осуществления терминальный трансмембранный домен не участвует во внутриклеточном пути передачи сигнала (например, пути TCR, например, Т-клеточном пути передачи сигнала, таком как костимуляция сигнала 2). В других вариантах осуществления трансмембранный домен может связываться с эндогенными молекулами, тем самым распространяя костимуляцию сигнала 2. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нацеленная конструкция дополнительно содержит стеблевой домен, функционально связывающий антигенсвязывающий домен с трансмембранным доменом.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов изобретения, трансмембранный домен не активирует сконструированную Т-клетку  $\gamma\delta$ .

В другом аспекте изобретение относится к сконструированной Т-клетке  $\gamma\delta$ , содержащей гетерологичную нацеленную конструкцию, состоящую из антигенсвязывающего домена, стеблевого домена, функционально связанного с антигенсвязывающим доменом, и трансмембранного домена, функционально связанного со стеблевым доменом.

В некоторых вариантах осуществления любого аспекта изобретения, сконструированная Т-клетка  $\gamma\delta$  является  $V\delta 2$ -отрицательной (например,  $V\delta 2$ -отрицательная Т-клетка  $\gamma\delta$  является  $V\delta 1$ -положительной или дважды отрицательной). В альтернативных вариантах осуществления любого аспекта изобретения, сконструированная Т-клетка  $\gamma\delta$  может быть  $V\delta 2$ -положительной.

Антигенсвязывающий домен может включать одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), моноклональное антитело, фрагмент Fab, В-клеточный рецептор, Т-

клеточный рецептор, каркас антитела, рецептор-специфический лиганд или лиганд-специфический рецептор (например, рецептор, специфичный к поверхностно-экспрессируемому лиганду). В некоторых вариантах осуществления стеблевой домен включает один или несколько доменов, выбранных из группы, состоящей из стебля CD8, шарнира-домена CH2 IgG1, шарнира-домена CH3 IgG1, шарнира-доменов CH2-CH3 IgG1, шарнира (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>, шарнира IgG1, стебля CD7, шарнира IgD, шарнира-домена CH2 IgD, шарнира-домена CH3 IgD, шарнира-доменов CH2-CH3 IgD, шарнира IgG4, шарнира-домена CH2 IgG4, шарнира-домена CH3 IgG4, шарнира-доменов CH2-CH3 IgG4, или стеблевого домена FcεRI.

В некоторых вариантах осуществления любого аспекта изобретения, трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD8, трансмембранный домен CD4, трансмембранный домен CD3ε, трансмембранный домен CD3ζ, трансмембранный домен CD28, трансмембранный домен CD45, трансмембранный домен CD5, трансмембранный домен CD8, трансмембранный домен CD9, трансмембранный домен CD16, трансмембранный домен CD22, трансмембранный домен CD33, трансмембранный домен CD37, трансмембранный домен CD64, трансмембранный домен CD80, трансмембранный домен CD86, трансмембранный домен CD134, трансмембранный домен CD137, трансмембранный домен CD154, трансмембранный домен CD7, трансмембранный домен CD71, трансмембранный домен CD18, трансмембранный домен CD29, трансмембранный домен CD11a, трансмембранный домен CD11b, трансмембранный домен CD11c, трансмембранный домен CD11d, трансмембранный домен CD94, трансмембранный домен FcγR, или трансмембранный домен NKG2D. В некоторых вариантах осуществления не более чем 50% аминокислот терминального трансмембранного домена расположены внутриклеточно (например, не более, чем 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, или 5% аминокислот терминального трансмембранного домена (например, С-концевого трансмембранного домена) расположены внутриклеточно).

В некоторых вариантах осуществления любого аспекта изобретения кластеризация гетерологичной нацеленной конструкции при связывании антигенсвязывающего домена с целевым антигеном по существу не активирует путь TCR в сконструированной Т-клетке γδ.

В некоторых вариантах осуществления любого аспекта изобретения, антигенсвязывающий домен связывается с опухолеассоциированным антигеном. Например, опухолеассоциированный антиген может быть белковым или пептидным антигеном, экспрессированным на поверхности опухолевой клетки (например, CD19). Альтернативно, опухолеассоциированный антиген может быть углеводом, экспрессированным на поверхности опухолевой клетки. В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой ганглиозид, экспрессированный на поверхности опухолевой клетки (например, GD2). В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой

иммуносупрессивный антиген. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен связывается с целевым антигеном, который экспрессируется клеткой солидной опухоли.

В некоторых из предшествующих вариантов осуществления связывание антигенсвязывающего домена с целевым антигеном, экспрессированным на здоровой клетке, запускает по существу меньший цитолиз (например, по меньшей мере, на 5% меньше, по меньшей мере, на 10% меньше, по меньшей мере, на 20% меньше, по меньшей мере, на 30% меньше, по меньшей мере, на 40% меньше, по меньшей мере, на 50% меньше, по меньшей мере, на 60% меньше, по меньшей мере, на 70% меньше, по меньшей мере, на 80% меньше, по меньшей мере, на 90% меньше, или, по меньшей мере, на 95% меньше цитолиза) посредством сконструированной Т-клетки  $\gamma\delta$  по сравнению с референсной клеткой, имеющей функциональный внутриклеточный домен (например, оно по существу не запускает цитолиз сконструированной Т-клеткой  $\gamma\delta$ ). В некоторых вариантах осуществления связывание антигенсвязывающего домена с целевым антигеном, экспрессированным на опухолевой клетке или инфицированной клетке, по существу запускает цитолиз сконструированной Т-клеткой  $\gamma\delta$ . Цитолиз может зависеть от эндогенной экспрессии NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 или DNAM1 в сконструированной Т-клетке  $\gamma\delta$ . В некоторых вариантах осуществления цитолиз характеризуется одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, или всеми шестью ответами, выбранными из группы, состоящей из дегрануляции CD107, высвобождения гранзима, высвобождения перфорина, высвобождения гранулизина, уничтожения клетки-мишени, пролиферации Т-клетки  $\gamma\delta$  и производства цитокинов.

В другом аспекте изобретение относится к сконструированной НК клетке или НК-подобной Т-клетке с гетерологичной нацеленной конструкцией по любому из вариантов осуществления, описываемых в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нацеленная конструкция содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен, функционально связанный с антигенсвязывающим доменом. В гетерологичной нацеленной конструкции отсутствует внутриклеточный домен, способный активировать сконструированную НК-клетку или НК-подобную Т-клетку.

В другом аспекте изобретение относится к сконструированной лимфоидной клетке врожденного иммунитета (ILC). Сконструированная ILC содержит гетерологичную нацеленную конструкцию по любому из вариантов осуществления, описываемых в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нацеленная конструкция содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен, функционально связанный с антигенсвязывающим доменом. В гетерологичной нацеленной конструкции отсутствует внутриклеточный домен, способный активировать сконструированную клетку врожденного иммунитета.

В другом аспекте изобретение относится к сконструированной МАИТ-клетке. Сконструированная МАИТ-клетка содержит гетерологичную нацеленную конструкцию по

любому из вариантов осуществления, описываемых в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нацеленная конструкция содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен, функционально связанный с антигенсвязывающим доменом. В гетерологичной нацеленной конструкции отсутствует внутриклеточный домен, способный активировать сконструированную МАИТ-клетку.

В другом аспекте изобретение относится к выделенной клеточной популяции, которая содержит, по меньшей мере, десять сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$ , сконструированных НК-клеток или НК-подобных Т-клеток, сконструированных лимфоидных клеток врожденного иммунитета или сконструированных МАИТ-клеток по любому из предыдущих вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки  $\gamma\delta$ , сконструированные НК-клетки или НК-подобные Т-клетки, сконструированные лимфоидные клетки врожденного иммунитета или сконструированные МАИТ-клетки составляют более 2% (например, от 2% до 100%, от 10% и 95%, от 20% до 90%, от 30% до 80%, от 40% до 70%, например, более 5%, более 10%, более 15%, более 20%, более 30%, более 40%, более 50%, более 60%, более 70%, более 80%, более 90%, более 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) от общего числа клеток в выделенной клеточной популяции.

В другом аспекте изобретение относится к выделенной клеточной популяции, которая включает множество сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$ , НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток по любому из предыдущих вариантов осуществления. Популяция сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$ , НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток может составлять более чем 2% (например, от 2% до 100%, от 10% до 95%, от 20% до 90%, от 30% до 80%, от 40% до 70%, например, более чем 5%, более чем 10%, более чем 15%, более чем 20%, более чем 30%, более чем 40%, более чем 50%, более чем 60%, более чем 70%, более чем 80%, более чем 90%, более чем 95%, 96%, 97%, 98%, или 99%) от общего числа клеток в выделенной клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления выделенная клеточная популяция содержит, по меньшей мере, десять сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$ , сконструированных НК-клеток или НК-подобных Т-клеток, сконструированных лимфоидных клеток врожденного иммунитета или сконструированных МАИТ-клеток по любому из предыдущих вариантов осуществления.

В другом аспекте изобретение относится к Т-клетке  $\gamma\delta$ , НК-клетке, НК-подобной Т-клетке, лимфоидной клетке врожденного иммунитета, или МАИТ-клетке, содержащей гетерологичный полинуклеотид. Гетерологичный полинуклеотид может кодировать гетерологичную нацеленную конструкцию, содержащую внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен, функционально связанный с антигенсвязывающим доменом, где гетерологичная нацеленная конструкция напрямую не активирует сконструированную Т-клетку  $\gamma\delta$ , НК-клетку, НК-подобную Т-клетку, лимфоидную клетку врожденного иммунитета, или МАИТ-клетку.

В еще одном аспекте изобретение относится к Т-клетке  $\gamma\delta$ , НК-клетке, НК-подобной Т-клетке, лимфоидной клетке врожденного иммунитета, или МАИТ-клетке, которая содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий нацеленную конструкцию, которая содержит антигенсвязывающий домен и терминальный трансмембранный домен.

Сконструированную Т-клетку  $\gamma\delta$ , НК-клетку, НК-подобную Т-клетку, лимфоидную клетку врожденного иммунитета, или МАИТ-клетку; выделенную популяцию сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$ , НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или популяцию МАИТ-клеток; или Т-клетку  $\gamma\delta$ , НК-клетку, НК-подобную Т-клетку, лимфоидную клетку врожденного иммунитета, или МАИТ-клетку, содержащую гетерологичный полинуклеотид по любому из предшествующих вариантов осуществления, можно использовать в способе лечения индивидуума путем адоптивной клеточной терапии (например, для применения в способе лечения индивидуума путем адоптивной клеточной терапии).

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения индивидуума путем адоптивной клеточной терапии (например, адоптивной Т-клеточной терапии), который включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества сконструированных клеток, выделенной популяции клеток, или клеток по любому из предшествующих вариантов осуществления.

В другом аспекте изобретение относится к сконструированным клеткам, выделенной популяции клеток, или клеткам по любому из предшествующих вариантов осуществления для применения в способе лечения путем адоптивной клеточной терапии (например, адоптивной Т-клеточной терапии), где способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества сконструированных клеток, выделенной популяции клеток, или клеток по любому из предшествующих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления по любому из предшествующих аспектов, индивидуум является человеком. Например, индивидуум может быть пациентом-человеком со злокачественной опухолью (например, пациентом-человеком со злокачественной опухолью, которого лечат от солидной опухоли). Альтернативно, пациент-человек может быть пациентом-человеком, которого лечат от вирусной инфекции.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

Фиг. 1 представляет собой схематическое изображение, на котором показан классический химерный антигенный рецептор (CAR) по сравнению с одним из вариантов осуществления гетерологичной нацеленной конструкции, которая не содержит внутриклеточный домен.

Фиг. 2А-2С представляют собой серию схематических изображений, показывающих как могут быть модифицированы гетерологичные нацеленные конструкции с различными внеклеточными доменами, адаптированными к желаемой

мишени. Фиг. 2А показывает обобщенный внеклеточный домен, который может быть, например, В-клеточным рецептором, каркасом антитела или миметиком, scFv, mAb, Fab, или Т-клеточным рецептором. Фиг. 2В показывает внеклеточный домен, который является лиганд-специфическим рецептором. ФИГ. 2С показывает внеклеточный домен, который является рецептор-специфическим лигандом.

Фиг. 3А и 3В представляют собой гистограммы проточной цитометрии. ФИГ. 3А показывает экспрессию конструкции, нацеленной на CD19, без внутриклеточного домена («несигнальная или nsCAR») и полноразмерного CAR к CD19 на трансдуцированных клетках V $\delta$ 1. ФИГ. 3В показывает экспрессию NCR (рецепторов природной цитотоксичности) NKp30 (левая колонка), NKp44 (средняя колонка), и NKG2D (правая колонка) на клетках V $\delta$ 1, которые не трансдуцированы (UTD; верхний ряд), трансдуцированы несигнальным CAR к CD19 (средний ряд), и трансдуцированы CAR к CD19 (нижний ряд).

Фиг. 4А-4С представляют собой графики, показывающие экспрессию CD19 на клетках Nalm-6 и В-клетках (фиг. 4А) и результаты 16-часового анализа лизиса с соотношением эффектора к мишени 1:1 (Фиг. 4В и 4С). ФИГ. 4В показывает лизис клеток CD19+ Nalm-6, и ФИГ. 4С показывает лизис первичных клеток В-ALL. Показаны два независимых донора и два эксперимента.

Фиг. 5А и 5В представляют собой графики, показывающие экспрессию несигнального CAR к GD2 на клетках V $\delta$ 1 (фиг. 5А) и 60-часовой период роста клеточной линии Kelly отдельно или в присутствии клеток V $\delta$ 1 (фиг. 5В). Данные представлены как изменение количества зеленых объектов на изображении, нормализованное к количеству зеленых объектов на изображении в нулевой момент времени. Каждая точка данных отражает три повтора одной лунки.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

В настоящем документе предлагаются композиции сконструированных лимфоцитов (например, лимфоцитов, имеющих врожденные эффекторные функции, таких как Т-клетки  $\gamma\delta$ , НК-клетки, НК-подобные Т-клетки, лимфоидные клетки или инвариантные Т-клетки, ассоциированные с слизистыми оболочками), которые экспрессируют гетерологичную нацеленную конструкцию. Гетерологичная нацеленная конструкция содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен, функционально связанный с антигенсвязывающим доменом (например, связанный напрямую или связанный через стеблевой домен). Эти сконструированные лимфоциты (например, Т-клетки  $\gamma\delta$ ) можно использовать для лечения таких заболеваний, как злокачественные опухоли или вирусные инфекции. Поскольку гетерологичные конструкции по настоящему изобретению не имеют функционального внутриклеточного домена, способного распространять активацию Т-клеток, они полагаются на эндогенные МНС-независимые пути активации, характерные для Т-клеток  $\gamma\delta$ , которые отсутствуют в Т-клетках  $\alpha\beta$ . Таким образом, гетерологичные конструкции, описываемые в настоящем документе, разработаны для экспрессии на поверхности лимфоцитов, например, Т-клеток

γδ (например, клеток Vδ1, клеток Vδ2, клеток Vδ3, клеток Vδ5 и клеток Vδ8).

### **Определения**

Следует понимать, что аспекты и варианты осуществления изобретения, описываемые в настоящем документе, включают «содержащие», «состоящие» и «состоящие по существу из» аспекты и варианты осуществления. Как применяют в настоящем документе, форма единственного числа включает ссылки на форму множественного числа, если не указано иное.

Как применяют в настоящем документе, термин «приблизительно» относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области техники. Ссылка на «приблизительно» по отношению к значению или параметру в настоящем документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на это значение или параметр как таковой. В некоторых случаях «приблизительно» охватывает отклонения в +20%, в некоторых случаях +10%, в некоторых случаях +5%, в некоторых случаях +1%, или в некоторых случаях +0,1% от указанного значения, таким образом, варианты подходят для реализации описанных способов.

Как применяют в настоящем документе, термины «существенный» и «по существу» относятся к качественным условиям демонстрации полной или почти полной степени или уровня характеристики или свойства, представляющего интерес. Обычный специалист в области биологии поймет, что биологические и химические явления редко, если вообще когда-либо, доходят до завершения и/или переходят к завершенности или достигают или избегают абсолютного результата. Термин «по существу» таким образом применяют в настоящем документе для отражения потенциальной неполноты, присущей многим биологическим и химическим явлениям. При описании физического сценария, такого как взаимодействие рецептор-лиганд или контакт клетка-клетка, сценарий является существенным, если его функциональный результат обнаруживается общепринятыми способами, доступными индивидууму, выполняющему способ. Например, «существенная активация TCR» относится к детектируемому уровню активации TCR среди популяции клеток (например, статистически значимая степень активации TCR). В некоторых вариантах осуществления TCR по существу активируется при воздействии до 0,1%, до 0,5%, до 1%, до 5%, до 10%, до 20%, до 30%. % или до 40% от EC<sub>50</sub> агониста пути TCR (например, антитела, например, антитела к CD3 или лектина) на соответствующую клеточную популяцию.

Как применяют в настоящем документе, «гетерологичная нацеленная конструкция» относится к белкам или набору белков (например, двум или более белкам, которые димеризуются с образованием функционального четвертичного белка), которые находятся на клетке-хозяине (т.е. сконструированной клетке) и связываюся с целевой молекулой, присутствующей на другой клетке, и которые природным образом не экспрессируются в клетке, на которой они находятся. Гетерологичная нацеленная конструкция может кодироваться полинуклеотидом, экспрессируемым в сконструированной клетке.

Как применяют в настоящем документе, «активировать» Т-клетку означает инициировать или усилить путь Т-клеточного рецептора (TCR) путем распространения активации сигнала 1 или активации сигнала 2. Например, химерный антигенный рецептор имеющий функциональный домен который активирует Т-клетку через сигнал 1 (например, CD3 $\zeta$ ), или костимулирующий домен (например, CD28, 4-1BB и т.д.), может «активировать» свою Т-клетку-хозяина путем кластеризации в ответ на связывание антигена. Гетерологичная нацеленная конструкция без функционального внутриклеточного домена, может не иметь средств распространения активации сигнала 1 или активации сигнала 2 и, таким образом, не может активировать путь TCR. Гетерологичная нацеленная конструкция без функционального внутриклеточного домена может быть способна «активировать» Т-клетку, на которой она экспрессируется, если ее трансмембранный домен распространяет костимуляцию, например, при ассоциации трансмембранного домена NKG2D с эндогенным DAP10 или DAP12. В альтернативных вариантах осуществления изобретение относится к гетерологичным нацеленным конструкциям с нефункциональными трансмембранными доменами, и гетерологичный нацеливающий домен не активирует Т-клетку, на которой он экспрессируется.

