



(51) МПК

A61K 35/17 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 35/17 (2021.05); A61P 35/00 (2021.05); A61P 31/04 (2021.05); A61P 31/12 (2021.05); A61P 37/00 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2017121115, 17.11.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.11.2015

Дата регистрации:
28.09.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
17.11.2014 US 62/080,500

(43) Дата публикации заявки: 19.12.2018 Бюл. № 35

(45) Опубликовано: 28.09.2021 Бюл. № 28

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 19.06.2017

(86) Заявка РСТ:
US 2015/061189 (17.11.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/081518 (26.05.2016)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

САНТАГУИДА Марианне Тереза (US),
ЛИН Энди Ан-дех (US),
ФУРД Орит (US),
ЯКОВОВИЦ Айя (US)

(73) Патентообладатель(и):

ЭДИСЕТ БИО, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2013074916 A1, 23.05.2013. US
2006205089 A1, 14.09.2006. US 2008026986 A1,
31.01.2008. D. KABELITZ et al., The
Multifunctionality of Human
V[gamma]9V[delta]2 [gamma][delta] T Cells:
Clonal Plasticity or Distinct Subsets? Plasticity of
Human [gamma][delta] T Cells //
SCANDINAVIAN JOURNAL OF
IMMUNOLOGY, GB, (20120901), vol. 76, no. 3,
pages 213 (см. прод.)

(54) ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ГАММА ДЕЛЬТА Т-КЛЕТКИ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и касается способа получения ex vivo или in vitro размноженной $\delta 1$ $\gamma \delta$ Т-клеточной популяции или $\delta 2$ $\gamma \delta$ Т-клеточной популяции, где указанный способ включает обеспечение комплексного образца, содержащего $\gamma \delta$ Т-клетки; размножение $\delta 1$ или $\delta 2$ $\gamma \delta$ Т-клеток путем культивирования клеток образца с по меньшей мере одним антителом, которое селективно размножает $\delta 1$ или $\delta 2$ $\gamma \delta$ Т-клетки, где указанное по меньшей мере одно антитело, которое селективно

размножает $\delta 1$ или $\delta 2$ $\gamma \delta$ Т-клетки, выбрано, соответственно, из i) антител, которые связываются с аминокислотной последовательностью в варибельной области $\delta 1$ TCR, с селективным размножением $\delta 1$ $\gamma \delta$ Т-клеток и получением размноженной $\delta 1$ $\gamma \delta$ Т-клеточной популяции; или ii) антител, которые связываются с аминокислотной последовательностью в варибельной области $\delta 2$ TCR, с селективным размножением $\delta 2$ $\gamma \delta$ Т-клеток и получением размноженной $\delta 2$ $\gamma \delta$ Т-клеточной популяции.

Группа изобретений также касается размноженной популяции $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клеток или размноженной популяции $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеток, полученной указанным способом. Группа

изобретений обеспечивает улучшенный способ получения популяции $\gamma\delta$ Т-клеток. 2 н. и 21 з.п. ф-лы, 13 ил., 46 пр.

(56) (продолжение):

- 222. GROH V ET AL, "Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB"//PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, (19990608), vol. 96, no. 12, pages 6879 - 6884.

RU 2 7 5 6 2 4 7 C 2

RU 2 7 5 6 2 4 7 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 35/17 (2015.01)*A61P 35/00* (2006.01)*A61P 31/04* (2006.01)*A61P 31/12* (2006.01)*A61P 37/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 35/17 (2021.05); *A61P 35/00* (2021.05); *A61P 31/04* (2021.05); *A61P 31/12* (2021.05); *A61P 37/00* (2021.05)

(21)(22) Application: **2017121115**, 17.11.2015

(24) Effective date for property rights:
17.11.2015

Registration date:
28.09.2021

Priority:

(30) Convention priority:
17.11.2014 US 62/080,500

(43) Application published: **19.12.2018** Bull. № 35(45) Date of publication: **28.09.2021** Bull. № 28(85) Commencement of national phase: **19.06.2017**

(86) PCT application:
US 2015/061189 (17.11.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/081518 (26.05.2016)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"**

(72) Inventor(s):

**SANTAGUIDA, Marianne, Theresa (US),
LIN, Andy, An-deh (US),
FOORD, Orit (US),
JAKOBOVITS, Aya (US)**

(73) Proprietor(s):

ADICET BIO, INC. (US)

(54) **GENETICALLY MODIFIED GAMMA DELTA T CELLS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to medicine and concerns a method for obtaining an ex vivo or in vitro reproduced $\delta 1$ $\gamma \delta$ T-cell population or $\delta 2$ $\gamma \delta$ T-cell population, where the specified method includes providing a complex sample containing $\gamma \delta$ T cells; reproducing $\delta 1$ or $\delta 2$ $\gamma \delta$ T cells by cultivating sample cells at least one antibody that selectively reproduce $\delta 1$ or $\delta 2$ $\gamma \delta$ T cells, where the specified at least one antibody that selectively reproduce $\delta 1$ or $\delta 2$ $\gamma \delta$ T cells, is selected, respectively, from i) antibodies that bind to the amino-acid sequence in the variable

region of $\delta 1$ TCR, with selective reproduction of $\delta 1$ $\gamma \delta$ T cells and obtaining the reproduced $\delta 1$ $\gamma \delta$ T-cell population; or ii) antibodies that bind to the amino acid sequence in the variable region of $\delta 2$ TCR, with selective reproduction of $\delta 2$ $\gamma \delta$ T cells and obtaining the reproduced $\delta 2$ $\gamma \delta$ T cell population. The group of inventions also concerns a reproduced population of $\delta 1$ $\gamma \delta$ T cells or a reproduced population of $\delta 2$ $\gamma \delta$ T cells obtained by the specified method.

EFFECT: group of inventions provides an improved method for obtaining a population of $\gamma \delta$ T-cells.

23 cl, 13 dwg, 46 ex

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[1] Распознавание антигена Т-лимфоцитами может быть достигнуто высоким разнообразием гетеродимерных рецепторов, Т-клеточных рецепторов (TCR). Примерно 95% Т-клеток человека в крови и лимфоидных органах экспрессируют гетеродимерный $\alpha\beta$ TCR-рецептор ($\alpha\beta$ Т-клеточная линия). Примерно 5% Т-клеток человека в крови и лимфоидных органах экспрессируют гетеродимерный $\gamma\delta$ TCR-рецептор ($\gamma\delta$ Т-клеточная линия). Эти подмножества Т-клеток можно называть « $\alpha\beta$ » и « $\gamma\delta$ » Т-клетками, соответственно. $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ Т-клетки различны по функции. $\alpha\beta$ Т-клетки обуславливают МНС-рестригированный приобретенный иммунитет, а $\gamma\delta$ Т-клетки охватывают врожденный и МНС-нерестригированный приобретенный иммунитет. Активация $\alpha\beta$ Т-клеток происходит тогда, когда антигенпредставляющая клетка (АПК) представляет антиген в контексте МНС класса I/II. Дендритные клетки являются самыми сильными из известных активаторов наивных Т-клеток. Два сигнала необходимы для полной активации $\alpha\beta$ Т-клеток: а) сигнал, генерируемый взаимодействием МНС-пептида с комплексом TCR-CD3; и b) сигнал, генерируемый взаимодействием CD28 на Т-клетках с членами семейства B7 на АПК (ко-стимулирующий сигнал). В отличие от $\alpha\beta$ Т-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки могут непосредственно распознавать антиген и не требуют взаимодействия МНС-пептида с комплексом TCR-CD3. Следовательно, считается, что $\gamma\delta$ Т-клетки являются МНС-нерестригированными. В эндогенных Т-клетках отсутствие ко-стимуляционного сигнала приводит к клональной анергии.