Активация «пути Т-клеточного рецептора (TCR)» относится к индукции пролиферации или другим последствиям активации Т-клеток через передачу сигналов TCR. Путь передачи сигнала TCR включает активацию сигнала 1, например, последовательную активацию связанных с белком Src тирозинкиназ (PTK), Lck и Fyn, и ассоциированной с дзета-цепью (TCR) протеинкиназы 70 кДа (ZAP70). Эти протеинкиназы приводят к фосфорилированию полипептидов, включая линкерный активатор для Т-клеток (LAT), что приводит к последующей стимуляции через киназу, регулируемую внеклеточным сигналом (ERK), с-Jun N-концевую киназу (JNK) и ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT). Сигнал 2 (т.е. костимуляция), например, через CD28, CD45, DAP10 или DAP12, может усиливать фосфорилирование и усиливать активацию TCR. Таким образом, любая молекула, нацеленная на часть пути TCR или часть костимуляторного пути, может напрямую активировать Т-клеточную передачу сигналов. Связанные с поверхностью молекулы, которые просто приводят Т-клетку в контакт с клеткой-мишенью, могут способствовать тому, чтобы другие молекулы напрямую запускали активацию Т-клетки (например, гетерологичная нацеленная конструкция), но эти нацеливающие молекулы не активируют напрямую путь TCR.

Агонисты пути TCR включают антитела (например, моноклональные антитела, например, анти-TCR V $\delta$ 1, анти-TCR  $\delta$ TCS-1, анти-TCR PAN  $\gamma\delta$  и анти-CD3), лектины (например, растительные лектины, например, конканавалин А, лектины из *Phaseolus vulgaris* (PHA-P), *Phytolacca Americana*, *Triticum vulgare*, *Lens culinaris*, *Glycine max*, *Maackia amurensis*, *Pisum sativum*, и *Sambucus nigra*), синтетические фосфоантигены (например, BrHPP (бромогидрина пиррофосфат), 2M3B1PP (2-метил-3-бутенил-пиррофосфат), HMBPP ((E)-4-Гидрокси-3-метил-бут-2-енилпиррофосфат) или IPP (изопентенил пиррофосфат)) и N-бисфосфонаты (например, золедронат). Агонисты пути

TCR включают агонисты корцепторов, включая антитела (например, моноклональные антитела, например, анти-CD2, анти-CD6, анти-CD9, анти-CD28, анти-CD43, анти-CD94, анти-CD160, анти-SLAM, анти-NKG2D, анти-2B4, анти-HLA-A, анти-HLA-b, анти-HLA-C и анти-ICAM-3) и белки (рекомбинантные белки, например, рекомбинантные человеческие белки, например, CD7L, CD26, CD27L, CD30L, CD40L, OX40L, 4-1BBL, ICAM-1, фибронектин, гидрокортизон и их варианты, например, Fc-слитые белки, например, CD27L-Fc). Агонисты пути TCR могут быть растворимыми или связанными с мембранами и могут, например, присутствовать на клетках, таких как искусственные антигенпредставляющие клетки (иАПК), как в случае для комплексов МНС или HLA. Подходящие АПК для активации передачи сигналов в Т-клетке известны в данной области. Подходящие способы активации Т-клеток путем экзогенного добавления агонистов пути TCR хорошо известны в данной области и обобщены на фигуре 1 от Deniger, et al. (Deniger, et al. *Frontiers in Immunology*. 2014. 5 (636): 1-10).

«Экзогенные агонисты пути TCR» относятся к агонистам пути TCR, которые не происходят из негематопоэтической ткани или ее донора (т.е. они добавляются экзогенно). Таким образом, следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления изобретения агонист пути TCR может присутствовать в культуре в виде остаточного материала из негематопоэтической ткани (например, растворимый фибронектин или связанный с клеткой ICAM-1). В некоторых вариантах осуществления остаточный агонист пути TCR находится в незначительной концентрации и по существу не активирует Т-клетки.

Для домена белка, такого как гетерологичная нацеленная конструкция, быть «функционально связанным» по отношению к другому домену в настоящем документе означает находиться в том же самом белке, что и другой домен, либо непосредственно примыкать к другому домену, либо быть разделенным одной или несколькими аминокислотами или доменами. Например, в гетерологичной нацеленной конструкции с N-концевым антигенсвязывающим доменом, промежуточным стеблевым доменом и C-концевым трансмембранным доменом, антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен указаны как функционально связанные. В гетерологичной нацеленной конструкции с N-концевым антигенсвязывающим доменом, непосредственно примыкающим к C-концевому трансмембранному домену, антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен также указаны как функционально связанные, но, более конкретно, связанные напрямую.

Как применяют в настоящем документе, термин «каркас антитела» относится к неприродному антигенсвязывающему белку, пептиду или фрагменту антитела. Каркасы антител включают аднектины, аффитела, аффилины, антикалины, атимеры, авимеры, бициклические пептиды, центирины, цис-узлы, дарпины, финомеры, домены Куница, О-тела, и Tn3c. Каркасы антител известны в данной области и описаны, например, в Vazquez-Lombardi et al, *Drug Discovery Today*, 2015, 20(10): 1271-83, включенной в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

Термин «антитело» применяется в самом широком смысле и конкретно охватывает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), и фрагменты антител при условии, что они проявляют желательную биологическую активность.

Как применяют в настоящем документе, термин «цитотоксичность» относится к способности иммунных клеток (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ ) убивать другие клетки (например, клетки-мишени). Иммунные клетки с цитотоксическими функциями выделяют токсичные белки (например, перфорин и гранзимы), способные убивать близлежащие клетки.

Как применяют в настоящем документе, термин «дегрануляция» относится к клеточному процессу, в котором молекулы, включая антимикробные и цитотоксические молекулы, высвобождаются из внутриклеточных секреторных пузырьков, называемых гранулы. Дегрануляция является частью иммунного ответа на патогены и вторгающиеся микроорганизмы иммунными клетками, такими как цитотоксические Т-клетки. Молекулы, высвобождаемые во время дегрануляции, различаются в зависимости от типа клеток и могут включать молекулы, предназначенные для уничтожения вторгающихся патогенов и микроорганизмов, или для стимулирования иммунного ответа, такого как воспаление.

Как применяют в настоящем документе, термин «лимфоидная клетка врожденного иммунитета» относится к врожденному лимфоциту без реаранжированных антигенных рецепторов, таких как рецепторы, которые экспрессируются Т- и В-клетками. Лимфоидные клетки врожденного иммунитета включают НК-клетки, лимфоидные клетки врожденного иммунитета типа 1 (ILC1), интра-ILC1 клетки, лимфоидные клетки врожденного иммунитета типа 2 (ILC2), лимфоидные клетки врожденного иммунитета типа 3 (ILC3), и т.д.

Как применяют в настоящем документе, термины «связанная со слизистой оболочкой инвариантная Т-клетка» и «MAIT-клетка» относятся к врожденной Т-клетке, которая экспрессирует инвариантную цепь Т-клеточного рецептора  $\alpha$  (TCR $\alpha$ ) и иную цепь TCR $\beta$  и может распознавать отдельный набор молекул в контексте эволюционно консервативной молекулы I, связанной с главным комплексом гистосовместимости (MR1).

Как применяют в настоящем документе, термин «НК-клетка» относится к клетке-естественному киллеру, врожденному лимфоциту, который не экспрессирует TCR или CD3 и является положительным по экспрессии CD56 и CD161. НК-клетки могут также экспрессировать природные рецепторы цитотоксичности, такие как NKp44 и NKp46.

Как применяют в настоящем документе, термин «НК-подобная Т-клетка» относится к Т-клеткам, подобным естественным киллерам, или Т-клеткам естественным киллерам (NKT-клеткам), которые являются врожденными лимфоцитами и имеют общие функциональные и структурные характеристики с Т-клетками и НК-клетками, т.е., они экспрессируют TCR (например,  $\alpha\beta$  TCR), CD3 и CD56. НК-подобные Т-клетки

распознают гликолипиды и реагируют с ними в контексте МНС класса-I-подобного гликопротеина, CD1d, и могут вырабатывать IFN- $\gamma$  и IL-4 после активации.

Как применяют в настоящем документе, «негематопозитические клетки» включают стромальные клетки и эпителиальные клетки. Стромальные клетки представляют собой негематопозитические клетки соединительной ткани любого органа и поддерживают функцию паренхиматозных клеток этого органа. Примеры стромальных клеток включают фибробласты, перициты, мезенхимальные клетки, кератиноциты, эндотелиальные клетки и негематологические опухолевые клетки. Эпителиальные клетки представляют собой негематопозитические клетки, выстилающие полости и поверхности кровеносных сосудов и органов на всем протяжении тела. Обычно они имеют плоскую, столбчатую или кубовидную форму и могут быть расположены в виде одного слоя клеток или в виде слоев из двух или более клеток.

Как применяют в настоящем документе, «резидентные Т-клетки  $\gamma\delta$  негематопозитической ткани», «клетки негематопозитической ткани» и «Т-клетки  $\gamma\delta$  негематопозитической ткани» относятся к Т-клеткам  $\gamma\delta$ , которые присутствовали в негематопозитической ткани во время эксплантации ткани. Резидентные Т-клетки  $\gamma\delta$  негематопозитической ткани можно получить из любой подходящей негематопозитической ткани человека или не являющегося человеком животного. Негематопозитическая ткань представляет собой ткань, иную чем кровь или костный мозг. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки  $\gamma\delta$  не были получены из конкретных типов образцов биологической жидкости, таких как кровь или синовиальная жидкость. Примеры таких негематопозитических тканей человека или не являющегося человеком животного включают кожу или ее часть (например, дерму или эпидермис), желудочно-кишечный тракт (например, желудочно-кишечный эпителий, толстую кишку, тонкий кишечник, желудок, аппендикс, слепую кишку, или прямую кишку), ткань молочной железы, легкое (предпочтительно, где ткань не получают путем бронхоальвеолярного лаважа), предстательную железу, печень и поджелудочную железу. В некоторых вариантах осуществления резидентные Т-клетки  $\gamma\delta$  негематопозитической ткани могут быть получены из лимфоидной ткани, такой как тимус, селезенка, или миндалина. Т-клетки  $\gamma\delta$  также могут быть резидентными в тканях злокачественной опухоли человека, например, молочной железы и предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки  $\gamma\delta$  не получены из тканей злокачественной опухоли. Образцы негематопозитических тканей можно получить стандартными способами, например, эксплантатом (например, биопсией). Резидентные Т-клетки  $\gamma\delta$  негематопозитической ткани включают, например, Т-клетки V $\delta$ 1, двойные отрицательные (DN) Т-клетки, Т-клетки V $\delta$ 2, Т-клетки V $\delta$ 3 и Т-клетки V $\delta$ 5.

Любой один или несколько из вышеперечисленных факторов могут быть включены в протокол размножения в количестве, эффективном для получения размноженной популяции лимфоцитов (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ ), которые могут быть трансфицированы нуклеиновой кислотой, кодирующей гетерологичную нацеленную

конструкцию по изобретению. Как применяют в настоящем документе, фраза «в количестве, эффективном для» относится к количеству, которое вызывает обнаруживаемый результат (например, ряд клеток, имеющих статистически значимое увеличенное количество по сравнению с исходной популяцией, например, при  $p < 0,05$ ). В случаях, когда одновременно присутствуют несколько факторов, эффективное количество относится к комбинированному эффекту всех факторов (например, комбинированный эффект IL-2 и IL-15 или комбинированный эффект IL-2, IL-4, IL-15, и IL-21).

Как применяют в настоящем документе, «размноженная популяция клеток  $\gamma\delta$ » относится к популяции гематопоэтических или негематопоэтических клеток, включая Т-клетки  $\gamma\delta$ , которые культивировались в условиях и в течение времени, которые вызвали размножение клеток  $\gamma\delta$ , т.е. увеличение числа клеток  $\gamma\delta$ . Аналогичным образом, «размноженная популяция Т-клеток V $\delta$ 1», применяемая в настоящем документе, относится к популяции гематопоэтических или негематопоэтических клеток, включая Т-клетки V $\delta$ 1, которые культивировались в условиях и в течение времени, которые вызвали размножение Т-клеток V $\delta$ 1, т.е. увеличение количества клеток V $\delta$ 1.

Как применяют в настоящем документе, «фидерная клетка» относится к любой экзогенной клетке, добавленной в культуру для обеспечения контакта между клеткой и клеточной поверхностью с клетками, происходящими из негематопоэтической ткани. Фидерные клетки могут быть первичными клетками (например, полученными из ткани) или полученными из клеточной линии. Фидерные клетки могут быть живыми или облученными, и включают опухолевые клетки, фибробласты, В-клетки, и другие антигенпредставляющие клетки.

Термин «маркер» в настоящем документе относится к ДНК, РНК, белку, углеводу, гликолипиду, или молекулярному маркеру на основе клетки, экспрессию или наличие которого в образце пациента можно выявлять стандартными способами (или способами, описываемыми в настоящем документе).

Клетка или популяция клеток, которая «экспрессирует» интересующий маркер, представляет собой клетку или популяцию, в которой мРНК, кодирующая белок, или сам белок, включая его фрагменты, определяются как присутствующие в клетке или популяции. Экспрессию маркера можно выявлять различными способами. Например, в некоторых вариантах осуществления экспрессия маркера относится к поверхностной плотности маркера на клетке. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI), например, используемая при считывании данных проточной цитометрии, является репрезентативной для плотности маркера в популяции клеток. Специалист в данной области поймет, что значения MFI зависят от параметров окрашивания (например, яркости, продолжительности и температуры) и флуорохромной композиции. Однако MFI может быть количественным, если рассматривать его в отношении соответствующих контролей. Например, популяция клеток может быть указана, как экспрессирующая маркер, если MFI антитела к этому маркеру значительно выше, чем MFI соответствующего изотипного контрольного антитела на той же популяции клеток, окрашенных в эквивалентных

условиях. Дополнительно или альтернативно, популяция клеток может быть указана как экспрессирующая маркер, на основании подхода клетка-за-клеткой с использованием положительного и отрицательного гейтинга в соответствии с общепринятыми аналитическими способами проточной цитометрии (например, путем установки гейта в соответствии с изотипическим контролем или контролем «флуоресценция-минус-один» (FMO)). По этой метрике популяция может быть указана как «экспрессирующая» маркер, если количество клеток, выявленных положительными по маркеру, значительно выше, чем фон (например, путем гейтинга по изотипическому контролю).

Как применяют в настоящем документе, когда экспрессия в популяции указана как процент положительных клеток и этот процент сравнивают с соответствующим процентом положительных клеток референсной популяции, процентная разница представляет собой процент от родительской популяции для каждой соответствующей популяции. Например, если маркер экспрессируется на 10% клеток популяции А, и тот же маркер экспрессируется на 1% клеток популяции В, то указывают, что популяция А имеет на 9% большую частоту клеток, положительных по маркеру, чем популяция В (т.е. 10%-1%, а не 10%/1%). Когда частоту умножают на количество клеток в родительской популяции, вычисляют разницу в абсолютном количестве клеток. В примере, приведенном выше, если есть 100 клеток в популяции А и 10 клеток в популяции В, то популяция А имеет 100-кратное количество клеток по сравнению с популяцией В, т.е.  $(10\% \times 100) / (1\% \times 10)$ .

Уровень экспрессии маркера может быть уровнем экспрессии нуклеиновой кислоты (например, уровнем экспрессии ДНК или уровнем экспрессии РНК, например, уровнем экспрессии мРНК). Можно использовать любой подходящий способ определения уровня экспрессии нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии нуклеиновой кислоты определяют с помощью qPCR, rtPCR, RNA-seq, мультиплексной qPCR или RT-qPCR, анализа микропанелей, серийного анализа экспрессии гена (SAGE), способа MassARRAY, гибридизации in situ (например, FISH), или их сочетаний.

Как применяют в настоящем документе, «референсная популяция» клеток относится к популяции клеток, соответствующей клеткам, представляющим интерес, по сравнению с которой измеряют фенотип интересующих клеток. Например, уровень экспрессии маркера на выделенной популяции клеток  $\gamma\delta$ , полученной из негематопозитической ткани, можно сравнивать с уровнем экспрессии того же маркера на Т-клетке  $\gamma\delta$ , полученной из кроветворной ткани (например, резидентная клетка крови  $\gamma\delta$ , например, резидентная клетка крови  $\gamma\delta$ , полученная от того же донора или другого донора) или Т-клетке  $\gamma\delta$ , не имеющей гематопозитического происхождения и размноженной в других условиях (например, в присутствии существенной активации TCR, в присутствии экзогенного агента активации TCR (например, анти-CD3) или в существенном контакте со стромальными клетками (например, фибробластами)). Популяцию также можно сравнивать саму с собой в более раннем состоянии. Например,

референсная популяция может представлять собой выделенную популяцию клеток до ее. В этом случае размноженную популяцию сравнивается со своей собственным составом перед этапом размножения, т.е. ее прошлый состав в этом случае является референсной популяцией.

«Злокачественная опухоль» относится к нарушенной пролиферации злокачественных клеток и включает гематопозитическую злокачественную опухоль (например, гематологическое злокачественное новообразование, такое как лейкоз, такой как острый миелолейкоз (ОМЛ), хронический миелолейкоз (ХМЛ), хронический эозинофильный лейкоз (ХЭЛ), миелодиспластический синдром (МДС), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) и хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), лимфомы, такие как ходжкинская лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ) и множественная миелома (ММ)), и солидные злокачественные опухоли, такие как саркомы (например, саркома мягкой ткани, саркома матки), рак кожи, меланома (например, злокачественная меланома), рак мочевого пузыря, рак головного мозга, рак молочной железы, рак матки, рак яичника, рак предстательной железы, рак легких, колоректальный рак (например, колоректальная аденокарцинома), рак шейки матки, рак печени, рак головы и шеи (например, плоскоклеточная карцинома головы и шеи), рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак почки (например, почечноклеточная карцинома), рак надпочечников, рак желудка (например, аденокарцинома желудка), рак яичка, рак желчного пузыря и желчевыводящих путей, рак щитовидной железы, рак тимуса, рак кости, рак мозга, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, карцинома кости и мягких тканей, рак головного мозга, рак шейки матки, рак толстого кишечника, десмоидный рак, эмбриональный рак, рак эндометрия, рак пищевода, аденокарцинома желудка, мультиформная глиобластома, рак женских половых органов, остеосаркома, рак яичников, рак поджелудочной железы, аденокарцинома панкреатических протоков, первичная астроцитарная опухоль, первичный рак щитовидной железы, рабдомиосаркома, рак кожи, опухоль половых клеток яичка, уротелиальный рак и рак матки. Злокачественные клетки в злокачественной опухоли пациента могут быть иммунологически отличными от нормальных соматических клеток индивидуума (например, злокачественная опухоль может быть иммуногенной). Например, злокачественные клетки могут быть способны вызывать системный иммунный ответ в злокачественной опухоли пациента против одного или нескольких антигенов, экспрессируемых злокачественными клетками. Антигены, которые вызывают иммунный ответ, могут быть антигенами опухоли или могут быть общими с нормальными клетками. Пациент с злокачественной опухолью может демонстрировать, по меньшей мере, один идентифицируемый признак, симптом или лабораторные данные, достаточные для постановки диагноза злокачественной опухоли в соответствии с клиническими стандартами, известными в данной области. Примеры таких клинических стандартов можно найти в учебниках медицины, например в «Принципах внутренней медицины» Харрисона (Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson J, Loscalzo J. eds. 18e. New York, NY: McGraw-Hill; 2012). В некоторых случаях диагноз злокачественной опухоли у

индивидуума может включать идентификацию определенного типа клеток (например, злокачественной клетки) в образце жидкости тела или ткани, полученной от индивидуума.