[2] Способность эндогенных $\gamma\delta$ Т-клеток распознавать антиген напрямую делает $\gamma\delta$ Т-клетки привлекательным терапевтическим инструментом. Однако трудности с манипулированием и направлением эндогенных $\gamma\delta$ Т-клеток ограничивают терапевтическую полезность $\gamma\delta$ Т-клеток, полученных от пациента, в клинике.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В некоторых вариантах реализации раскрытие предусматривает генетически модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку, при этом генетически модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка модифицирована для экспрессии одного, двух или более различных фрагментов распознавания опухолей, где каждый фрагмент распознавания опухолей распознает опухолевый антиген. Фрагмент распознавания опухолей может быть сконструирован для распознавания различных эпитопов одного и того же опухолевого антигена, антигенов отдельных опухолей, опухолевого антигена и рецепторов активирующей или инактивирующей ко-стимуляции/рецепторов иммунной модуляции, антигена в комплексе с молекулой МНС или хоминг рецептора. В некоторых случаях раскрытие предусматривает способ лечения рака с использованием генетически модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть сконструирована как аллогенная по отношению к субъекту и модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть опухоль-специфической аллогенной $\gamma\delta$ Т-клеткой. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка не имеет человеческого локуса HLA. Локус HLA может быть выбран из группы, состоящей из HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ и HLA-DR и тогда модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована таким образом, чтобы она не экспрессировала ген двух или более локусов HLA. В некоторых случаях по меньшей мере один модифицированный фрагмент распознавания опухолей представляет собой модифицированный Т-клеточный рецептор. Т-клеточный рецептор может быть рецептором Т-клеток человека, рецептором мышиных Т-клеток, рецептором Т-клеток крысы или химерным Т-клеточным рецептором. Модифицированный Т-клеточный рецептор может быть модифицированным $\alpha\beta$ TCR и два различных модифицированных $\alpha\beta$ TCR могут быть

сконструированы для распознавания различных эпитопов одного и того же антигена. В других случаях модифицированный Т-клеточный рецептор представляет собой модифицированный $\gamma\delta$ TCR. В некоторых вариантах реализации модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка сконструирована для проникновения в солидную опухоль.

- 5 Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть сконструирована для распознавания опухолевого антигена, который экспрессируется внутриклеточно или внеклеточно в пределах опухолевой клетки. В случае внеклеточно экспрессированного опухолевого антигена, модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть выполнена с возможностью распознавания антигена, который представляет собой пептид в комплексе с молекулой
- 10 МНС. В некоторых случаях опухолевый антиген представляет собой антиген лимфомы, антиген лейкемии, антиген множественной миеломы, антиген рака молочной железы, антиген рака предстательной железы, антиген рака мочевого пузыря, антиген рака толстой кишки и прямой кишки, антиген рака мозга, антиген рака желудка, антиген рака головы и шеи, антиген рака почки, антиген рака легкого, антиген рака
- 15 поджелудочной железы, антиген саркомы, антиген мезотелиомы, антиген рака яичников или антиген меланомы. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка происходит от $V\delta 1$ +Т-клетки, $V\delta 2$ +Т-клетки или $V\delta 3$ +Т-клетки или смеси $V\delta 1^+$, $V\delta 2$ +или $V\delta 3$ +Т-клеток. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может происходить от CD3+Т-клетки или
- 20 CD3⁻ Т-клетки. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть сконструирована для распознавания различных эпитопов одного и того же антигена.

- [0004] В некоторых случаях два или более различных фрагмента распознавания опухолей кодируются различными полинуклеотидными последовательностями и каждая отдельная полинуклеотидная последовательность модифицирована для распознавания
- 25 другого эпитопа одного и того же антигена. В некоторых случаях по меньшей мере один фрагмент распознавания опухолей клонируется из опухолевой клетки. В других случаях, по меньшей мере, один фрагмент распознавания опухолей модифицирован синтетически. В некоторых случаях по меньшей мере один фрагмент распознавания опухолей представляет собой фрагмент антитела или его антигенсвязывающий фрагмент,
- 30 который распознает опухолевый антиген. Фрагментом распознавания опухолей может быть модифицированная легкая цепь иммуноглобулина, модифицированная тяжелая цепь иммуноглобулина или любой ее фрагмент. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка также экспрессирует рецептор миграции и хоминг рецептор. Хоминг молекула может присоединять модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку к солидной опухоли.
- 35 В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка дополнительно модифицирована таким образом, что отсутствует по меньшей мере один ген иммунной контрольной точки и ген иммунной контрольной точки может представлять собой ген CTLA-4, ген PD-1, ген LAG3, ген CEACAM-1 или другой ген. В некоторых случаях опухолевый антиген выбран из CD19, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123,
- 40 CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, альфафетопротеина (AFP), карциноэмбрионального антигена (CEA), CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, PLIF, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, гликолипида F77, белка, активирующего фибробласты, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, мезотелина, c-met, CSPG4, нектин-4, VEGFR2, PSCA, белка/рецептора, связывающего фолат, SLC44A4, Cripto, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, SLTRK6,
- 45 gp100, MART1, тирозиназы, SSX2, SSX4, NYESO-1, эпителиального опухолевого антигена (ETA), генов семейства MAGEA (таких как MAGE3A, MAGE4A), KKLC1, мутированного ras, β Raf, p53, молекулы A, связанной с цепью МНС класса I (MICA), молекулы B, связанной с цепью МНС класса I (MICB), HPV или CMV. В других случаях по меньшей мере один фрагмент распознавания опухолей представляет собой химерный рецептор

антигена (CAR), предназначенный для распознавания антигена, части или фрагмента любого антигена, описанного в данном документе.

[0005] В других вариантах реализации модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка модифицирована для экспрессии фрагмента распознавания антигена, причем фрагмент распознавания антигена распознает антиген, ассоциированный с аутоиммунным заболеванием. Такие клетки могут быть модифицированы для экспрессии одного, двух или более фрагментов распознавания антигена, причем каждый фрагмент распознавания антигена распознает другой эпитоп одного и того же аутоиммунного антигена. В некоторых случаях фрагмент распознавания опухоли распознает различные антигены, антиген и рецепторы активирующей или инактивирующей ко-стимуляции/рецепторы иммунной модуляции, антиген в комплексе с молекулой МНС или хоминг рецептор, связанный с аутоиммунным заболеванием.

[0006] В альтернативных вариантах реализации модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка модифицирована для экспрессии фрагмента распознавания антигена, при этом фрагмент распознавания антигена распознает патогенный антиген. Такие клетки могут быть модифицированы так, чтобы экспрессировать два или более фрагмента распознавания антигена, причем каждый фрагмент распознавания антигена распознает различный эпитоп одного и того же патогенного антигена. В некоторых случаях фрагмент распознавания опухоли распознает различные антигены, антиген и рецепторы активирующей или инактивирующей ко-стимуляции/рецепторы иммунной модуляции, антиген в комплексе с молекулой МНС или хоминг рецептор, связанный с патогенным антигеном.

[0007] Патогенным антигеном может быть бактериальная молекула или вирусная молекула, такая как бактериальный белок или вирусный белок.

[0008] В других случаях раскрытие предусматривает $\gamma\delta$ Т-клеточную популяцию, при этом размножение $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции активируется агентом, который стимулирует размножение $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции со средней скоростью около 1 деления клеток менее чем за 24 часа. В некоторых случаях размноженная $\gamma\delta$ Т-клеточная популяция содержит процент $\delta 1$ Т-клеток, $\delta 2$ Т-клеток или $\delta 3$ Т-клеток и процент любого из одного типа из вышеупомянутых размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток может быть более 5%. В некоторых случаях процент $\delta 1$, $\delta 2$ или $\delta 3$ Т-клеток в $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции повышается *in vitro* или *in vivo* со средней скоростью около 1 деления клеток менее чем за 24 часа. В некоторых случаях $\gamma\delta$ Т-клеточная популяция дополнительно содержит количество модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток, при этом модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки модифицированы для экспрессии фрагмента распознавания антигена. Модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть сконструированы так, что у них отсутствует человеческий локус HLA. Агент, который стимулирует размножение $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции может быть антителом, и антитело может быть выбрано из группы, состоящей из 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, γ 3.20, 7A5, IMM510, R9.12 и 11F2 антител. В некоторых случаях антитело иммобилизуется на поверхности.

[0009] В некоторых случаях раскрытие относится к активирующему эпитопу $\gamma\delta$ Т-клетки. В некоторых случаях активирующий эпитоп стимулирует размножение $\gamma\delta$ популяции Т-клеток при средней скорости 1 деление клеток менее чем за 24 часа или в другом подходящем периоде времени, что поддерживает быстрое размножение популяции $\gamma\delta$ Т-клетки. В некоторых случаях активирующий эпитоп является аминокислотной последовательностью δ TCR, такой как $\delta 1$, $\delta 2$ или $\delta 3$ TCR. В некоторых случаях активирующий эпитоп представляет собой эпитоп, связанный любым из антител, выбранных из группы, состоящей из 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3,

TS-1, γ 3.20, 7A5, IMMU510, R9.12 и 11F2 антител. Активирующий эпитоп может содержать аминокислотную последовательность из сегмента гена V δ 1 и сегментов генов J δ 1, J δ 2, J δ 3 или J δ 4. В некоторых случаях активирующий эпитоп представляет собой конформационный эпитоп, а в других случаях активирующий эпитоп представляет собой линейный эпитоп.