Как применяют в настоящем документе, «солидная опухоль» представляет собой любую злокачественную опухоль ткани тела, кроме крови, костного мозга или лимфатической системы. Солидные опухоли могут быть далее разделены на опухоли эпителиального клеточного происхождения и опухоли неэпителиального клеточного происхождения. Примеры эпителиальных солидных опухолей включают опухоли желудочно-кишечного тракта, толстой кишки, молочной железы, предстательной железы, легкого, почки, печени, поджелудочной железы, яичника, головы и шеи, пероральной полости, желудка, двенадцатиперстной кишки, тонкого кишечника, толстого кишечника, ануса, желчного пузыря, губы, носоглотки, кожи, матки, мужского полового органа, мочевыводящих органов, мочевого пузыря и кожи. Солидные опухоли неэпителиального происхождения включают саркомы, опухоли головного мозга и опухоли костей.

Пациент, субъект или индивидуум, подходящий для вышеописанного лечения, может быть млекопитающим, таким как грызун (например, морская свинка, хомяк, крыса, мышь), мышиные (например, мышь), псовые (например, собака), кошачьи (например, кошка), лошадиные (например, лошадь), примат, обезьяна (например, хвостатая или бесхвостая обезьяна), хвостатая обезьяна (например, мартышка или бабуин), бесхвостая обезьяна (например, горилла, шимпанзе, орангутанг или гиббон) или человек.

В некоторых вариантах осуществления пациент, субъект или индивидуум является человеком. В других предпочтительных вариантах осуществления можно использовать не относящихся к человеку млекопитающих, особенно млекопитающих, которых обычно используют в качестве моделей для демонстрации терапевтической эффективности у людей (например, мышей, приматов, свиней, собак или кролика).

Как применяют в настоящем документе, «лечение» (и его грамматические вариации, такие как «лечить» или «леченный») относится к клиническому вмешательству для человека или животного (например, в ветеринарии), при котором достигается какой-то желаемый терапевтический эффект, например, торможение или задержка прогрессирования состояния, и включает снижение скорости прогрессирования, остановку скорости прогрессирования, улучшение состояния, излечение или ремиссию (частичную или полную) состояния, предотвращение, отсрочку, ослабление или купирование одного или нескольких симптомов и/или признаков состояния или продление выживаемости субъекта или пациента сверх ожидаемого при отсутствии лечения.

Также включено лечение в качестве профилактической меры (т.е. профилактика). Например, пациента, субъекта или индивидуума, подверженный риску или с риском возникновения или рецидива злокачественной опухоли, можно лечить, как описано в настоящем документе. Такое лечение может предотвратить или отсрочить возникновение или рецидив злокачественной опухоли у пациента, субъекта или индивидуума.

В частности, лечение может включать ингибирование роста злокачественной

опухоли, включая полную ремиссию злокачественной опухоли, и/или ингибирование метастазов злокачественной опухоли. Рост злокачественной опухоли, в основном, относится к любому из ряда показателей, которые указывают на изменение в пределах злокачественной опухоли на более развитую форму. Таким образом, индексы для измерения ингибирования роста злокачественной опухоли включают снижение выживаемости злокачественной клетки, уменьшение объема опухоли или морфологии (например, как определено с помощью компьютерной томографии (КТ), сонографии или других методов визуализации), замедленный рост опухоли, разрушение опухолевой сосудистой системы, улучшение показателей в тесте замедленной гиперчувствительности кожи, повышение активности цитолитических Т-лимфоцитов и снижение уровня опухолеспецифических антигенов. Снижение иммуносупрессии злокачественной опухоли у индивидуума может улучшить способность индивидуума противостоять росту злокачественной опухоли, в частности, росту злокачественной опухоли, уже присутствующей у индивидуума, и/или снизить склонность к росту злокачественной опухоли у индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления вводят размноженные Т-клетки  $\gamma\delta$  (например, Т-клетки  $\gamma\delta$ , полученные из негематопозитической ткани, например, Т-клетки V $\delta$ 1, полученные из негематопозитической ткани) для задержки развития заболевания или для замедления прогрессирования заболевания или нарушения.

Как применяют в настоящем документе, «введение» означает способ введения пациенту дозы терапии (например, адоптивной Т-клеточной терапии, включая, например, Т-клетки  $\gamma\delta$  негематопозитической ткани) или композиции (например, фармацевтической композиции, например, фармацевтической композиции, включающей негематопозитические Т-клетки  $\gamma\delta$ ). Композиции, используемые в способах, описанных в настоящем документе, можно вводить, например, внутримышечно, внутривенно, интрадермально, чрескожно, внутриартериально, интраперитонеально, внутрь очага поражения, внутричерепно, внутрисуставно, интрапростатически, внутривезикулярно, интратрахеально, внутриболоечно, интраназально, интравагинально, интаректально, подкожно, субконъюнктивально, внутривезикулярно, в слизистую, внутривезикулярно, внутривезикулярно, внутривезикулярно, интравитреально (например, путем интравитреальной инъекции), в виде глазных капель, перорально, местно, ингаляционно, инъекционно, путем имплантации, инфузией, непрерывным вливанием, путем непосредственного местного перфузионного промывания клеток-мишеней, при помощи катетера, путем лаважа, в кремах или в липидных композициях. Композиции, используемые в способах, описанных в настоящем документе, также можно вводить системно или местно. Способ введения может варьироваться в зависимости от различных факторов (например, вводимого терапевтического средства или композиции и тяжести состояния, заболевание или нарушения, которое лечат).

«Терапевтически эффективное количество» относится к количеству терапевтического средства для лечения или предотвращения заболевания или нарушения

у млекопитающего. В случае злокачественных опухолей, терапевтически эффективное количество терапевтического средства (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученные из негематопоэтической ткани) может снизить количество злокачественных клеток; уменьшить первичный размер опухоли; подавлять (т.е. замедлить до некоторой степени и предпочтительно остановить) инфильтрацию злокачественных клеток в периферические органы; подавлять (т.е. замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать) метастазирование опухоли; подавлять, до некоторой степени, рост опухоли; и/или в некоторой степени облегчать один или несколько симптомов, связанных с нарушением. В тех случаях, когда лекарственное средство может предотвращать рост и/или убивать существующие злокачественные клетки, оно может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. Для лечения злокачественной опухоли эффективность *in vivo* может, например, быть измерена путем оценки продолжительности выживания, времени до прогрессирования заболевания (ТТР), скорости ответа (например, полного ответа (CR) и частичного ответа (PR)), продолжительности ответа и/или качества жизни.

Термин «одновременно» применяют в настоящем документе для обозначения введения двух или более терапевтических средств, где, по меньшей мере, часть введения перекрывается по времени. Таким образом, одновременное введение включает схему дозирования, когда введение одного или нескольких агентов продолжается после прекращения введения одного или нескольких других агентов. Например, в некоторых вариантах осуществления Т-клетку  $\gamma\delta$ , полученную из негематопоэтической ткани, и IL-2 можно вводить одновременно.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает биологическую активность одного или нескольких активных ингредиентов, содержащихся в нем, и не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для пациента, которому будут вводить состав.

Как применяют в настоящем документе, термин «терминальный трансмембранный домен» относится к трансмембранному домену, имеющему несвязанный терминальный конец (например, С-конец, который не связан с пептидом или белком). Таким образом, терминальный трансмембранный домен не связан с внутриклеточным доменом, таким как внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления терминальный трансмембранный домен не участвует во внутриклеточном пути передачи сигнала (например, Т-клеточном пути передачи сигнала, таком как активация сигнала 1 или костимуляция сигнала 2).

Как применяют в настоящем документе, термин «химерный антигенный рецептор» или альтернативно «CAR» относится к рекомбинантной полипептидной конструкции, включая 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 случае каких-либо конфликтов или несоответствий между определениями, изложенными в настоящем документе, и определениями, предоставленными в любой из ссылок, включенных в настоящий документ в качестве ссылки, преимущественную силу имеют определения, изложенные в настоящем документе.

### **Т-клетки $\gamma\delta$ и другие врожденные лимфоциты, экспрессирующие гетерологичные нацеленные конструкции**

Лимфоциты, такие как Т-клетки  $\gamma\delta$  и другие врожденные лимфоциты (например, лимфоидные клетки врожденного иммунитета, такие как НК-клетки и НК-подобные Т-клетки, и связанные со слизистой инвариантные Т (MAIT)-клетки) являются привлекательными носителями для гетерологичных нацеленных конструкций, описываемых в настоящем документе, так как они могут быть трансдуцированы гетерологичными нацеленными конструкциями с сохранением при этом их врожденных способностей распознавать патогенные клетки, такие как злокачественные клетки и инфицированные клетки. Трансдукцию можно проводить с использованием любого подходящего известного в данной области способа или способа, описанного в настоящем документе, такого как электропорация, редактирование генов (например, с помощью кластеризованных коротких палиндромных повторов с регулярными промежутками (CRISPR), цинковой нуклеазы (ZFN), трансфекции), доставка транспозоном, и т.д. Кроме того, отсутствие MHC-зависимого распознавания антигена, например, Т-клетками  $\gamma\delta$ , снижает потенциал реакции «трансплантат против хозяина» и позволяет им воздействовать на опухоли, экспрессирующие низкие уровни MHC. Аналогичным образом, отсутствие зависимости Т-клетки  $\gamma\delta$  от костимуляции общепринятого сигнала 2, например, посредством задействования CD28, усиливает нацеливание на опухоли, экспрессирующие низкие уровни лигандов для костимуляторных рецепторов.

В одном из аспектов, изобретение относится к Т-клеткам  $\gamma\delta$ , НК-клеткам, НК-подобным Т-клеткам, лимфоидным клеткам врожденного иммунитета, и MAIT-клеткам и их клеточным популяциям, экспрессирующим на своей поверхности гетерологичную нацеленную конструкцию. Такие Т-клетки  $\gamma\delta$ , НК-клетки, НК-подобные Т-клетки, лимфоидные клетки врожденного иммунитета, и MAIT-клетки, сконструированные для экспрессии гетерологичной нацеленной конструкции, можно использовать для нацеливания на желаемый антиген посредством антигенсвязывающего домена в гетерологичной конструкции. Поскольку Т-клетки  $\gamma\delta$  не полагаются на рецепторы MHC для ответа на чужеродные патогены, гетерологичная нацеленная конструкция не требует внутриклеточного домена для индукции цитолиза или цитотоксичности, в отличие от общепринятых систем химерных антигенных рецепторов (CAR), используемых как часть общепринятых схем лечения (например,  $\alpha\beta$ ) адоптивной Т-клеточной иммунотерапии. Вместо этого Т-клетки  $\gamma\delta$  вызывают внутренний, специфичный для мишени цитолиз, и этот ответ можно дополнительно усилить, улучшив и увеличив время контакта с клеткой-мишенью (например, опухолью, например, солидной опухолью) с помощью гетерологичной конструкции. Т-клетка  $\gamma\delta$ , сконструированная с гетерологичной

конструкцией, может связывать целевой антиген, такой как опухолеассоциированный антиген, и вызывать цитотоксичность и/или цитолиз. Эта цитотоксичность может быть опосредована эндогенной экспрессией активирующих рецепторов, таких как NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 и/или DNAM1.

Гетерологичная нацеленная конструкция может иметь внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен, функционально связанный с антигенсвязывающим доменом. Может быть дополнительно включен стеблевой домен как часть гетерологичной нацеленной конструкции, чтобы связать антигенсвязывающий домен с трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления в гетерологичной конструкции, представленной в настоящем документе, отсутствует внутриклеточный домен (фиг. 1), а также отсутствует способность активировать передачу сигналов TCR (например, посредством активации сигнала 1 и/или активации сигнала 2 (т.е. со- стимуляции)).

В некоторых вариантах осуществления цитолиз характеризуется дегрануляцией (например, дегрануляцией CD107) T-клетки  $\gamma\delta$ , высвобождением гранзима посредством T-клетки  $\gamma\delta$ , высвобождением перфорина T-клеткой  $\gamma\delta$ , уничтожением клетки-мишени, пролиферацией T-клетки  $\gamma\delta$ , или выработкой цитокинов T-клеткой  $\gamma\delta$ . Специалист в данной области понимает, что можно использовать различные анализы, которые измеряют эти свойства или активность, для оценки эффективности сконструированной T-клетки, например, при лечении злокачественной опухоли.

Как правило, дегрануляция является предпосылкой цитолиза. Дегранулирующие клетки можно идентифицировать, например, по поверхностной экспрессии LAMP-1 (белок 1, связанный с лизосомами мембраны, также известный как CD107). CD107 временно экспрессируется на поверхности и быстро интернализуется после дегрануляции. В неактивированном состоянии CD107a находится в цитоплазме в мембране цитолитической гранулы. Повышенную регуляцию можно измерить (например, с помощью FACS) путем окрашивания CD107 в присутствии мононзина для предотвращения подкисления меченных антителом интернализованных CD107a-содержащих везикул.

Анализы на перфорин и гранзим также могут быть измерены при помощи FACS, согласно известным в данной области способам. Цитотоксические T-клетки  $\gamma\delta$  убивают свою цель с помощью механизмов, опосредованных гранулой или рецептором. Цитотоксические гранулы представляют собой секреторные лизосомы, предварительно сформированные в цитоплазме, содержащей литические белки (перфорин и гранзимы). При распознавании клетки-мишени литические белки секретируются путем экзоцитоза. При распознавании клетки-мишени снижение уровня внутриклеточного гранзима и/или перфорина можно, таким образом, измерить с помощью FACS.

Анализы клеточного лизиса можно использовать для отслеживания воздействия T-клетки  $\gamma\delta$ , экспрессирующей гетерологичную нацеленную конструкцию. Анализ кинетики лизиса клетки-мишени можно использовать для отслеживания процента лизиса с течением

времени при различных соотношениях между эффектором и мишенью. Анализ лизиса клетки-мишени в конечной точке (например, люциферазный анализ) можно использовать для отслеживания процента лизиса в конкретное время конечной точки при различных соотношениях эффектор-мишень. Формирование иммунологического синапса (например, наблюдаемое при визуализации живой клетки) можно использовать для измерения кинетики связывания, распознавания цели (например, поток Са в эффекторные клетки), летального удара (например, по измерению покраснения йодида пропидия в клетках-мишенях) или округления клеток-мишеней.

В некоторых вариантах осуществления связывание антигенсвязывающего домена с целевым антигеном, экспрессируемым на здоровой клетке, по существу не запускает цитолиз в сконструированной Т-клетке  $\gamma\delta$ . В некоторых вариантах осуществления связывание антигенсвязывающего домена с целевым антигеном, экспрессируемым на опухолевой клетке или инфицированной клетке, по существу запускает цитолиз в сконструированной Т-клетке  $\gamma\delta$ .

В одном из аспектов, изобретение относится к клетке (например, Т-клетке  $\gamma\delta$ , НК-клетке, НК-подобной Т-клетке, лимфоидной клетке врожденного иммунитета, или МАИТ-клетке), сконструированной для экспрессии гетерологичной нацеленной конструкции, где сконструированная клетка демонстрирует противоопухолевое свойство. В одном из аспектов, клетку трансфицируют (например, путем нуклеофекции, электропорации и т.д.) гетерологичной нацеленной конструкцией, и гетерологичная нацеленная конструкция экспрессируется на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления клетка (например, Т-клетка  $\gamma\delta$ , НК-клетка, НК-подобная Т-клетка, лимфоидная клетка врожденного иммунитета, или МАИТ-клетка) трансдуцирована вирусным вектором, кодирующим гетерологичную нацеленную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор. В некоторых таких вариантах осуществления, клетка может стабильно экспрессировать гетерологичную нацеленную конструкцию. В другом варианте осуществления клетка (например, Т-клетку  $\gamma\delta$ , НК-клетку, НК-подобную Т-клетку, лимфоидную клетку врожденного иммунитета, или МАИТ-клетку) трансфицируют (например, путем нуклеофекции, электропорации и т.д.) нуклеиновой кислотой, например, мРНК, кДНК, ДНК, кодирующей гетерологичную нацеленную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления клетка может временно экспрессировать гетерологичную нацеленную конструкцию.

В одном из аспектов, изобретение относится к клеточной популяции (например, выделенной клеточной популяции) сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, по меньшей мере,  $10$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$  или  $10^{13}$  клеток), где, по меньшей мере, 10% (например, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, или по существу все) клеточной популяции состоит из сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$ , экспрессирующих гетерологичную нацеленную конструкцию.

Альтернативно, изобретение относится к клеточной популяции (например, выделенной клеточной популяции) сконструированных НК-клеток или НК-подобных Т-клеток (например, по меньшей мере,  $10$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$  или  $10^{13}$  НК-клеток или НК-подобных Т-клеток), где, по меньшей мере, 10% (например, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, или по существу все) клеточной популяции сконструированы для экспрессии гетерологичной нацеленной конструкции.

Альтернативно, изобретение относится к клеточной популяции (например, выделенной клеточной популяции) сконструированных лимфоидных клеток врожденного иммунитета (например, по меньшей мере,  $10$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$  или  $10^{13}$  НК-клеток или НК-подобных Т-клеток), где, по меньшей мере, 10% (например, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, или по существу все) клеточной популяции сконструированы для экспрессии гетерологичной нацеленной конструкции. Альтернативно, изобретение относится к клеточной популяции (например, выделенной клеточной популяции) сконструированных МАИТ-клеток (например, по меньшей мере,  $10$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$  или  $10^{13}$  НК-клеток или НК-подобных Т-клеток), где, по меньшей мере, 10% (например, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, или по существу все) клеточной популяции сконструированы для экспрессии гетерологичной нацеленной конструкции.

### **Гетерологичные нацеленные конструкции**

Различные типы Т-клеток  $\gamma\delta$ , НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета или МАИТ-клеток могут быть модифицированы для включения гетерологичной нацеленной конструкции для получения сконструированной Т-клетки  $\gamma\delta$ , НК-клетки, НК-подобной Т-клетки, лимфоидной клетки врожденного иммунитета, или МАИТ-клетки. Гетерологичная нацеленная конструкция включает внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен. Например, гетерологичная нацеленная конструкция может включать внеклеточный антигенсвязывающий домен, функционально связанный с трансмембранным доменом с помощью 1-1000 аминокислотных остатков (например, 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-100, 100-250, 250-500 или 500-1000 аминокислотных остатков). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связан с трансмембранным доменом посредством стеблевого домена. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, стеблевой домен и трансмембранный домен являются функционально связанными в ориентации от N- к C-концу (например, N-антигенсвязывающий домен-стеблевой домен-трансмембранный домен-C). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, стеблевой домен и трансмембранный домен напрямую связаны в ориентации от N- к C-концу.