[0010] В некоторых случаях раскрытие изобретения предусматривает способ определения эпитопа $\gamma\delta$ Т-клеточного рецептора, способ, включающий (а) получение библиотеки эпитопов из $\gamma\delta$ Т-клеточный рецептора; (b) контактирование библиотеки эпитопов антителом; и (с) идентификацию аминокислотной последовательности по меньшей мере одного эпитопа в библиотеке эпитопов, который связан антителом. Антитело может быть выбрано из группы, состоящей из 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, γ 3.20, 7A5, IMMU510, R9.12, 11F2 антител. В некоторых случаях антитело присоединяют к твердой подложке. Эпитоп Т-клеточного рецептора может соответствовать непрерывной или прерывистой последовательности аминокислот в Т-клеточном рецепторе. Библиотека эпитопов может содержать фрагменты в диапазоне от около 10 аминокислот до около 30 аминокислот в длину, от около 10 аминокислот до около 20 аминокислот в длину, от около 5 аминокислот до около 12 аминокислот в длину. В некоторых случаях антитело помечают. Метка может быть радиоактивной молекулой, люминесцентной молекулой, флуоресцентной молекулой, ферментом или биотином. В некоторых случаях библиотека эпитопов содержит пептиды, транслированные из синтетически сконструированных кДНК, где синтетически сконструированные кДНК содержат сегменты из множества синтетически сконструированных γ TCR и множество синтетически сконструированных δ TCR. В других случаях библиотека эпитопов содержит пептиды, амплифицированные из

25 тотальной РНК, выделенной из $\delta\gamma$ Т-клеток человека, которые происходят от PBMCS человека, или лимфоцитов, выделенных из злокачественной или нормальной эпителиальной ткани человека. Библиотека синтетически сконструированных кДНК может содержать множество сегментов генов V δ 1, V δ 2 и V δ 3, различающихся по их J δ участку, и библиотека может содержать множество сегментов генов V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5, V γ 8, V γ 9, V γ 10, δ 1, δ 2 и δ 3.

[0011] В некоторых вариантах реализации раскрытие предусматривает способ лечения нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки, описанной в данном документе. Дополнительные аспекты и преимущества настоящего раскрытия станут очевидными для специалистов в данной области техники из последующего подробного описания, в котором показаны и описаны только иллюстративные варианты реализации настоящего раскрытия. Как будет реализовано, настоящее раскрытие может иметь и другие и различные варианты реализации, и его некоторые детали могут иметь модификации, не выходя за рамки раскрытия. Соответственно графические материалы и описание следует рассматривать как иллюстративные по своей природе, а не как ограничительные.

ВКЛЮЧЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ССЫЛКИ

[0012] Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в этом описании, включены в данном документе посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка была специально и индивидуально указана для включения в качестве ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0013] Новые признаки изобретения изложены подробно в прилагаемой формуле изобретения. Более полное понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения

будет получено со ссылкой на следующее подробное описание, в котором изложены иллюстративные варианты реализации, в которых используются принципы изобретения, и прилагаемые графические материалы (также «фигура» и «фиг.» в данном документе), в которых:

5 [0014] На Фиг. 1 схематически проиллюстрированы модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки. **Панель А** иллюстрирует модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку, которая экспрессирует один фрагмент распознавания опухолей. **Панель В** иллюстрирует модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку, которая экспрессирует два фрагмента распознавания опухоли.

[0015] Фиг. 2 схематически иллюстрирует способ лечения субъекта.

10 [0016] Фиг. 3 схематически иллюстрирует способ введения популяции модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки субъекту.

[0017] Фиг. 4 иллюстрирует график, демонстрирующий рост $\gamma\delta$ 1 и $\gamma\delta$ 2 лимфоцитов, выделенных из метастазов аденокарциномы толстой кишки в печени (TIL 1) и опухолей почек (TIL 2), и было продемонстрировано, что они экспрессируют CCR4 и CCR7.

15 [0018] Фиг. 5 иллюстрирует график, демонстрирующий рост $\gamma\delta$ Т-клеток в сыворотке и бессывороточной среде.

[0019] Фиг. 6 иллюстрирует график, демонстрирующий эксперименты блокирования антител к $\gamma\delta$ TCR с 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B3, B6, TS-1, γ 3.20, IMM510 или 11F2.