В основном, гетерологичная нацеленная конструкция, описываемая в настоящем документе, включает антигенсвязывающий домен определенного антитела без внутриклеточного сигнального домена. В отличие от сконструированных Т-клеток  $\alpha\beta$

(например, Т-клеток с CAR), которые неэффективны без функционального внутриклеточного домена (Ghosh et al., Nat. Med., 23: 242-251, 2017; Whilding et al. Mol. Ther., 25: 259-273, 2017; и Wilkie et al. J. Biol. Chem., 285: 25538-25544, 2010), активация врожденных лимфоцитов, таких как Т-клетки  $\gamma\delta$ , может опосредоваться посредством гетерологичной нацеленной конструкции без функционального внутриклеточного домена. Специалист в данной области понимает, что полипептид может содержать нефункциональные внутриклеточные аминокислотные остатки, например, в виде расширения трансмембранного домена, который непосредственно не активирует сконструированную Т-клетку. Например, в некоторых аспектах, трансмембранный домен может включать дополнительные элементы для целей структуры, стабильности и/или экспрессии или может иметь нефункциональный внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления не более, чем 50% (например, не более, чем 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%) остатков С-концевого трансмембранного домена расположены внутриклеточно.

#### *Антигенсвязывающий домен*

Антигенсвязывающий домен может быть антителом или фрагментом антитела, сконструированным для специфического связывания с мишенью. Антигенсвязывающие домены могут принимать форму различных структур, например, В-клеточного рецептора, каркаса антитела или миметика (например, аффитело, аффилин, антикалин, аптамер, атример, дарпин, каркас FN3, финомер, домен Куница, пронектин, О-тело, бициклический пептид, цис-узел и т.д.), одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), моноклонального антитела (mAb), антигенсвязывающего фрагмента (Fab), или Т-клеточного рецептора (TCR) (фиг. 2А). Антигенсвязывающий домен может связываться с мишенью, такой как опухлеассоциированный антиген (ТАА; например, ТАА, экспрессируемый на солидной опухоли). ТАА может быть, например, белковым или пептидным антигеном, который экспрессируется на поверхности опухолевой клетки. Альтернативно, ТАА включают углеводы или ганглиозиды, экспрессированные на поверхности опухолевой клетки. В некоторых вариантах осуществления ТАА представляет собой иммуносупрессивный антиген. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен является лиганд-специфическим рецептором, как показано на ФИГ. 2Б. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен является рецептор-специфическим лигандом, как показано на ФИГ. 2С.

В одном из аспектов, часть гетерологичной нацеленной конструкции, которая связывается с мишенью, представляет собой scFv. В одном из аспектов такие фрагменты антител являются функциональными в том смысле, что они сохраняют эквивалентную аффинность связывания, например, они связывают тот же антиген с сопоставимой эффективностью, что и антитело IgG, из которого они получены. Альтернативно, они могут быть сконструированы для усиленной аффинности связывания или более слабой аффинности связывания по мере необходимости, например, для достижения оптимальной кинетики связывания (например, avidности) на основе, например, плотности экспрессии

целевого антигена. В одном из аспектов такие фрагменты антител являются функциональными в том смысле, что они обеспечивают биологический ответ, который может включать в себя в качестве неограничивающих примеров, активацию иммунного ответа, ингибирование возникновения сигнала трансдукции от целевого антигена, ингибирование активности киназ и т.п., что будет понятно специалистам в данной области.

В одном из аспектов, антигенсвязывающий домен гетерологичной нацеленной конструкции представляет собой фрагмент scFv мышинового антитела. В другом аспекте антигенсвязывающий домен гетерологичной нацеленной конструкции представляет собой фрагмент scFv антитела, который является гуманизированным по сравнению с мышиной последовательностью scFv, из которой он был получен. Гуманизация scFv мыши может быть желательной в клинических условиях, где специфичные для мыши остатки могут вызывать реакцию человеческого антитела на мышинный антиген (НАМА) у пациентов, получающих лечение сконструированными Т-клетками.

В одном из аспектов, часть антигенсвязывающего домена гетерологичной нацеленной конструкции кодируется трансгеном, последовательность кодонов которого оптимизирована для экспрессии в клетке млекопитающего. В одном из аспектов вся гетерологичная нацеленная конструкция по изобретению кодируется трансгеном с последовательностью, которая была оптимизирована по кодонам для экспрессии в клетке млекопитающего. Оптимизация кодонов относится к открытию того факта, что частота встречаемости синонимичных кодонов (т.е. кодонов, кодирующих одну и ту же аминокислоту) в кодирующей ДНК смещена у разных видов. Такая вырожденность кодонов позволяет ряду нуклеотидных последовательностей кодировать одинаковый полипептид. Ряд способов оптимизации кодонов известен в данной области и включает, например, способы, раскрытые в патентах США №№ 5786464 и 6114148, оба включены в настоящий документ в качестве ссылок во всей их полноте.

В одном из аспектов, гетерологичная нацеленная конструкция по изобретению включает мишень-специфический связывающий элемент антигенсвязывающего домена. Выбор группы зависит от типа и количества лигандов, определяющих поверхность клетки-мишени. Например, антигенсвязывающий домен может быть выбран для распознавания лиганда, который действует как поверхностный клеточный маркер на клетках-мишенях и связан с определенным состоянием болезни. Примеры поверхностных клеточных маркеров, которые могут действовать как лиганды для антигенсвязывающего домена в гетерологичной нацеленной конструкции по изобретению, включают те, которые связаны с злокачественной опухолью, а также вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями.

В одном из аспектов, Т-клеточный ответ, опосредованный гетерологичной нацеленной конструкцией, может быть направлен на интересующий антиген путем конструирования антигенсвязывающего домена, который специфически связывает желаемый антиген в гетерологичной нацеленной конструкции. Антигенсвязывающий

домен может быть любым доменом, который связывается с антигеном, включая в качестве неограничивающих примеров, моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, и его функциональный фрагмент, включая в качестве неограничивающих примеров однодоменное антитело, такое как переменный домен тяжелой цепи (VH), переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен нанотела, полученного от верблюжьих, и альтернативный каркас, известный в данной области, для функционирования в качестве антигенсвязывающего домена, такой как рекомбинантный фибронектиновый домен, и т.п. В некоторых случаях полезно, чтобы антигенсвязывающий домен происходил из того же вида, в котором в конечном итоге будет использоваться гетерологичная нацеленная конструкция. Например, для применения у людей, может быть выгодно для антигенсвязывающего домена гетерологичной нацеленной конструкции включить человеческие или гуманизированные остатки для антигенсвязывающего домена антитела или фрагмента антитела.

В некоторых вариантах осуществления любого аспекта изобретения, гетерологичная нацеленная конструкция включает антигенсвязывающий домен, который является гуманизированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Гуманизированное антитело можно получать с использованием ряда способов, известных в данной области, включая в качестве неограничивающих примеров, CDR-прививки (см., например, европейский патент № EP 239400; публикацию PCT № WO 91/09967; и патенты США №№ 5225539, 5530101, и 5585089, каждый из которых в полном объеме представлен в настоящем документе посредством ссылки), маскировку поверхностных остатков или изменение поверхности (см., европейские патенты №№ EP 592106 и EP 519596, каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки), перестановку цепей (см., например, патент США № 5565332, который в полном объеме включен в настоящий документ посредством ссылки), и способы, раскрытые, например, в публикации патентной заявки США №. 2005/0042664, публикации патентной заявки США №. 2005/0048617, патентах США №№ 6407213 и 5766886, и международной публикации № WO 93/17105, каждый из которых в полном объеме включен в настоящий документ посредством ссылки). Часто каркасные остатки в каркасных областях будут заменены соответствующими остатками из CDR донорного антитела для изменения, например, улучшения, связывания антигена. Эти каркасные замены идентифицируют способами, хорошо известными в данной области, например, путем моделирования взаимодействий CDR и каркасных остатков для идентификации каркасных остатков, важных для связывания антигена, и сравнения последовательностей для идентификации необычных каркасных остатков в определенных положениях. См., например, патент США № 5585089, включенный в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

Гуманизированное антитело или фрагмент антитела имеет один или несколько аминокислотных остатков, оставшихся в нем из источника, который не принадлежит человеку. Эти не принадлежащие человеку аминокислотные остатки часто обозначают как

«импортные» остатки, которые, как правило, взяты из «импортного» переменного домена. Как предлагается в настоящем документе, гуманизированные антитела или фрагменты антител содержат одну или несколько CDR из не принадлежащих человеку молекул иммуноглобулина и каркасные области, где аминокислоты, включающие каркас, происходят полностью или в основном из зародышевой линии человека. Множественные способы гуманизации антитела или фрагментов антител хорошо известны в данной области и могут быть по существу выполнены в соответствии со способами, описанными Jones et al., *Nature*, 1986, 321: 522-525; Riechmann et al., *Nature*, 1988, 332: 323-327; и Verhoeven et al., *Science*, 1988, 239: 1534-1536, каждый из которых включен в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме, путем замены CDR или последовательностей CDR грызуна на соответствующие последовательности антитела человека, т.е. CDR-прививка. В таких гуманизированных антителах и их антигенсвязывающих фрагментах по существу меньше чем интактный человеческий переменный домен был заменен последовательностью от не являющихся человеком видов. Гуманизированные антитела часто представляют собой антитела человека, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, некоторые остатки каркаса (FR) заменены остатками из аналогичных сайтов в антителах грызунов.

В некоторых аспектах, часть гетерологичной нацеленной конструкции по изобретению, которая включает фрагмент антитела, является гуманизированной с сохранением высокой аффинности для целевого антигена и других благоприятных биологических свойств. По одному из аспектов изобретения, гуманизированные антитела и фрагменты получают путем анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей родительских и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулина общедоступны и хорошо известны специалистам в данной области. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных кандидатных иммуноглобулиновых последовательностей. Проверка этих изображений позволяет проанализировать вероятную роль остатков в функционировании кандидатной иммуноглобулиновой последовательности, например, анализ остатков, которые влияют на способность кандидатного иммуноглобулина связывать целевой антиген. Таким образом, остатки FR можно выбирать и комбинировать от реципиентной и импортной последовательностей, таким образом, чтобы достигалась желаемая характеристика антитела или фрагмента антитела, такая как повышенная аффинность для целевого антигена. В основном, остатки CDR непосредственно и наиболее по существу участвуют во влиянии на связывание антигена.

В некоторых случаях scFvs можно получать в соответствии с известной в данной области способом (см., Например, Bird et al., *Science*, 1988, 242: 423-426 и Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85: 5879-5883; каждый включен в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме). Молекулы ScFv можно получить, соединив области

VH и VL вместе с помощью гибких полипептидных линкеров. Молекулы ScFv включают линкер (например, линкер Ser-Gly) с оптимизированной длиной и/или аминокислотным составом. Длина линкера может сильно влиять на то, как переменные области scFv сворачиваются и взаимодействуют. Фактически, если используется короткий полипептидный линкер (например, длиной 5-10 аминокислота), сворачивание внутри цепи предотвращается. Сворачивание межцепочечных цепей также необходимо для объединения двух переменных областей с образованием функционального участка связывания эпитопа. Для примеров ориентации и размера линкера см., например, Hollinger et al. Proc Natl Acad. Sci. USA, 1993, 90: 6444-6448, публикацию США №№ 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, и международные патентные публикации №№ WO 2006/020258 и WO 2007/024715, которые включены в настоящий документ в качестве ссылок.

Между областями VL и VH scFv может содержать линкер, по меньшей мере, из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, или более аминокислотных остатков. Линкерная последовательность может содержать любую природную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит аминокислоты глицин и серин. В другом варианте осуществления линкерная последовательность включает наборы повторов глицина и серина, такие как (GGGS)<sub>n</sub>, где n представляет собой положительное целое число, равное или больше 1 (например, 1, 2, 3, 4, 5 или больше). Вариация длины линкера может сохранять или усиливать активность, что приводит к более высокой эффективности связывания и активности.

Кинетику цитолиза клетки-мишени сконструированной T-клеткой  $\gamma\delta$  по изобретению определяют, частично, по аффинности связывания антигенсвязывающего домена. Любой из антигенсвязывающих доменов, предлагаемых в настоящем документе, можно по желанию модифицировать в соответствии с известными способами для увеличения или уменьшения аффинности связывания с конкретной мишенью. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен имеет аффинность связывания или константу диссоциации ( $K_D$ ) для своего антигена от  $10^{-4}$  М до  $10^{-10}$  М (например, от  $10^{-4}$  М до  $10^{-5}$  М, от  $10^{-5}$  М до  $10^{-6}$  М, от  $10^{-6}$  М до  $10^{-7}$  М, от  $10^{-7}$  М до  $10^{-8}$  М, от  $10^{-8}$  М до  $10^{-9}$  М, от  $10^{-9}$  М до  $10^{-10}$  М, например, от  $10^{-5}$  М до  $10^{-9}$  М, от  $10^{-5}$  М до  $10^{-8}$  М, от  $10^{-5}$  М до  $10^{-7}$  М, от  $10^{-5}$  М до  $10^{-6}$  М, от  $10^{-6}$  М до  $10^{-10}$  М, от  $10^{-6}$  М до  $10^{-9}$  М, от  $10^{-6}$  М до  $10^{-8}$  М, от  $10^{-6}$  М до  $10^{-7}$  М, от  $10^{-7}$  М до  $10^{-10}$  М, от  $10^{-7}$  М до  $10^{-9}$  М, от  $10^{-7}$  М до  $10^{-8}$  М, от  $10^{-8}$  М до  $10^{-10}$  М, от  $10^{-8}$  М до  $10^{-9}$  М, или от  $10^{-9}$  М до  $10^{-10}$  М, при измерении при стандартных физиологических температурах и давлениях, например, путем поверхностного плазмонного резонанса, например, VIAcore).

В дополнение к аффинности связывания антигенсвязывающего домена сконструированной T-клетки  $\gamma\delta$  с клеткой-мишенью, в эффективном связывании и последующем лизисе клеток-мишеней также играют роль avidные взаимодействия. Avidность продиктована (а) аффинностью связывания антигенсвязывающего домена и (б)

количеством взаимодействий между антигенсвязывающим доменом и антигеном вдоль данной области контакта между Т-клеткой и мишенью. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка  $\gamma\delta$  содержит на своей поверхности, от  $10^2$  до  $10^6$  антигенсвязывающих доменов (например, от  $10^2$  до  $10^3$ , от  $10^3$  до  $10^4$ , от  $10^4$  до  $10^5$ , от  $10^5$  до  $10^6$ , от  $10^2$  до  $10^4$ , от  $10^2$  до  $10^5$ , от  $10^3$  до  $10^4$ , от  $10^3$  до  $10^5$ , от  $10^3$  до  $10^6$ , от  $10^4$  до  $10^5$ , от  $10^4$  до  $10^6$ , или от  $10^5$  до  $10^6$  антигенсвязывающих доменов).

#### *Стеблевой домен*

Гетерологичная нацеленная конструкция по настоящему изобретению может включать в себя стеблевой домен, расположенный между трансмембранным доменом и внеклеточным антигенсвязывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления стеблевой домен включает один или несколько доменов, выбранных из группы, состоящей из стебля CD8, шарнира-константного домена тяжелой цепи (CH) IgG (например, шарнира-константного домена CH2 IgG1, шарнира-константного домена CH3 IgG1, или шарнира-константных доменов CH2-CH3 IgG1), шарнира (G4S)<sub>3</sub>, шарнира IgG1, стебля CD7, шарнира-домена CH2 IgD, шарнира-домена CH3 IgD, шарнира-доменов CH2-CH3 IgD, шарнира-домена CH2 IgG4, шарнира-домена CH3 IgG4, шарнира-доменов CH2-CH3 IgG4 или стебля FcεRI. Стебель может обеспечивать гибкость между внеклеточными и трансмембранными доменами и может способствовать распознаванию мишени. Специалист в данной области должен понимать, что стеблевой домен может включать одну или несколько дополнительных аминокислот, смежных с внеклеточной или трансмембранной областью, например, одну или несколько аминокислот, связанных с внеклеточными или трансмембранными областями белка, из которого был получен стебель (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот внеклеточных или трансмембранных областей). Стебель может необязательно включать один или несколько линкеров, таких как (GGGGS)<sub>n</sub> или GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 1).

#### *Трансмембранный домен*

В различных вариантах осуществления любого аспекта изобретения, гетерологичная нацеленная конструкция может быть сконструирована так, чтобы включать трансмембранный домен, который присоединен к внеклеточному домену (доменам). Трансмембранный домен может включать одну или несколько дополнительных аминокислот, прилегающих к трансмембранной области, например, одну или несколько аминокислот, связанных с внеклеточной областью белка, из которого был получен трансмембранный домен (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот из внеклеточной области) и/или одну или несколько дополнительных аминокислот, связанных с внутриклеточной областью белка, из которого получен трансмембранный белок (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 до 15 аминокислот из внутриклеточной области). В одном из аспектов, трансмембранный домен представляет собой домен, который связан с одним из других доменов гетерологичной нацеленной конструкции. В некоторых случаях трансмембранный домен можно выбирать или модифицировать путем замены аминокислот, чтобы избежать связывания таких доменов с

трансмембранными доменами таких же или других белков поверхностной мембраны, например, чтобы минимизировать взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса. Таким образом, в некоторых случаях трансмембранный домен по существу не распространяет сигнал активации 1 и/или сигнал активации 2 (костимуляцию).

Альтернативно, трансмембранный домен можно выбирать по его способности связываться, индуцировать кластеризацию, активировать, фосфорилировать, дефосфорилировать или иным образом взаимодействовать с другими белками (например, эндогенными белками, например, эндогенными белками, ассоциированными с мембраной, например, такими как трансмембранные белки). Например, в некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может связываться с костимулирующим белком, тем самым косвенно активируя клетку (например, Т-клетку  $\gamma\delta$ ) путем распространения костимулирующего сигнала 2. В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен происходит из трансмембранной части NKG2D, которая может связываться с эндогенно экспрессируемым DAP10 для распространения активации сигнала 2 (костимуляции) клетки-хозяина. В таких случаях гетерологичная нацеленная конструкция не имеет функционального внутриклеточного домена, способного активировать клетку. Например, гетерологичная нацеленная конструкция может быть лишена внутриклеточного домена, или она может содержать инертный внутриклеточный домен, который не передает сигнал активации 1 или 2. Например, трансмембранный домен, который может распространять сигнал 2, путем рекрутирования или связывания эндогенной костимулирующей молекулы, может быть терминальным трансмембранным доменом (например, нет дополнительных доменов, прикрепленных к одному из его концов).