20 [0020] Фиг. 7 иллюстрирует график, демонстрирующий эксперименты блокирования антител к $\gamma\delta$ TCR с 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B3, B6, TS-1, γ 3.20, IMM510 или 11F2.

[0021] Фиг. 8 иллюстрирует эксперимент по конкурентному связыванию с антителом TS-1 к TCR V δ 1.

[0022] Фиг. 9 иллюстрирует эксперимент по конкурентному связыванию с антителом TS8-2 к TCR V δ 1.

25 [0023] Фиг. 10 иллюстрирует график, демонстрирующий активацию и размножение δ 1 Т-клеток из PBMC.

[0024] Фиг. 11 иллюстрирует график, демонстрирующий активацию и размножение δ 2 Т-клеток из PBMC.

30 [0025] Фиг. 12 иллюстрирует график, демонстрирующий кратность размножение δ 1 Т-клеток из PBMC.

[0026] Фиг. 13 иллюстрирует график, демонстрирующий размножение δ 2 Т-клеток из PBMC.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

35 [0027] В то время как различные варианты реализации изобретения были продемонстрированы и описаны в данном документе, для специалистов в данной области техники очевидно, что такие варианты реализации предоставляются только в качестве примера. Множество вариаций, изменений и замещений может прийти на ум специалистам в данной области техники, не отступая от изобретения. Следует понимать, что могут быть использованы различные альтернативы вариантам реализации изобретения, описанным в данном документе.

Обзор

40 [0028] У людей, $\gamma\delta$ Т-клетка (клетки) представляют собой подмножество Т-клеток, которые обеспечивают связь между врожденным и приобретенным иммунным ответами. Эти клетки подвергаются перегруппировке V-(D)-J сегментов для создания антигенспецифических $\gamma\delta$ Т-клеточных рецепторов ($\gamma\delta$ TCR) и $\gamma\delta$ Т-клетка (клетки) и может быть непосредственно активирована путем распознавания антигена либо $\gamma\delta$ TCR или другими не TCR белками, действуя независимо или вместе для активации $\gamma\delta$ Т-клеточных эффекторных функций. $\gamma\delta$ Т-клетки представляют небольшую часть общей

популяции Т-клеток у млекопитающих, приблизительно 1-5% Т-клеток в периферической крови и лимфоидных органах, и они, по-видимому, находятся преимущественно в эпителиальных тканях, богатых клетками, таких как кожа, печень, пищеварительный тракт, дыхательный и репродуктивный пути. В отличие от $\alpha\beta$ TCR, которые распознают антигены, связанные с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) $\gamma\delta$ TCR могут непосредственно распознавать бактериальные антигены, вирусные антигены, стресс-антигены, экспрессируемые пораженными клетками, и опухолевые антигены в виде интактных белков или непептидных соединений.

[0029] Способность $\gamma\delta$ Т-клеток распознавать широкий спектр антигенов, может быть усилена генной инженерией $\gamma\delta$ Т-клеток. $\gamma\delta$ Т-клетка (клетки) может быть модифицирована для обеспечения универсальной аллогенной терапии, которая распознает антиген выбора *in vivo*. Как описывается в данном документе, $\gamma\delta$ Т-клетка (клетки), которая была модифицирована для экспрессии экспрессионной кассеты, содержит по меньшей мере один фрагмент распознавания опухолей, такой как $\alpha\beta$ TCR или $\gamma\delta$ TCR, связанный с трансмембранным доменом и/или внутриклеточным доменом активации Т-клеток. Домены активации могут быть получены из $\alpha\beta$ TCR или $\gamma\delta$ TCR машинерии Т-клетки. Например, домен активации может быть получен из молекул CD28, CD2, CTLA-4, ICOS, JAMAL, PD-1, 41-BB, CD27, CD30, OX40, NKG2D, HVEM или CD46. $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована таким образом, чтобы экспрессировать два или более различных антитела TCR или антигенсвязывающие фрагменты, которые распознают различные эпитопы одного и того же антигена. При введении субъекту, контактирование модифицированного $\alpha\beta$ TCR, $\gamma\delta$ TCR, антитела или рецептора химерного антигена CAR с антигеном эффективно обеспечивает $\gamma\delta$ Т-клетку со значительной цитотоксичностью *in vivo*. TCR можно получить из Т-клетки человека, мышинной Т-клетки, Т-клетки крысы, гуманизированной мыши, гуманизированных крыс, иммунизированного млекопитающего или из библиотеки фагов или дрожжей. Антитело, CAR или любой антигенсвязывающий фрагмент могут быть получены из В-клетки человека, мышинной В-клетки, В-клетки крысы, В-клетки верблюда, В-клетки ламы, иммунизированного млекопитающего или из библиотеки фагов или дрожжей. Фрагмент распознавания опухолей, который экспрессируется модифицированной $\gamma\delta$ Т-клеткой, может распознавать антиген, который экспрессируется внутриклеточно или внеклеточно больной клеткой. Например, клетка может быть инфицирована вирусом, вызывающим рак, таким как вирус папилломы человека (ВПЧ), и больная клетка может экспрессировать один или несколько антигенов ВПЧ внутриклеточно. Больная клетка может перерабатывать внутриклеточно экспрессируемые антигены ВПЧ в более мелкие фрагменты, что позволяет связывать антигенный пептид с молекулой МНС класса I и переносить на клеточную поверхность. Фрагмент распознавания опухолей модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки может быть сконструирован для распознавания различных фрагментов антигена или эпитопов, которые внутриклеточно экспрессируются больной клеткой и представлены на поверхности клетки в комплексе с молекулой МНС класса I или класса II. Альтернативно, фрагмент распознавания опухолей модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки может быть сконструирован для распознавания экзогенных антигенов, экспрессированных на поверхности опухолевых клеток, или полученных пептидов, представленных на клеточной поверхности в комплексе с молекулами класса МНС.