В одном из аспектов, трансмембранный домен способен к гетеро- или гомодимеризации с другой гетерологичной нацеленной конструкцией на поверхности Т-клетки  $\gamma\delta$ . В другом аспекте аминокислотная последовательность трансмембранного домена может быть модифицирована или замещена таким образом, чтобы минимизировать взаимодействия с связывающимися доменами нативного связывающего партнера, присутствующего в той же сконструированной Т-клетке.

Трансмембранный домен можно получать из природного или рекомбинантного источника. Если источник является природным, домен можно получать из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранный домен для конкретного применения в настоящем изобретении может включать, по меньшей мере, трансмембранную область (области), например, из альфа, бета или дзета цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD16, CD18, CD22, CD29, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD94, CD134, CD137, CD154, CD7, CD3 дзета, CD71, Fc-рецептора гамма (Fc $\gamma$ R), или NKG2D. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может включать, например, трансмембранный домен CD8, трансмембранный домен CD4, трансмембранный домен CD3 $\zeta$ , или трансмембранный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления

трансмембранный домен представляет собой терминальный трансмембранный домен (например, к одному из его концов не прикреплены дополнительные домены).

В некоторых случаях, трансмембранный домен может быть присоединен к внеклеточной области гетерологичной нацеленной конструкции, например, к антигенсвязывающему домену гетерологичной нацеленной конструкции, через шарнир, например, шарнир из человеческого белка. Например, в одном из вариантов осуществления шарнир может быть шарниром человеческого Ig (иммуноглобулина), например, шарниром IgG1, шарниром IgG4, шарниром IgD, или шарниром CD8 $\alpha$ .

В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен является рекомбинантным, и в этом случае он будет содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В одном из аспектов, на каждом конце рекомбинантного трансмембранного домена можно найти триплет из фенилаланина, триптофана и валина.

Необязательно, короткий полипептидный линкер, например, размером между двумя и десятью аминокислотами в длину, может образовывать связь между трансмембранным доменом и цитоплазматической областью гетерологичной нацеленной конструкции. Дублет глицин-серин представляет собой пример подходящего линкера. Например, в одном из аспектов, линкер включает аминокислотную последовательность (GGGGS)<sub>n</sub> или GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 1).

#### **Способы сбора и размножения Т-клеток $\gamma\delta$**

Сконструированные Т-клетки  $\gamma\delta$  по изобретению можно получать из любой подходящей аутологичной или аллогенной Т-клетки  $\gamma\delta$  или из популяции таких клеток. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки  $\gamma\delta$ , подходящие для применения в качестве источника описываемых сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$  включают клетки V $\delta$ 1, клетки V $\delta$ 2, клетки V $\delta$ 3, клетки V $\delta$ 5 и клетки V $\delta$ 8. В некоторых вариантах осуществления популяция сконструированной Т-клетки  $\gamma\delta$  получена из популяции клеток V $\delta$ 1, клеток V $\delta$ 3, клеток V $\delta$ 5 или клеток V $\delta$ 8.

Например, в настоящем документе предлагаются способы выделения и размножения клеток V $\delta$ 1 из негематопоэтической ткани, такой как кожа или кишечник. Например, клетки V $\delta$ 1 можно выделять из биоптатов кожи человека, как описано в U.S. 2018/0312808, таким образом, включенного в качестве ссылки в полном объеме, и конкретно для способов выделения клеток V $\delta$ 1 из ткани.

В других вариантах осуществления подходящие Т-клетки  $\gamma\delta$  могут быть получены из крови (например, периферической крови). Способы выделения и размножения клеток V $\delta$ 1 из крови включают способы, описанные, например, в патенте США № 9499788 и Международной Патентной публикации № WO 2016/198480, каждая из которых включена в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки  $\gamma\delta$  могут быть получены из опухолевой ткани (например, инфильтрирующие опухоль Т-клетки  $\gamma\delta$ ). Альтернативно, подходящие Т-клетки  $\gamma\delta$ , которые могут быть сконструированы для экспрессии гетерологической нацеленной

конструкции, можно получать из негематопозитической ткани согласно способам, описанным ниже.

*Выделение и размножение Т-клеток  $\gamma\delta$  из крови*

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки  $\gamma\delta$  по настоящему изобретению получают из крови (например, периферической крови) индивидуума. Например, сконструированные Т-клетки  $\gamma\delta$  можно получать из полученных из крови клеток V $\delta$ 2 или полученных из крови клеток V $\delta$ 1.

В некоторых вариантах осуществления мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) можно получать от индивидуума в соответствии с любым подходящим в данной области способом. РВМС можно культивировать в присутствии аминокислот (например, золедриновой кислоты), синтетических фосфоантигенов (например, пирофосфата бромгидрина; ВгНРР), 2МЗВ1РР или 2-метил-3-бутенил-1-пирофосфата в ИЛ-2 в течение 1-2 недель для создания обогащенной популяции клеток V $\delta$ 2. Альтернативно, иммобилизованное анти-TCR $\gamma\delta$  (например, пан TCR $\gamma\delta$ ) может индуцировать преимущественное размножение клеток V $\delta$ 2 из популяции РВМС в присутствии ИЛ-2, например, примерно в течение 14 суток. В некоторых вариантах осуществления предпочтительное размножение клеток V $\delta$ 2 из РВМС может быть достигнуто при культивировании иммобилизованных антител к CD3 (например, ОКТ3) в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-4. В некоторых вариантах осуществления указанную выше культуру поддерживают примерно семь суток до субкультивирования растворимых анти-CD3, ИЛ-2 и ИЛ-4. Альтернативно, искусственные антигенпредставляющие клетки можно использовать для стимулирования преимущественного размножения Т-клеток  $\gamma\delta$ , таких как клетки V $\delta$ 2. Например, полученные из РВМС Т-клетки  $\gamma\delta$ , культивируемые в присутствии облученных аАРС, ИЛ-2 и/или ИЛ-21, могут размножаться с образованием популяции Т-клеток  $\gamma\delta$ , включающей высокую долю клеток V $\delta$ 2, умеренную долю клеток V $\delta$ 1, и некоторые двойные отрицательные клетки. В некоторых вариантах осуществления указанных выше способов, РВМС могут быть предварительно обогащены или обогащены после (например, посредством положительного отбора с TCR $\gamma\delta$ -специфическими агентами или отрицательного отбора с TCR $\alpha\beta$ -специфическими агентами). Такие способы и другие подходящие способы размножения Т-клеток  $\gamma\delta$ , таких как клетки V $\delta$ 2 клетки подробно описаны у Deniger et al., *Frontiers in Immunology* 2014, 5, 636: 1-10, включенной в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки V $\delta$ 1 можно сконструировать для экспрессии гетерологичной нацеленной конструкции. Можно использовать любой подходящий способ для получения популяции Т-клеток V $\delta$ 1. Например, Almeida et al. (*Clinical Cancer Research* 2016, 22, 23; 5795-5805, включен в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме), предлагают подходящие способы получения популяции Т-клеток V $\delta$ 1, которые могут быть сконструированы для экспрессии гетерологичной нацеленной конструкции, описываемой в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах осуществления РВМС предварительно обогащают с

использованием сортировки с магнитными шариками, что приводит на выходе к более чем 90% Т-клеток  $\gamma\delta$ . Эти клетки можно культивировать в присутствии одного или нескольких факторов (например, агонистов TCR, агонистов ко-рецепторов, и/или цитокинов, например, IL-4, IL-15, и/или IFN- $\gamma$ ) в газопроницаемых мешках биореактора до 21 суток и более. Варианты этого способа и другие способы получения Т-клеток V $\delta$ 1 подходят в виде части настоящего изобретения. Например, Т-клетки V $\delta$ 1, полученные из крови, можно альтернативно получать при помощи способов, описанных, например, в патенте США № 9499788 и международной патентной публикации № WO2016/198480, содержание которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме, а также WO2017197347, и WO2016081518 (публикация США № 20160175338), содержание которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

*Выделение и размножение резидентных Т-клеток  $\gamma\delta$  негематопоэтической ткани из негематопоэтической ткани*

Т-клетки  $\gamma\delta$  из негематопоэтической ткани, полученные как описано ниже, вероятно, будут подходящими носителями для гетерологичных нацеленных конструкций, описываемых в настоящем документе, поскольку они могут демонстрировать хорошую способность проникать в опухоль и удерживаться в ней. Более подробные способы выделения и размножения Т-клеток  $\gamma\delta$  из негематопоэтической ткани можно найти, например, в заявке Великобритании №17070483 (WO2018/202808) и в международной патентной публикации № WO 2017/072367 (публикация в США. № 20180312808), содержание которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

Т-клетки  $\gamma\delta$  из негематопоэтической ткани (например, Т-клетки  $\gamma\delta$ , полученные из кожи и/или не-V $\delta$ 2 Т-клетки, например, Т-клетки V $\delta$ 1 и/или Т-клетки DN) можно выделять из любой негематопоэтической ткани человека. или не являющегося человеком животного, которую можно удалить у пациента для получения клетки, подходящей для конструирования в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления негематопоэтическая ткань, из которой получены и размножены Т-клетки  $\gamma\delta$ , представляет собой кожу (например, человеческую кожу), которую можно получить известными в данной области способами. В некоторых вариантах осуществления кожа получена при помощи пункционной биопсии. Альтернативно, способы выделения и размножения Т-клеток  $\gamma\delta$ , предлагаемые в настоящем документе, можно применять в отношении желудочно-кишечного тракта (например, толстой кишки), молочной железы, легкого, предстательной железы, печени, селезенки и поджелудочной железы. Т-клетки  $\gamma\delta$  также могут быть резидентами ткани злокачественной опухоли человека, например, опухоли молочной железы или предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки  $\gamma\delta$  могут быть из тканей злокачественной опухоли человека (например, тканей солидной опухоли). В других вариантах осуществления Т-клетки  $\gamma\delta$  может происходить из негематопоэтической ткани, отличной от тканей злокачественной опухоли человека (например, ткань без значительного количества опухолевых клеток).

Например, Т-клетки  $\gamma\delta$  могут происходить из области кожи (например, здоровой кожи), отделенной от близлежащих или прилегающих тканей злокачественной опухоли.

Т-клетки  $\gamma\delta$ , которые преобладают в крови, представляют собой в первую очередь Т-клетки V $\delta$ 2, тогда как Т-клетки  $\gamma\delta$ , которые преобладают в негематопоэтических тканях, представляют собой, прежде всего, Т-клетки V $\delta$ 1, так что Т-клетки V $\delta$ 1 включают примерно 70-80% резидентной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  в негематопоэтической ткани. Однако некоторые Т-клетки V $\delta$ 2 также обнаруживаются в негематопоэтических тканях, например, в кишечнике, где они могут включать приблизительно 10-20% Т-клетки  $\gamma\delta$ . Некоторые Т-клетки  $\gamma\delta$ , которые находятся в негематопоэтических тканях, не экспрессируют ни V $\delta$ 1, ни V $\delta$ 2 TCR, и мы назвали их двойными отрицательными (DN) Т-клетками  $\gamma\delta$ . Эти DN Т-клетки  $\gamma\delta$ , вероятно, будут в основном экспрессировать V $\delta$ 3 с небольшим количеством V $\delta$ 5-экспрессирующих Т-клеток. Таким образом, Т-клетки  $\gamma\delta$ , которые, как правило, находятся в негематопоэтических тканях и которые размножают способом по настоящему изобретению, являются предпочтительно не-V $\delta$ 2 Т-клетками, например, Т-клетками V $\delta$ 1, с включением небольшого количества DN Т-клеток  $\gamma\delta$ .

В некоторых вариантах осуществления критическим этапом является преднамеренное отделение, например, через несколько суток или недель культивирования, резидентных Т-клеток негематопоэтической ткани (например, в смешанной популяции лимфоцитов, которая может включать, например, клетки  $\alpha\beta$ , клетки, В-клетки-естественные киллеры (NK), и  $\gamma\delta$ 2 и не- $\gamma\delta$ 2 Т-клетки) от негематопоэтических клеток ткани (например, стромальных клеток, в частности фибробластов), из которой появляются Т-клетки. Это делает возможным преимущественное и быстрое размножение в течение следующих суток и недель негематопоэтических тканей Т-клеток V $\delta$ 1 и DN Т-клеток  $\gamma\delta$  из негематопоэтической ткани.

В основном, резидентные Т-клетки  $\gamma\delta$  негематопоэтической ткани способны спонтанно размножаться после прекращения физического контакта со стромальными клетками (например, фибробластами кожи). Таким образом, для индукции такого разделения можно использовать способы культивирования на основе каркаса, описанные выше, что приводит к де-репрессии Т-клеток  $\gamma\delta$  для запуска размножения. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления отсутствует существенная активация пути TCR во время стадии размножения (например, культура не содержит экзогенные активаторы пути TCR). Кроме того, это изобретение относится к способам размножения резидентных Т-клеток негематопоэтической ткани  $\gamma\delta$ , где способы не включают контакт с фидерными клетками, опухолевыми клетками и/или антигенпрезентирующими клетками.

Протоколы размножения включают культивирование резидентных Т-клеток  $\gamma\delta$  негематопоэтической ткани в присутствии эффективных коктейлей из биологических факторов для поддержания эффективного размножения Т-клеток  $\gamma\delta$ . В одном из вариантов осуществления способ размножения Т-клеток  $\gamma\delta$  включает предоставление популяции Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученной из негематопоэтической ткани (например, выделенной популяции

Т-клеток  $\gamma\delta$  негематопоэтического происхождения, полученной из ткани (например, выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  из негематопоэтической ткани, например, популяции, выделенной согласно способам, описываемым в настоящем документе), и культивирование Т-клеток  $\gamma\delta$  в присутствии IL-2, IL-4, IL-15, и/или IL-21. Эти цитокины или их аналоги можно культивировать с клетками в течение времени (например, по меньшей мере, 5 суток, по меньшей мере, 6 суток, по меньшей мере, 7 суток, по меньшей мере, 8 суток, по меньшей мере, 9 суток, по меньшей мере, 10 суток, по меньшей мере, 11 суток, по меньшей мере, 12 суток, по меньшей мере, 13 суток, по меньшей мере, 14 суток, по меньшей мере, 21 сутки, по меньшей мере, 28 суток или дольше, например, от 5 суток до 40 суток, от 7 суток до 35 суток, из 14 суток до 28 суток, или приблизительно 21 сутки) и в количестве, эффективном для получения размноженной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$ .

#### *Размноженные популяции Т-клеток $\gamma\delta$*

Размноженная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  больше по количеству, чем выделенная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  до стадии размножения (например, по меньшей мере, в 2 раза по количеству, по меньшей мере, в 3 раза по количеству, по меньшей мере, в 4 раза по количеству, по меньшей мере, в 5 раз по количеству, по меньшей мере, в 6 раз по количеству, по меньшей мере, в 7 раз по количеству, по меньшей мере, в 8 раз по количеству, по меньшей мере, в 9 раз по количеству, по меньшей мере, в 10 раз по количеству, по меньшей мере, в 15 раз по количеству, по меньшей мере, в 20 раз по количеству, по меньшей мере, в 25 раз по количеству, по меньшей мере, в 30 раз по количеству, по меньшей мере, в 35 раз по количеству, по меньшей мере, в 40 раз по количеству, по меньшей мере, в 50 раз по количеству, по меньшей мере, в 60 раз по количеству, по меньшей мере, в 70 раз по количеству, по меньшей мере, в 80 раз по количеству, по меньшей мере, в 90 раз по количеству, по меньшей мере, в 100 раз по количеству, по меньшей мере, в 200 раз по количеству, по меньшей мере, в 300 раз по количеству, по меньшей мере, в 400 раз по количеству, по меньшей мере, в 500 раз по количеству, по меньшей мере, в 600 раз по количеству, по меньшей мере, в 700 раз по количеству, по меньшей мере, в 800 раз по количеству, по меньшей мере, в 900 раз по количеству, по меньшей мере, в 1000 раз по количеству, по меньшей мере, в 5000 раз по количеству, по меньшей мере, в 10000 раз по количеству или больше по сравнению с выделенной популяцией Т-клеток  $\gamma\delta$  до стадии размножения). Таким образом, большие популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из кожи и/или не-V $\delta$ 2 Т-клеток, например, Т-клеток V $\delta$ 1 и/или DN Т-клеток) могут увеличиваться с высокой скоростью. В некоторых вариантах осуществления на стадии размножения, описываемой в настоящем документе, Т-клетки  $\gamma\delta$  размножаются при низком времени удвоения популяции, которое определяется следующим уравнением:

$$\text{Время удвоения} = \frac{\text{длительность} \times \log(2)}{\log(\text{конечная концентрация}) - \log(\text{начальная концентрация})}$$

С учетом информации, представленной в настоящем документе, специалисту в

данной области понятно, что изобретение относится к способам размножения Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$  или Т-клеток  $\gamma\delta$ , которые размножают и/или выбирают для конструирования, чтобы экспрессировать гетерологичную нацеленную конструкцию) при времени удвоения популяции менее чем 5 суток (например, менее чем 4,5 суток, менее чем 4,0 суток, менее чем 3,9 суток, менее чем 3,8 суток, менее чем 3,7 суток, менее чем 3,6 суток, менее чем 3,5 суток, менее чем 3,4 суток, менее чем 3,3 суток, менее чем 3,2 суток, менее чем 3,1 суток, менее чем 3,0 суток, менее чем 2,9 суток, менее чем 2,8 суток, менее чем 2,7 суток, менее чем 2,6 суток, менее чем 2,5 суток, менее чем 2,4 суток, менее чем 2,3 суток, менее чем 2,2 суток, менее чем 2,1 суток, менее чем 2,0 суток, менее чем 46 часов, менее чем 42 часа, менее чем 38 часов, менее чем 35 часов, менее чем 32 часа).

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки  $\gamma\delta$  (например, сконструированные Т-клетки  $\gamma\delta$  или Т-клетки  $\gamma\delta$ , которые размножают и/или выбирают для конструирования, чтобы экспрессировать гетерологичную нацеленную конструкцию), выделенные и размноженные способами, предлагаемыми в настоящем документе, могут иметь фенотип, хорошо подходящий для противоопухолевого действия. В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  имеет более высокую среднюю экспрессию CD27, чем контрольная популяция (например, выделенная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  до стадии размножения). В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  имеет среднюю экспрессию CD27, которая, по меньшей мере, в 2 раза выше по сравнению с выделенной популяцией Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, по меньшей мере, в 3 раза, по меньшей мере, в 4 раза, по меньшей мере, в 5 раз, по меньшей мере, в 6 раз, по меньшей мере, в 7 раз, по меньшей мере, в 8 раз, по меньшей мере, в 9 раз, по меньшей мере, в 10 раз, по меньшей мере, в 15 раз, по меньшей мере, в 20 раз, по меньшей мере, в 25 раз, по меньшей мере, в 30 раз, по меньшей мере, в 40 раз, по меньшей мере, в 50 раз, по меньшей мере, в 60 раз, по меньшей мере, в 70 раз, по меньшей мере, в 80 раз, по меньшей мере, в 90 раз, по меньшей мере, в 100 раз, по меньшей мере, в 150 раз, по меньшей мере, в 200 раз, по меньшей мере, в 300 раз, по меньшей мере, в 400 раз, по меньшей мере, в 500 раз, по меньшей мере, в 600 раз, по меньшей мере, в 700 раз, по меньшей мере, в 800 раз, по меньшей мере, в 900 раз, по меньшей мере, в 1000 раз, по меньшей мере, в 5000 раз, по меньшей мере, в 10000 раз, по меньшей мере, в 20000 или более раз относительно выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$ ).

Определенная часть размноженной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$  или Т-клеток  $\gamma\delta$ , которые размножают и/или выбирают для конструирования, чтобы экспрессировать гетерологичную нацеленную конструкцию) может активировать CD27, тогда как другая часть представляет собой CD27<sup>low</sup> или CD27<sup>-</sup>. В этом случае частота CD27<sup>+</sup> клеток в размноженной популяции по сравнению с выделенной популяцией Т-клеток  $\gamma\delta$  может быть больше. Например, размноженная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  может иметь, по меньшей мере, на 5% большую частоту CD27<sup>+</sup> клеток по сравнению с частотой в выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения

(например, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 90% или до 100% большую частоту CD27<sup>+</sup> клеток по сравнению с частотой выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения). В некоторых вариантах осуществления количество CD27<sup>+</sup> клеток в размноженной популяции по сравнению с выделенной популяцией Т-клеток  $\gamma\delta$  может быть увеличено. Например, размноженная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  может иметь, по меньшей мере, 2-кратное количество CD27<sup>+</sup> клеток по сравнению с выделенной популяцией Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения (например, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 90% или до 100% большую частоту CD27<sup>+</sup> клеток по сравнению с частотой выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения).

Способы размножения, как предлагается в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления дают размноженную популяцию Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, сконструированные Т-клетки  $\gamma\delta$  или Т-клетки  $\gamma\delta$ , которые размножают и/или выбирают для конструирования, чтобы экспрессировать гетерологичную нацеленную конструкцию), имеющую низкую экспрессию TIGIT по сравнению с референсной популяцией (например, выделенной популяцией Т-клеток  $\gamma\delta$  до стадии размножения). В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  имеет более низкую среднюю экспрессию TIGIT, чем референсная популяция (например, выделенная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  до стадии размножения). В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  имеет среднюю экспрессию TIGIT, которая, по меньшей мере, на 10% меньше, чем у выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, по меньшей мере, на 20% меньше, по меньшей мере, на 30% меньше, по меньшей мере, на 40% меньше, по меньшей мере, на 50% меньше, по меньшей мере, на 60% меньше, по меньшей мере, на 70% меньше, по меньшей мере, на 80% меньше, по меньшей мере, на 90% меньше или до 100% меньше чем у выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$ ).

Определенная часть размноженной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, сконструированные Т-клетки  $\gamma\delta$  или Т-клетки  $\gamma\delta$ , которые размножают и/или выбирают для конструирования, чтобы экспрессировать гетерологичную нацеленную конструкцию) может экспрессировать TIGIT, например, высокие уровни TIGIT, а другая часть является TIGIT<sup>low</sup> или TIGIT<sup>-</sup>. В этом случае частота TIGIT<sup>+</sup> клеток может быть ниже в размноженной популяции по сравнению с выделенной популяцией Т-клеток  $\gamma\delta$ . Например, размноженная популяция Т-клетки  $\gamma\delta$  может иметь, по меньшей мере, на 5% меньшую частоту TIGIT<sup>+</sup> клеток по сравнению с частотой в выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения (например, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на

15%, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 90% или до 100% более низкую частоту TIGIT<sup>+</sup> клеток по сравнению с частотой в выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения). В некоторых вариантах осуществления количество TIGIT<sup>+</sup> клеток может быть ниже в размноженной популяции относительно выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения. Например, размноженная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  может иметь, по меньшей мере, на 10% меньше TIGIT<sup>+</sup> клеток по сравнению с количеством TIGIT<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения (например, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 90% или до 100% меньше TIGIT<sup>+</sup> клеток относительно количества TIGIT<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения).

В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, сконструированные Т-клетки  $\gamma\delta$  или Т-клетки  $\gamma\delta$ , которые размножают и/или выбирают для конструирования, чтобы экспрессировать гетерологичную нацеленную конструкцию) имеет высокое количество или частоту CD27<sup>+</sup> клеток и низкую частоту TIGIT<sup>+</sup> клеток. В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  имеет высокую частоту CD27<sup>+</sup> TIGIT<sup>-</sup> клеток по сравнению с референсной популяцией (например, относительно выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения). Например, размноженная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  может иметь, по меньшей мере, на 5% большую частоту CD27<sup>+</sup> TIGIT<sup>-</sup> клеток по сравнению с таковой у выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения (например, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 90% или до 100% большую частоту CD27<sup>+</sup> TIGIT<sup>-</sup> клеток по сравнению с частотой в выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения). В некоторых вариантах осуществления количество CD27<sup>+</sup> TIGIT<sup>-</sup> клеток в размноженной популяции по сравнению с выделенной популяцией Т-клеток  $\gamma\delta$  может быть увеличено. Например, размноженная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  может иметь по меньшей мере двукратное количество CD27<sup>+</sup> TIGIT<sup>-</sup> клеток по сравнению с выделенной популяцией Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения (например, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 90% или до 100% большую частоту CD27<sup>+</sup> TIGIT<sup>-</sup> клеток по сравнению с частотой в

выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения).

В некоторых случаях средняя экспрессия TIGIT в популяции CD27<sup>+</sup> Т-клеток  $\gamma\delta$  в размноженной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$  или Т-клеток  $\gamma\delta$ , которые размножают и/или выбирают для конструирования, чтобы экспрессировать гетерологичную нацеленную конструкцию) низка по сравнению с референсной популяцией. В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция CD27<sup>+</sup> Т-клеток  $\gamma\delta$  имеет более низкую среднюю экспрессию TIGIT, чем референсная популяция (например, выделенная популяция CD27<sup>+</sup> Т-клеток  $\gamma\delta$  до стадии размножения). В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция CD27<sup>+</sup> Т-клеток  $\gamma\delta$  имеет среднюю экспрессию TIGIT, которая, по меньшей мере, на 10% меньше, чем в разделенной популяции CD27<sup>+</sup> Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, по меньшей мере, на 20% меньше, по меньшей мере, на 30% меньше, по меньшей мере, на 40% меньше, по меньшей мере, на 50% меньше, по меньшей мере, на 60% меньше, по меньшей мере, на 70% меньше, по меньшей мере, на 80% меньше, по меньшей мере, на 90% меньше или до 100% меньше чем у выделенной популяции CD27<sup>+</sup> Т-клеток  $\gamma\delta$ ).

Дополнительно или альтернативно, средняя экспрессия CD27 в популяциях TIGIT<sup>-</sup> Т-клеток  $\gamma\delta$  в размноженных популяциях Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$  или Т-клеток  $\gamma\delta$ , которые размножают и/или выбирают для конструирования, чтобы экспрессировать гетерологичную нацеленную конструкцию) является высокой по сравнению с референсной популяцией. Например, размноженная популяция TIGIT<sup>-</sup> Т-клеток  $\gamma\delta$  может иметь, по меньшей мере, на 5% большую частоту CD27<sup>+</sup> клеток по сравнению с таковой у выделенной популяции TIGIT<sup>-</sup> Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения (например, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 90% или до 100% большую частоту CD27<sup>+</sup> клеток по сравнению с частотой в выделенной популяции TIGIT<sup>-</sup> Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения). В некоторых вариантах осуществления количество CD27<sup>+</sup> клеток в размноженной популяции по сравнению с выделенной популяцией TIGIT<sup>-</sup> Т-клеток  $\gamma\delta$  может быть увеличено. Например, размноженная популяция TIGIT<sup>-</sup> Т-клеток  $\gamma\delta$  может иметь, по меньшей мере, в 2 раза больше клеток CD27<sup>+</sup> по сравнению с выделенной популяцией TIGIT<sup>-</sup> Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения (например, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 90% или до 100% большую частоту CD27<sup>+</sup> клеток по сравнению с частотой в выделенной популяции TIGIT<sup>-</sup> Т-клеток  $\gamma\delta$  до размножения).

Увеличение или уменьшение экспрессии других маркеров можно использовать дополнительно или альтернативно для характеристики одной или нескольких

размноженных популяций Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$  или Т-клеток  $\gamma\delta$ , которые размножают и/или выбирают для конструирования, чтобы экспрессировать гетерологичную нацеленную конструкцию), включая CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas Лиганд, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30, CD2, NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 и CD64. В некоторых случаях размноженная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  имеет большую, равную или более низкую среднюю экспрессию одного или нескольких маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, лиганда Fas, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30 и CD2, относительно выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$ , например, до размножения. Дополнительно или альтернативно, размноженная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  может иметь большую, равную или более низкую частоту клеток, экспрессирующих один или несколько маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, лиганда Fas, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30 и CD2 относительно выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$ . В некоторых вариантах осуществления размноженная популяция Т-клеток  $\gamma\delta$  имеет большую, равную или более низкую среднюю экспрессию одного или нескольких маркеров, выбранных из группы, состоящей из NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 и CD64 относительно выделенной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$ . Аналогично, размноженная популяция может иметь большую, равную или более низкую частоту клеток, экспрессирующих один или несколько маркеров, выбранных из группы, состоящей из NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1, и CD64, относительно выделенной референсной популяции Т-клеток  $\gamma\delta$ .

Доступны многочисленные базовые среды для культивирования, подходящие для использования для пролиферации Т-клеток  $\gamma\delta$ , в частности, полные среды, такие как AIM-V, среда Iscoves и RPMI-1640 (Life Technologies). В среду можно добавлять другие факторы среды, такие как сыворотка, сывороточные белки и селективные агенты, такие как антибиотики. Например, в некоторых вариантах осуществления среда RPMI-1640, содержащая 2 мМ глутамина, 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; 1× MEM заменимые аминокислоты Life Technologies), и 10 мкл/л  $\beta$ -меркаптоэтанола. Обычно клетки культивируют при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, в подходящей среде для культивирования.

Т-клетки  $\gamma\delta$  можно культивировать, как описано в настоящем документе, в любой подходящей системе, включая ферментеры с мешалкой, ферментеры с воздушным подъемом, роллерные бутылки, культуральные пакеты или чашки и другие биореакторы, такие как биореакторы с полым волокном. Использование таких систем хорошо известно в данной области. Общие способы и техники культивирования лимфоцитов хорошо известны в данной области.

Способы, описываемые в настоящем документе, могут включать более одного этапа селекции, например, более одного этапа истощения. Обогащение Т-клеточной популяции путем отрицательного отбора может быть достигнуто, например, с помощью комбинации антител, направленной на поверхностные маркеры, уникальные для негативно селектируемых клеток. Одним из способов является сортировка клеток и/или отбор посредством отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, которая использует коктейль моноклональных антител, направленных на поверхностные клеточные маркеры, присутствующие на негативно селектируемых клетках.

#### **V. Фармацевтические композиции и способы лечения**

Сконструированные лимфоциты (например, Т-клетки  $\gamma\delta$ , НК-клетки, НК-подобные Т-клетки, лимфоидные клетки врожденного иммунитета или МАИТ-клетки), описываемые в настоящем документе (например, сконструированные клетки (например, Т-клетки  $\gamma\delta$ ), имеющие гетерологичную нацеленную конструкцию) можно применять в качестве лекарственного средства, например, в качестве адоптивной Т-клеточной терапии. Такое применение включает перенос лимфоцитов (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ ), полученных способом по изобретению, пациенту. Терапия может быть аутологичной, то есть лимфоциты (например, Т-клетки  $\gamma\delta$ ) могут быть переданы обратно тому же пациенту, от которого их получили, или терапия может быть аллогенной, то есть лимфоциты (например, Т-клетки  $\gamma\delta$ ) от одного человека могут быть переданы другому пациенту. В случаях, связанных с аллогенным переносом, лимфоциты (например, Т-клетки  $\gamma\delta$ ) могут по существу быть свободными от Т-клеток  $\alpha\beta$ . Например, популяцию лимфоцитов (например, Т-клетки  $\gamma\delta$ ) можно истощать по Т-клеткам  $\alpha\beta$ , например, после размножения с использованием любых подходящих способов, известных в данной области (например, путем негативной селекции, например, с использованием магнитных шариков).

В некоторых вариантах осуществления, в которых Т-клетки  $\gamma\delta$  сконструированы для экспрессии гетерологичной нацеленной конструкции, Т-клетки  $\gamma\delta$  представляют собой клетки V $\delta$ 1, клетки V $\delta$ 2, клетки V $\delta$ 3, клетки V $\delta$ 5 или клетки V $\delta$ 8. Способ лечения может включать предоставление образца эндогенной Т-клетки  $\gamma\delta$  от пациента, культивирование Т-клетки  $\gamma\delta$  из образца в векторе, несущем полинуклеотид, кодирующий гетерологичную нацеленную конструкцию, для создания популяций сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$ , экспрессирующих гетерологичную нацеленную конструкцию (например, размноженной популяции сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$ , экспрессирующих гетерологичную нацеленную конструкцию), и введение популяции Т-клеток  $\gamma\delta$  пациенту-реципиенту. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий гетерологичную нацеленную конструкцию, доставляется к эндогенным Т-клеткам  $\gamma\delta$  посредством электропорации или любого другого подходящего способа трансфекции, известного в данной области или описываемого в настоящем документе.

Пациент или индивидуум, подлежащий лечению, может быть пациентом со злокачественной опухолью (например, пациентом с злокачественной опухолью, проходящим лечение от солидной опухоли) или пациентом, инфицированным вирусом

(например, пациентом, инфицированным CMV, или ВИЧ-инфицированным пациентом). В некоторых случаях пациент лечился или лечится от солидной опухоли.

Поскольку Т-клетки  $\gamma\delta$  не рестриктированы по МНС, они не распознают хозяина, в которого они переносятся, как чужеродного, что означает, что они с меньшей вероятностью вызовут реакцию «трансплантат против хозяина». Это означает, что их можно использовать «в готовом виде» и передать любому получателю, например, для аллогенной adoptивной Т-клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки  $\gamma\delta$  по изобретению экспрессируют NKG2D и отвечают на лиганд NKG2D (например, MICA), который сильно ассоциирован с злокачественным новообразованием. Они также проявляют цитотоксический профиль в отсутствие какой-либо активации и таким образом могут быть эффективны в уничтожении опухолевых клеток. Например, сконструированные Т-клетки  $\gamma\delta$ , полученные как описано в настоящем документе, могут экспрессировать несколько, предпочтительно все из IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, CCL4, IL-13, гранулизына, гранзима А и В и перфорина в отсутствие какой-либо активации. IL-17A может не экспрессироваться.

Фармацевтические композиции могут включать сконструированные лимфоциты (например, Т-клетки  $\gamma\delta$ ), описанные в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами. Такие композиции могут включать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как ЭДТА или глутатион; адьюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Криоконсервация растворов, которые можно использовать в фармацевтических композициях по изобретению, включает, например, DMSO. Композиции можно формулировать, например, для внутривенного введения.

В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция по существу свободна, например, нет определяемых уровней загрязнителя, например, от эндотоксина или микоплазмы.

В некоторых случаях, терапевтически эффективное количество сконструированных лимфоцитов (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ , НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток), полученных любым из вышеописанных способов, можно вводить индивидууму в терапевтически эффективном количестве (например, для лечения злокачественной опухоли, например, для лечения солидной опухоли). В некоторых случаях, терапевтически эффективное количество сконструированных лимфоцитов (например, Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$ , Т-клеток, полученных из крови, например, Т-клеток V $\delta$ 1, Т-клеток V $\delta$ 2, и/или DN Т-клеток), НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток) составляет менее чем  $10 \times 10^{12}$  клеток на дозу (например, менее чем  $9 \times 10^{12}$  клеток на дозу, менее чем  $8 \times 10^{12}$  клеток на дозу, менее чем  $7 \times 10^{12}$

клеток на дозу, менее чем  $6 \times 10^{12}$  клеток на дозу, менее чем  $5 \times 10^{12}$  клеток на дозу, менее чем  $4 \times 10^{12}$  клеток на дозу, менее чем  $3 \times 10^{12}$  клеток на дозу, менее чем  $2 \times 10^{12}$  клеток на дозу, менее чем  $1 \times 10^{12}$  клеток на дозу, менее чем  $9 \times 10^{11}$  клеток на дозу, менее чем  $8 \times 10^{11}$  клеток на дозу, менее чем  $7 \times 10^{11}$  клеток на дозу, менее чем  $6 \times 10^{11}$  клеток на дозу, менее чем  $5 \times 10^{11}$  клеток на дозу, менее чем  $4 \times 10^{11}$  клеток на дозу, менее чем  $3 \times 10^{11}$  клеток на дозу, менее чем  $2 \times 10^{11}$  клеток на дозу, менее чем  $1 \times 10^{11}$  клеток на дозу, менее чем  $9 \times 10^{10}$  клеток на дозу, менее чем  $7,5 \times 10^{10}$  клеток на дозу, менее чем  $5 \times 10^{10}$  клеток на дозу, менее чем  $2,5 \times 10^{10}$  клеток на дозу, менее чем  $1 \times 10^{10}$  клеток на дозу, менее чем  $7,5 \times 10^9$  клеток на дозу, менее чем  $5 \times 10^9$  клеток на дозу, менее чем  $2,5 \times 10^9$  клеток на дозу, менее чем  $1 \times 10^9$  клеток на дозу, менее чем  $7,5 \times 10^8$  клеток на дозу, менее чем  $5 \times 10^8$  клеток на дозу, менее чем  $2,5 \times 10^8$  клеток на дозу, менее чем  $1 \times 10^8$  клеток на дозу, менее чем  $7,5 \times 10^7$  клеток на дозу, менее чем  $5 \times 10^7$  клеток на дозу, менее чем  $2,5 \times 10^7$  клеток на дозу, менее чем  $1 \times 10^7$  клеток на дозу, менее чем  $7,5 \times 10^6$  клеток на дозу, менее чем  $5 \times 10^6$  клеток на дозу, менее чем  $2,5 \times 10^6$  клеток на дозу, менее чем  $1 \times 10^6$  клеток на дозу, менее чем  $7,5 \times 10^5$  клеток на дозу, менее чем  $5 \times 10^5$  клеток на дозу, менее чем  $2,5 \times 10^5$  клеток на дозу, или менее чем  $1 \times 10^5$  клеток на дозу).