[0030] Предусмотренное в данном документе является модифицированной $\gamma\delta$ Т-клеткой (клетками) и способами ее применения в качестве терапевтического продукта с сильной и селективной способностью нацеливаться на выбранный антиген на

пораженной клетке. Полинуклеотидную или белковую последовательность $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ TCR можно клонировать стандартными методами из одной или множества $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ Т-клеток, которые взаимодействуют с опухолевым антигеном(-ами), бактериальным антигеном(-ами), вирусным антигеном(-ами) или стресс-антигеном(-ами). Альтернативно, полинуклеотидная последовательность $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ TCR может быть сконструирована *in silico* на компьютерно-программном продукте. Кассета экспрессии, содержащая модифицированные $\gamma\delta$ TCR, может быть синтезирована, например, с помощью методов синтеза олигонуклеотидов. Методы скрининга с высокой пропускной способностью могут быть использованы для характеристики связывания модифицированного TCR с опухолевым антигеном. Модифицирование кассеты экспрессии, содержащей $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ TCR, трансмембранный домен и домен активации повышают активность и цитотоксические свойства $\gamma\delta$ Т-клеток, тем самым обеспечивая модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетке сильную цитотоксичность.

[0031] Модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть получены из немодифицированных Т-клеток, выделенных из крови, пуповинной крови, стволовых клеток, опухолей или опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL). Выделенные Т-клетки могут быть получены из млекопитающего, например человека. Одна или несколько клеток в выделенной популяции Т-клеток может быть модифицирована таким образом, чтобы экспрессировать полинуклеотид (полинуклеотиды) из кассеты экспрессии, которая содержит, например, фрагмент распознавания опухоли, связанный с доменом активации или инактивации Т-клеток. Фрагмент распознавания опухолей предназначен для распознавания целевого антигена опухоли, инактивации опухолевой клетки или домена инактивации Т-клеток. Фрагмент распознавания опухолей предназначен для распознавания целевого антигена опухоли, рецепторов активирующей или инактивирующей ко-стимуляции/иммунной модуляции или хоминг рецептора. Опухолевым антигеном может быть, например, пептид, полученный из внутриклеточного или внеклеточного белка, экспрессируемого на клеточной поверхности в комплексе с основным комплексом гистосовместимости (МНС). В некоторых случаях фрагментом распознавания опухолей является $\alpha\beta$ TCR, и антиген представляет собой пептид, представленный опухолевой клеткой в комплексе с МНС. Антиген может представлять собой молекулу, полученную из клетки, которая находится в дистрессе, например раковой клетки, или из патогенов, таких как вирусы или внутриклеточные бактерии, которые реплицируются внутри клеток, или из патогенов или их продуктов, которые интернализуются из внеклеточной жидкости путем эндоцитоза. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка предназначена для экспрессии двух или более различных фрагментов распознавания опухолей, и каждый фрагмент распознавания опухолей предназначен для распознавания другого эпитопа одного и того же антигена. Универсальная модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка (клетки) может экспрессировать фрагменты распознавания опухолей, которые могут распознавать антиген с различными гаплотипами МНС. Фрагмент распознавания опухолей может содержать либо TCR ($\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ TCR), либо антитела, распознающие комплексы пептид-МНС. Например, для данного антигена различные фрагменты распознавания опухолей, либо TCR, либо антитела, могут распознавать одинаковые или различные антигенные пептиды в комплексе с различными HLA-гаплотипами.