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество сконструированных лимфоцитов (например, Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из кожи, сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из крови, например, Т-клеток V $\delta$ 1 и/или DN Т-клеток), НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток) составляет менее чем  $10 \times 10^{12}$  клеток в течение курса лечения (например, менее чем  $9 \times 10^{12}$  клеток, менее чем  $8 \times 10^{12}$  клеток, менее чем  $7 \times 10^{12}$  клеток, менее чем  $6 \times 10^{12}$  клеток, менее чем  $5 \times 10^{12}$  клеток, менее чем  $4 \times 10^{12}$  клеток, менее чем  $3 \times 10^{12}$  клеток, менее чем  $2 \times 10^{12}$  клеток, менее чем  $1 \times 10^{12}$  клеток, менее чем  $9 \times 10^{11}$  клеток, менее чем  $8 \times 10^{11}$  клеток, менее чем  $7 \times 10^{11}$  клеток, менее чем  $6 \times 10^{11}$  клеток, менее чем  $5 \times 10^{11}$  клеток, менее чем  $4 \times 10^{11}$  клеток, менее чем  $3 \times 10^{11}$  клеток, менее чем  $2 \times 10^{11}$  клеток, менее чем  $1 \times 10^{11}$  клеток, менее чем  $9 \times 10^{10}$  клеток, менее чем  $7,5 \times 10^{10}$  клеток, менее чем  $5 \times 10^{10}$  клеток, менее чем  $2,5 \times 10^{10}$  клеток, менее чем  $1 \times 10^{10}$  клеток, менее чем  $7,5 \times 10^9$  клеток, менее чем  $5 \times 10^9$  клеток, менее чем  $2,5 \times 10^9$  клеток, менее чем  $1 \times 10^9$  клеток, менее чем  $7,5 \times 10^8$  клеток, менее чем  $5 \times 10^8$  клеток, менее чем  $2,5 \times 10^8$  клеток, менее чем  $1 \times 10^8$  клеток, менее чем  $7,5 \times 10^7$  клеток, менее чем  $5 \times 10^7$  клеток, менее чем  $2,5 \times 10^7$  клеток, менее чем  $1 \times 10^7$  клеток, менее чем  $7,5 \times 10^6$  клеток, менее чем  $5 \times 10^6$  клеток, менее чем  $2,5 \times 10^6$  клеток, менее чем  $1 \times 10^6$  клеток, менее чем  $7,5 \times 10^5$  клеток, менее чем  $5 \times 10^5$  клеток, менее чем  $2,5 \times 10^5$  клеток, или менее чем  $1 \times 10^5$  клеток в течение курса лечения).

В некоторых вариантах осуществления доза сконструированных лимфоцитов (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ , НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток), описанных в настоящем документе, включает приблизительно  $1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3,6 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ , или  $5 \times 10^8$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза

сконструированных лимфоцитов (например, Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из кожи, Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из крови, например, Т-клеток V $\delta$ 1 и/или DN Т-клеток), NK-клеток, NK-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток) включает, по меньшей мере, приблизительно  $1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3,6 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ , или  $5 \times 10^8$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза сконструированных лимфоцитов (например, Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из кожи, Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из крови, например, Т-клеток V $\delta$ 1 и/или DN Т-клеток), NK-клеток, NK-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток) включает вплоть до приблизительно  $1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3,6 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ , или  $5 \times 10^8$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза сконструированных лимфоцитов (например, Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из кожи, Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из крови, например, Т-клеток V $\delta$ 1 и/или DN Т-клеток), NK-клеток, NK-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток) включает приблизительно  $1,1 \times 10^6$ - $1,8 \times 10^7$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза сконструированных лимфоцитов (например, Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из кожи, Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из крови, например, Т-клеток V $\delta$ 1 и/или DN Т-клеток), NK-клеток, NK-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток) включает приблизительно  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ , или  $5 \times 10^9$  клеток. В некоторых вариантах осуществления доза сконструированных лимфоцитов (например, Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из кожи, Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из крови, например, Т-клеток V $\delta$ 1 и/или DN Т-клеток), NK-клеток, NK-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток) включает, по меньшей мере, приблизительно  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ , или  $5 \times 10^9$  клеток. В некоторых вариантах осуществления доза сконструированных лимфоцитов (например, Т-клеток  $\gamma\delta$  (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из кожи, Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из крови, например, Т-клеток V $\delta$ 1 и/или DN Т-клеток), NK-клеток, NK-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток) включает вплоть до приблизительно  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ , или  $5 \times 10^9$  клеток.

В одном из вариантов осуществления индивидууму вводят от  $10^4$  до  $10^6$  сконструированных лимфоцитов (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из кожи, Т-клеток  $\gamma\delta$ , полученных из крови, например, Т-клеток V $\delta$ 1 и/или DN Т-клеток), NK-клеток, NK-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток) на кг массы тела индивидуума. В одном из вариантов осуществления индивидууму исходно вводят популяцию сконструированных лимфоцитов (например, Т-клетки  $\gamma\delta$ , NK-клетки, NK-подобные Т-клетки, лимфоидные клетки врожденного иммунитета, или МАИТ-клетки (например, начальное введение от  $10^4$  до  $10^6$  Т-клеток  $\gamma\delta$ , NK-клеток, NK-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток на кг массы тела

индивидуума, например, от  $10^4$  до  $10^5$  Т-клеток  $\gamma\delta$ , НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток на кг массы тела индивидуума)), и один или несколько раз (например, 2, 3, 4, или 5) последовательно вводят сконструированные лимфоциты (например, Т-клетки  $\gamma\delta$ , НК-клетки, НК-подобные Т-клетки, лимфоидные клетки врожденного иммунитета, или МАИТ-клетки (например, одно или несколько последовательных введений от  $10^4$  до  $10^6$  сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$ , НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток на кг массы тела индивидуума, например, от  $10^4$  до  $10^5$  сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$  на массы тела индивидуума)). В одном из вариантов осуществления одно или несколько последовательных введений вводят менее чем через 15 суток, например, через 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, или через 2 суток после предыдущего введения, например, менее чем через 4, 3, или через 2 суток после предыдущего введения. В одном из вариантов осуществления индивидуум получает всего приблизительно  $10^6$  Т-клеток  $\gamma\delta$ , НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток на кг массы тела индивидуума, например, от  $10^4$  до  $10^5$  сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$  на массы тела индивидуума в течение курса, по меньшей мере, из трех введений популяции Т-клеток  $\gamma\delta$ , НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток, например, от  $10^4$  до  $10^5$  сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$  на кг массы тела индивидуума, например, индивидуум получает начальную дозу  $1 \times 10^5$  Т-клеток  $\gamma\delta$ , НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток, второе введение  $3 \times 10^5$  Т-клеток  $\gamma\delta$ , НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток, и третье введение  $6 \times 10^5$  Т-клеток  $\gamma\delta$ , НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток, и, например, каждое введение вводят менее чем через 4, 3, или через 2 суток после предыдущего введения.

В некоторых вариантах осуществления индивидууму можно вводить одно или несколько дополнительных терапевтических средств. Дополнительное терапевтическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из иммунотерапевтического средства, цитотоксического средства, средства, ингибирующего рост, лучевой терапии, ангиогенного средства или комбинации из двух или более агентов. Дополнительное терапевтическое средство можно вводить одновременно, до или после введения сконструированных лимфоцитов (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ , НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, или МАИТ-клеток). Дополнительное терапевтическое средство может представлять собой иммунотерапевтическое средство, которое может воздействовать на мишень в теле субъекта (например, собственная иммунная система субъекта) и/или на перенесенные Т-клетки  $\gamma\delta$ , НК-клетки, НК-подобные Т-клетки, лимфоидные клетки врожденного иммунитета, или МАИТ-клетки.

Введение композиции можно проводить любым удобным способом. Композицию,

описываемую в настоящем документе, можно ввести пациенту трансартериально, подкожно, интрадермально, внутрь опухоли, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной инъекции или интраперитонеально, например, путем интрадермальной инъекции или подкожной инъекции. Композиции сконструированных лимфоцитов (например, Т-клеток  $\gamma\delta$ , НК-клеток, НК-подобных Т-клеток, лимфоидных клеток врожденного иммунитета или МАИТ-клеток) можно вводить непосредственно в опухоль, лимфоузел или место инфекции.

### **ПРИМЕРЫ**

Следующие примеры предлагают неограничивающие способы конструирования Т-клеток  $\gamma\delta$  для экспрессии гетерологичной нацеленной конструкции, функционального скрининга сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$  и терапевтические способы применения сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$ .

#### **Пример 1: Функциональная характеристика сконструированной Т-клетки $\gamma\delta$ , экспрессирующей гетерологичную нацеленную конструкцию**

Сконструированные Т-клетки V $\delta$ 1 с гетерологичным нацеленным рецептором, были функционально охарактеризованы *in vitro* путем совместного культивирования с клетками-мишенями (например, злокачественными клетками, например, клетками линии опухолевых клеток). Сконструированные Т-клетки V $\delta$ 1 сравнивали с тремя типами контрольных клеток: (1) нетрансдуцированные Т-клетки V $\delta$ 1; (2) ложно трансдуцированные Т-клетки V $\delta$ 1, экспрессирующие гетерологичный GFP; и (3) Т-клетки V $\delta$ 1, трансдуцированные обычным химерным антигенным рецептором и имеющие функциональный внутриклеточный сигнальный домен. Каждую группу совместно культивируют, по меньшей мере, с двумя группами опухолевых клеток-мишеней: (А) группой здоровых клеток, экспрессирующих номинальные уровни антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА), и (В) группой опухолевых клеток, экспрессирующих высокие уровни ТАА. Тестируют различные соотношения эффектор-мишень (соотношения Т-клетки  $\gamma\delta$  к клетке-мишени). Нетрансдуцированные или ложно трансдуцированные V $\delta$ 1 используют в качестве контроля для определения эффекта, обеспечиваемого гетерологичным нацеленным рецептором, а Т-клетки с CAR используют в качестве контроля для выявления эффекта отсутствия функционального внутриклеточного домена, настроенного для распространения стимула сигнала 1 и/или сигнала 2. Проводят следующие анализы:

1. Анализ пролиферации проводят в соответствии со стандартным протоколом разбавления CFSE для количественной оценки эффекта взаимодействия сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$  и клеток-мишеней на пролиферацию сконструированных Т-клеток  $\gamma\delta$ , что свидетельствует об активации против клетки-мишени. Т-клетки  $\gamma\delta$ , экспрессирующие гетерологичную нацеленную конструкцию, пролиферируют в большей степени в ответ на злокачественные клетки по сравнению со здоровыми клетками.

2. Анализ дегрануляции CD107 проводят путем количественной оценки экспрессии связанного с лизосомами мембранного белка 1 (LAMP-1; т.е. CD107), который временно

экспрессируется на поверхности Т-клеток  $\gamma\delta$  при дегрануляции. Клетки окрашивают в различные моменты времени для наблюдения за кинетикой дегрануляции. Т-клетки  $\gamma\delta$ , экспрессирующие гетерологичную нацеленную конструкцию, преимущественно демонстрируют дегрануляцию в ответ на злокачественные клетки по сравнению со здоровыми клетками.

3. Анализ перфорина/гранзима проводят путем окрашивания на перфорин и гранзим с помощью FACS. Т-клетки  $\gamma\delta$ , экспрессирующие гетерологичную нацеленную конструкцию, предпочтительно экспрессируют перфорин и/или гранзим в ответ на злокачественные клетки по сравнению со здоровыми клетками.

4. Анализ клеточного лизиса позволяет количественно оценить степень лизиса клетки-мишени (т.е. цитолиза). Кинетику клеточного лизиса измеряют при помощи системы Incucyte или люциферазного анализа как процент лизиса с течением времени, а лизис клеток в конечной точке измеряют с использованием люциферазного анализа как процент лизиса в данный момент времени. Т-клетки  $\gamma\delta$ , экспрессирующие гетерологичную нацеленную конструкцию, предпочтительно лизируют злокачественные клетки по сравнению со здоровыми клетками.

5. За формированием иммунологического синапса следят с помощью визуализации живых клеток. Наблюдая за иммунологическим синапсом между Т-клетками  $\gamma\delta$  и клетками-мишенями, отслеживают кинетику связывания. Дополнительно, наблюдают поток кальция в Т-клетки  $\gamma\delta$  (указывает на узнавание) и покраснение PI в клетках-мишенях (выявляет смертельный удар). У клеток-мишеней также наблюдают округление. Кинетика связывания и поток кальция предпочтительно усиливаются в Т-клетках  $\gamma\delta$ , экспрессирующих гетерологичную нацеленную конструкцию, при совместном культивировании с злокачественными клетками по сравнению со здоровыми клетками

**Пример 2: Сконструированная Т-клетка  $\gamma\delta$ , полученная из периферической крови и экспрессирующая гетерологичную нацеленную конструкцию**

Одно из уникальных свойств Т-клеток  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1 по сравнению с обычными Т-клетками  $\alpha\beta$  состоит в том, что они избирательно убивают злокачественные трансформированные клетки, сохраняя при этом здоровую ткань, процесс, который может быть опосредован действием естественных цитотоксических рецепторов. Настоящие результаты демонстрируют, что способность клеток V $\delta$ 1 уничтожать опухолевые клетки может быть дополнительно усилена с использованием гетерологичных нацеленных конструкций, лишенных внутриклеточных сигнальных доменов. Конструирование клеток V $\delta$ 1 с такими конструкциями сохраняло или даже увеличивало цитотоксичность этих клеток по отношению к злокачественно трансформированным клеткам, в то же время сохраняя здоровые клетки. Этот подход преодолевает наблюдаемые нацеленные внеопухолевые эффекты подходов иммунотерапии с обычными химерными антигенными рецепторами (CAR), такие как истощение В-клеток после лечения CAR, направленного на CD19.

Материалы и способы

### *Выделение и размножение T-клеток $\gamma\delta$ из периферической крови*

Клетки V $\delta$ 1 из крови выделяли из периферической крови здоровых доноров, как описано ранее в U.S. 2018/0169147, таким образом, включенного в качестве ссылки в полном объеме, в частности относительно выделения клеток V $\delta$ 1 из крови. Кратко, истощенные MACS T-клетки  $\alpha\beta$  ресуспендировали в бессывороточной среде для культивирования (CTS OpTmizer) с добавлением аутологичной плазмы и размножали в присутствии IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-21, IL-1 $\beta$ , IL-15 и растворимого ОКТ3. Клетки трансдуцировали с помощью лентивирусного вектора, кодирующего конструкции, описанные ниже. По сути, конструкции полноразмерного CAR включали связывающую область scFv, нацеленную на опухолевый антиген CD19 или GD2, трансмембранный домен, и внутриклеточный сигнальный домен (согласно общепринятому дизайну конструкции CAR). У несигнальной конструкции или «nsCAR» отсутствовал внутриклеточный домен.

Другие способы получения клеток V $\delta$ 1 из крови хорошо известны в данной области, такие как US 9499788, WO2017197347, WO2016081518. Альтернативно, клетки V $\delta$ 1 выделяют из биоптатов кожи человека, как описано в US 2018/0312808, таким образом, включенного в качестве ссылок в полном объеме и конкретно для способов выделения клеток V $\delta$ 1 из ткани. Клетки V $\delta$ 1, полученные из кожи, трансдуцируют, как описано выше.

### *Анализ проточной цитометрии*

Имунофенотипирование проводили с использованием проточного цитометра BD FACS Lyric. Клетки анализировали на экспрессию поверхностных маркеров с использованием PerCP-Vio700 анти-TCR  $\alpha/\beta$  (Miltenyi), APC анти-TCR  $g/d$  (Miltenyi), VioBlue анти-TCR V $\delta$ 1 (Miltenyi), PE анти-NKp30 (BioLegend), APC анти-NKp44 (BioLegend), PerCP-Cy5.5 против NKG2D (BioLegend). Экспрессию обычного CAR к CD19 и несигнальной конструкции CAR к CD19 выявляли с помощью FITC антитела к метке STREP (LSBio). Экспрессию несигнального GD2-CAR наблюдали с помощью PE-антитела к FC (BioLegend).

### *Анализ цитотоксичности*

Nalm-6 (ATCC, CRL-1567) и первичные В-клетки метили CTV или CFSE и объединяли с Т-клетками в соотношении эффектор-мишень 1:1. Культуры инкубировали в течение 16 часов при 37°C. После инкубации, добавляли в лунки SytoxAADvanced (Invitrogen) и гранулы для абсолютного подсчета и проводили распознавание проточной цитометрией. Цитотоксичность рассчитывали следующим образом:

$$100 - (\text{импульсов в образце} / \text{максимальное число импульсов}) \times 100$$

где максимальное число импульсов представляет собой число клеток-мишеней в отсутствие любых эффекторных клеток.

### *Визуализация живых клеток*

Человеческая клеточная линия нейробластомы Kelly (DSMZ ACC-355), экспрессирующая GD2, была стабильно трансдуцирована с помощью лентивирусного

вектора, кодирующего NucLight Green (Essen BioScience), чтобы обеспечить автоматический подсчет клеток. За ростом клетки следили с помощью системы для визуализации живых клеток Incucyte Zoom (Essen Bioscience) в течение 60 часов с интервалом в один час. Данные были представлены как изменение отношения количества зеленых объектов на изображение в данный момент времени, нормализованное к количеству зеленых объектов на изображение в нулевой момент времени. Каждая точка данных представляет собой три повтора одной лунки.

#### *Сравнение с Т-клетками $\alpha\beta$ с CAR*

Клетки V $\delta$ 1 были сконструированы с полноразмерными или несигнальными конструкциями CAR, как указано выше. Аналогично, Т-клетки  $\alpha\beta$ , полученные из крови или ткани, также сконструированы с полноразмерными или несигнальными конструкциями CAR. Измеряют цитолитическую активность сконструированных клеток против здоровых и злокачественных клеток, которые экспрессируют целевой антиген, чтобы продемонстрировать нацеленную внепухоловую цитотоксичность каждой популяции.

#### Результаты

Трансдукция полученных из крови клеток V $\delta$ 1 лентивирусным вектором, кодирующим полноразмерные (CAR19) или несигнальные нацеленные конструкции против CD19, привела к более чем 90% эффективности трансдукции (фиг. 3A). Значимого отличия в поверхностной экспрессии молекул CAR не было. Лентивирусная трансдукция не изменила ни иммунофенотип, ни пролиферативную способность трансдуцированных клеток. FACS-анализ нетрансдуцированных (UTD) и трансдуцированных клеток V $\delta$ 1 не выявил каких-либо значимых отличий в поверхностной экспрессии молекул ключевого природного рецептора цитотоксичности (NCR) (NKp30, NKp44, и NKG2D; ФИГ. 3B).

Клетки V $\delta$ 1 распознавали и лизировали клетки из клеточной линии острого лимфолейкоза NALM-6, экспрессирующие CD19. Экспрессия полноразмерного или несигнального CAR для CD19 на клетках V $\delta$ 1 приводила к двукратному увеличению гибели клеток-мишеней (фиг. 4A и 4B; процент гибели 21,4% (UTD) против 46% (nsCAR19) против 58% (CAR19), и 42,8% (UTD) против 83% (nsCAR19) против 88% (CAR19) для донора 1 и донора 2, соответственно, при соотношении эффектора к мишени 1:1). Важно отметить, что несигнальные анти-CD19 CAR, экспрессирующие клетки V $\delta$ 1, не убивали В-клетки здорового человека (фиг. 4C).

Чтобы еще раз доказать общую применимость несигнального подхода CAR, клетки V $\delta$ 1 перенаправляли на опухолевые клетки, экспрессирующие антиген GD2. Трансдукция полученных из крови клеток V $\delta$ 1 с GD2-специфической молекулой nsCAR привела к 54% эффективности трансдукции, измеренной с помощью FACS (фиг. 5A). Нетрансдуцированные и трансдуцированные nsCAR клетки V $\delta$ 1 культивировали совместно с экспрессирующей GD2 клеточной линией нейробластомы (Kelly), в соотношении эффектор/мишень 1:1. Лизис клеток-мишеней измеряли с помощью визуализации живых клеток (Incucyte, Essen Bioscience). Совместное культивирование

клеток Kelly с клетками V $\delta$ 1, экспрессирующими nsCAR, привело к 40% снижению общего количества клеток-мишеней по сравнению с клетками-мишенями, культивируемыми в присутствии нетрансдуцированных клеток V $\delta$ 1 (фиг. 5B).

### **Пример 3: Лечение злокачественной опухоли Т-клеткой $\gamma\delta$ , сконструированной с гетерологичной нацеленной конструкцией**

Гетерологичную нацеленную конструкцию синтезируют с использованием способов клонирования и ПЦР, известных в данной области. Белковый фрагмент, кодирующий scFv, нацеленный на опухолеассоциированный антиген (ТАА), слит с N-концом стеблевого домена, который слит с N-концом трансмембранного домена CD8. Гетерологичную нацеленную конструкцию затем клонируют в лентивирусный вектор.

Пациент проходит процедуру лейкафереза, на которой берут образец крови и истощают эритроциты. Т-клетки  $\alpha\beta$  истощают с использованием стандартных протоколов магнитной сепарации. Оставшуюся популяцию, которая включает Т-клетки  $\gamma\delta$ , размножают с использованием любого подхода к размножению Т-клетки  $\gamma\delta$ , известного в данной области или описываемого в настоящем документе. Во время размножения клетки инкубируют с лентивирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий гетерологичную нацеленную конструкцию, и полинуклеотид интегрируется в геном Т-клетки  $\gamma\delta$  посредством обратной транскрипции. Клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, будут экспрессировать на поверхности гетерологичную нацеленную конструкцию. Затем трансдуцированные клетки, экспрессирующие гетерологичную нацеленную конструкцию, отделяют от нетрансдуцированных клеток и собирают для инфузии в качестве аутологичной или аллогенной терапии.

Клетки вводят пациенту внутривенно в течение двух часов. Внутривенное введение повторяют один раз в неделю в течение 12 недель и наблюдают за симптомами злокачественной опухоли.

### **Другие варианты осуществления**

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в настоящий документ в той же степени, как если бы каждая независимая публикация или патентная заявка была специально и индивидуально указана для включения в качестве ссылки.

Хотя изобретение было описано в связи с его конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что оно допускает дальнейшие модификации, и эта заявка предназначена для охвата любых вариантов, применений или адаптаций по настоящему изобретению, следуя, в основном, принципам по настоящему изобретению и включая такие отступления от настоящего описания, которые входят в известную или обычную практику в данной области, к которой относится изобретение, и могут применяться к существенным признакам, изложенным выше, и находятся в объеме формулы изобретения.

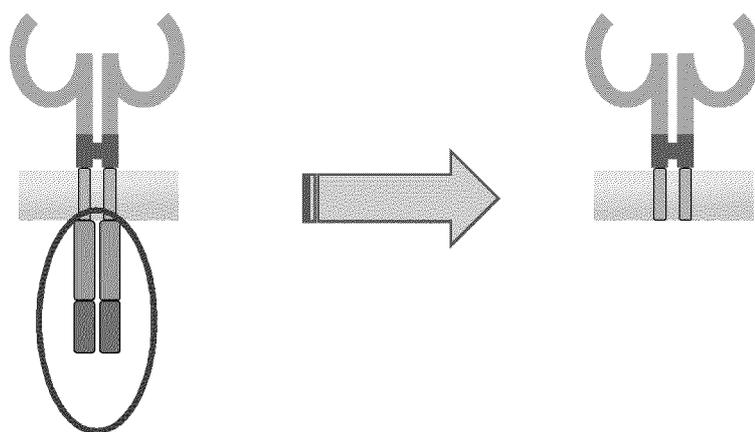
Другие варианты осуществления находятся в пределах формулы изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Сконструированная Т-клетка гамма-дельта ( $\gamma\delta$ ), содержащая гетерологичную нацеленную конструкцию, где гетерологичная нацеленная конструкция содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен, функционально связанный с антигенсвязывающим доменом, где у гетерологичной нацеленной конструкции отсутствует внутриклеточный домен, способный активировать сконструированную Т-клетку  $\gamma\delta$ .

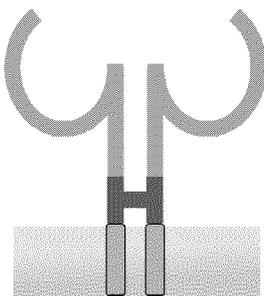
По доверенности

ФИГ. 1

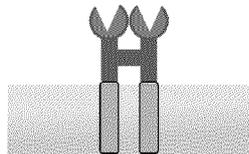


ФИГ. 2

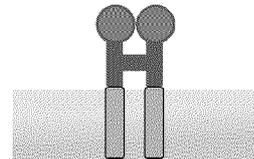
A.



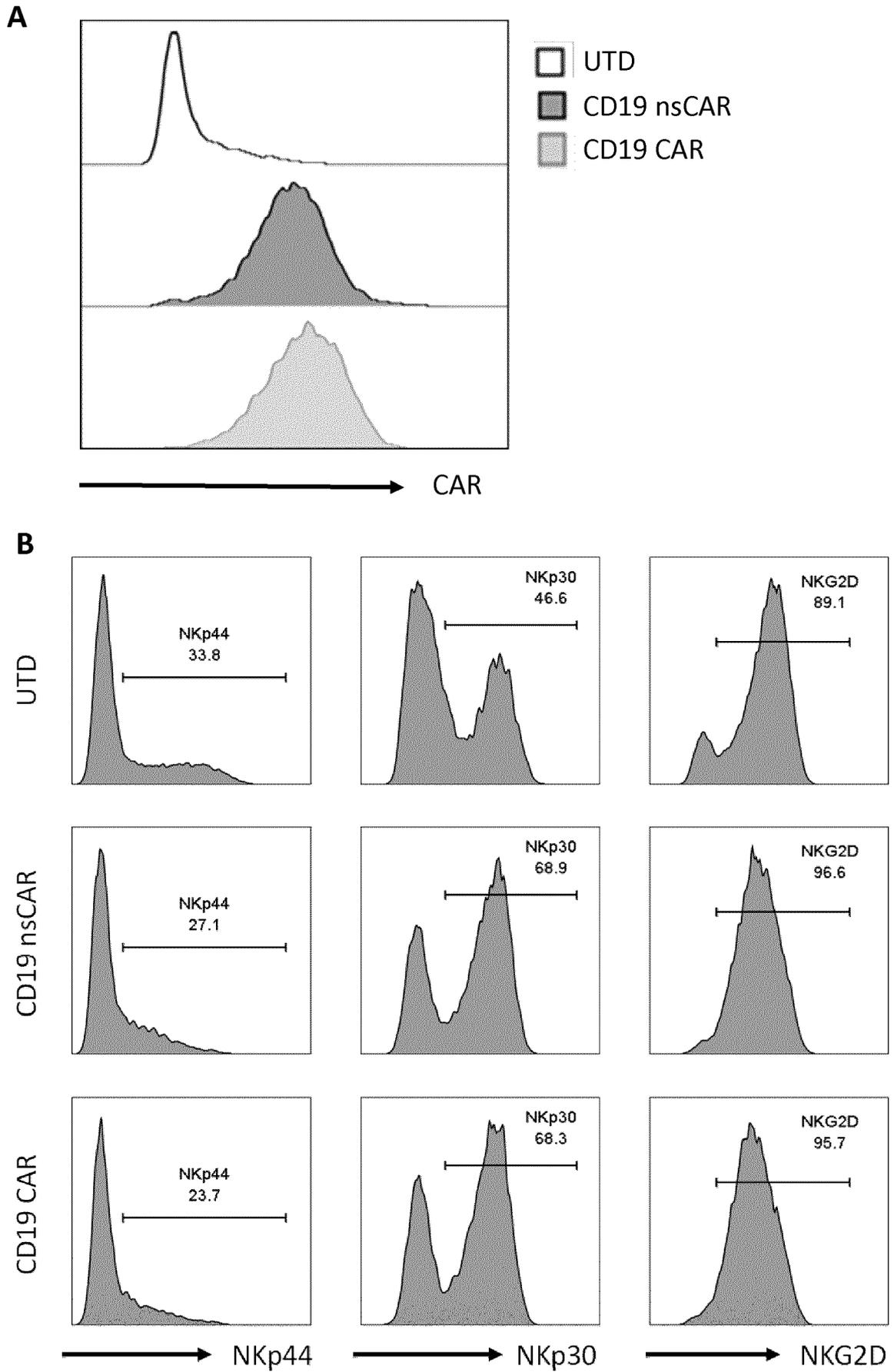
B.



C.

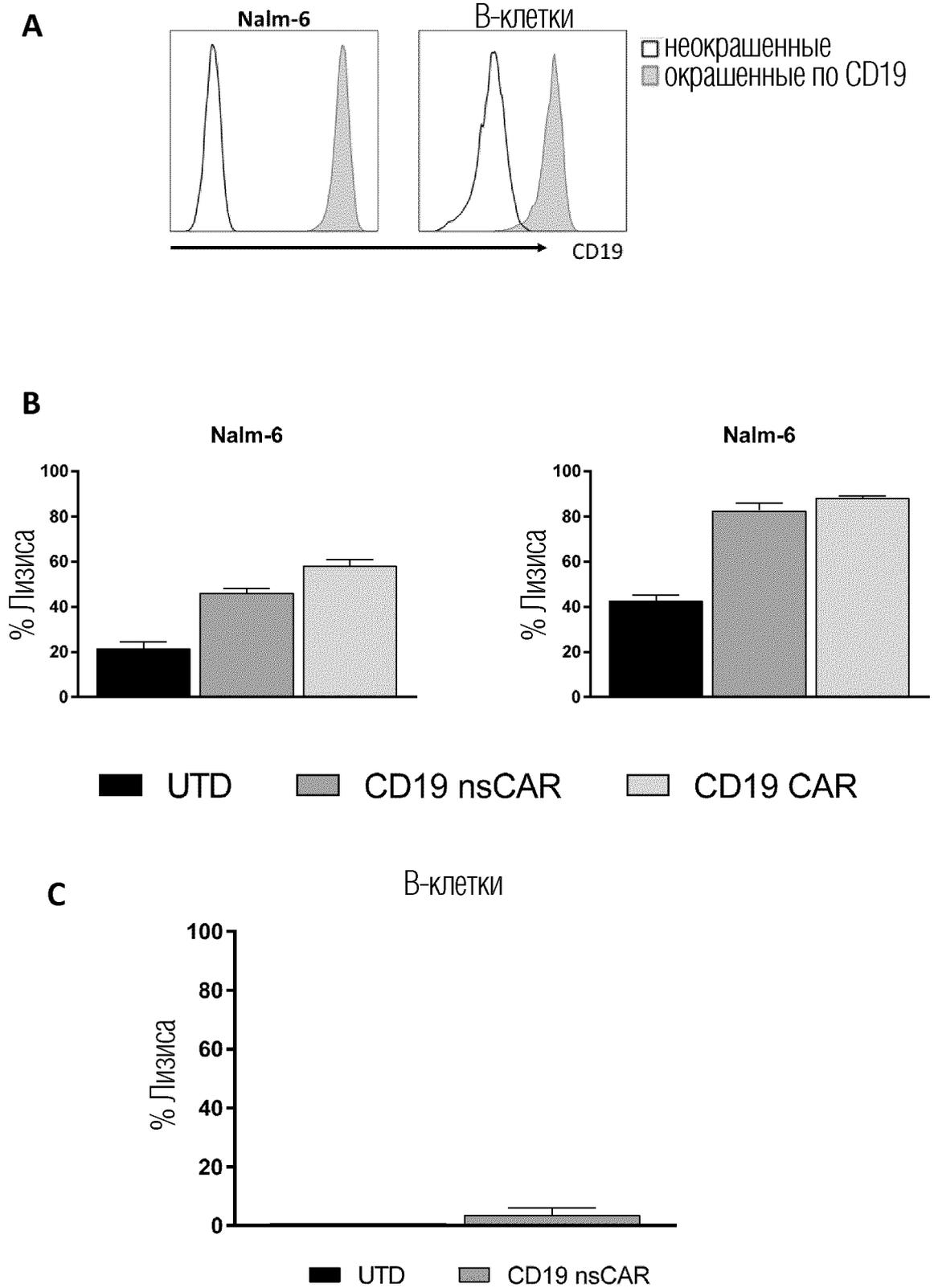


3/5  
ФИГ. 3

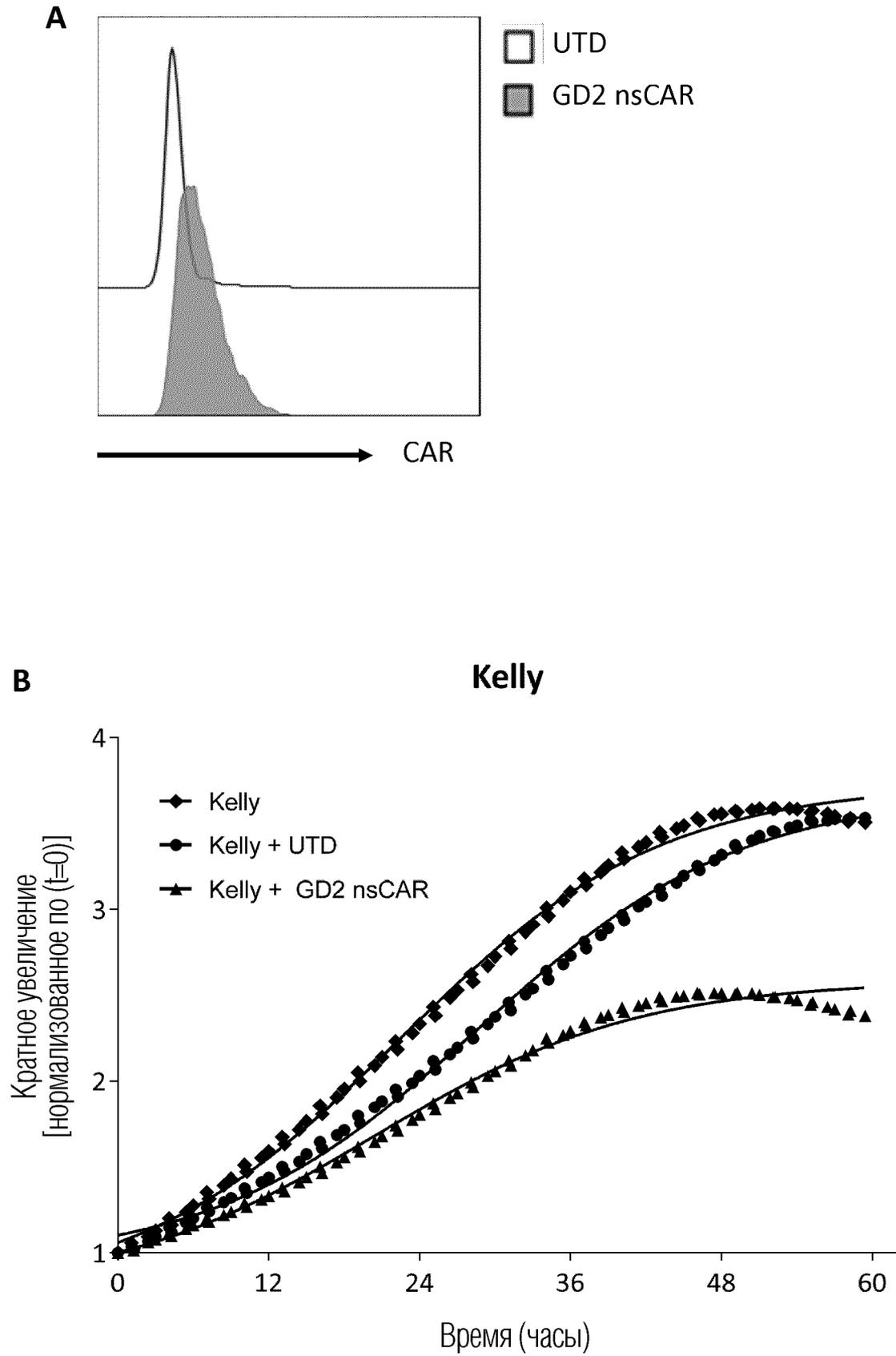


4/5

ФИГ. 4



## ФИГ. 5



**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202490440**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:  
См. дополнительный лист

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

C07K 14/435, C07K 16/00, C12N 5/0783, A61P 35/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)  
Espacenet, EAPATIS, Google, Reaxys

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	WO 2016166544 A1 (TC BIOPHARM LTD) 2016-10-20 Реферат, формула пп.1,2,9,18, фиг.1B,2, стр.6 описания	1
Y	JONATHAN FISHER. Avoidance of On-Target Off-Tumor Activation Using a Co-stimulation-Only Chimeric Antigen Receptor. MOL. THER. 2017 May 3;25(5):1234-1247. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.002. Epub 2017 Mar 22. Реферат, стр.1235,1244,фиг.3A Реферат, стр.1235,1244,фиг.3A	1
A	WO 2016174461 A1 (UCL BUSINESS PLC) 2016-11-03 реферат, формула пп.1,2,10	1
A	J. S. BRIDGEMAN. CD3ζ-based chimeric antigen receptors mediate T cell activation via cis- and trans-signalling mechanisms: implications for optimization of receptor structure for adoptive cell therapy. CLIN EXP IMMUNOL. 2014 Feb;175(2):258-67. doi: 10.1111/cei.12216. Реферат, стр.265	1

 последующие документы указаны в продолжении графы

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

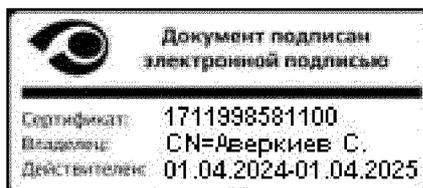
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&amp;» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 03 июня 2024 (03.06.2024)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202490440**

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

*C12N 5/0783* (2010.01)  
*C07K 14/435* (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

СПК:

**C12N 5/0636**  
**C07K 14/435**  
C12N 2510/00  
C07K 2319/00  
C07K 2317/00  
A61P 35/00