[0032] Модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки при введении субъекту могут ослаблять или убивать клетку, экспрессирующую целевой антиген. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка (клетки) может быть введена человеку, нуждающемуся в лечении заболевания. В предпочтительном варианте реализации клетки вводят человеку, имеющему рак, и в

таких случаях клетки модифицированы для распознавания опухолевого антигена или другого антигена, связанного с болезнью. **ФИГ. 1** схематически иллюстрирует $\gamma\delta$ Т-клетки. **Панель А** иллюстрирует модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку, которая экспрессирует один фрагмент распознавания опухолей. **Панель В** иллюстрирует модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку, которая экспрессирует два фрагмента распознавания опухоли.

[0033] Фрагмент распознавания, кодируемый кассетой экспрессии, такой как рецептор химерного антигена (CAR), может быть целым антителом, фрагментом антитела, одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv), однодоменным антителом (sdAb), Fab, F(ab)₂, Fc, легкой или тяжелой цепями на антителе, вариабельным или константным фрагментом антитела или любой их комбинацией, которая связывается с антигеном опухоли на клеточной поверхности, пептидом, производным от опухолевого антигена, который экспрессируется на поверхности клетки в виде комплекса с МНС (комплекс пептид-МНС) или биспецифической конструкцией, содержащей два разных антитела, направленных к двум различным антигенам, различным эпитопам одного и того же антигена или опухолевому антигену и ко-стимулирующей/активирующей молекуле, иммуномодулирующей молекуле (молекулам) или хоминг рецептору (рецепторам). Антитела могут быть получены, например, из В-клеток человека, В-клеток мыши, В-клетки крысы или из клеточных линий гибридом. Клеточная линия гибридомы мыши может быть получена из иммунизированных мышей дикого типа или гуманизированных мышей, В-клетки крысы, гибридомной клетки крысы, выделенной из иммунизированного дикого типа или гуманизированных крыс, или из библиотек антител, полученных из человека, мыши, крысы, верблюда или ламы. Модифицированный фрагмент распознавания опухоли может представлять собой CAR, который распознает комплексы антигенов клеточной поверхности или пептида МНС-антигена. Модифицированный фрагмент распознавания опухолей может быть модифицированным $\alpha\beta$ TCR, который распознает опухолеспецифический антиген в комплексе с МНС класса I или II. Фрагментом распознавания также может быть $\gamma\delta$ TCR, который распознает опухолеспецифический антиген МНС-нерестригированным способом. Фрагментом распознавания опухолей может быть модифицированный TCR или CAR, который распознает антиген клеточной поверхности, комплекс пептид-МНС, углевод или липид.

[0034] Один, два или более фрагментов распознавания опухолей могут быть модифицированы для распознавания одинаковых или разных антигенов. Один, два или более фрагмента распознавания опухолей могут быть модифицированы для распознавания различных эпитопов одного и того же или разных антигенов. В некоторых случаях фрагментом распознавания опухолей является $\alpha\beta$ TCR, который экспрессируется экспрессионной кассетой, встроенной в геном $\gamma\delta$ Т-клетки. В некоторых случаях модифицированный $\alpha\beta$ TCR, который экспрессируется в модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетке, сконструированный для распознавания пептида или пептида mer (такого как 9-mer), полученного из антигена, который экспрессируется внутриклеточно или внеклеточно или на поверхности клетки опухолевой клеткой или другой больной клеткой. Внутриклеточные антигены могут быть получены, например, путем репликации вирусов и бактерий внутри инфицированной клетки или от собственных белков субъекта. Клетка субъекта может перерабатывать антиген в пептиды и представлять пептиды в комплексе с молекулами МНС класса I или II. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка (клетки) настоящего раскрытия могут быть предназначены для распознавания множества различных эпитопов множества различных внутриклеточных антигенов. Внеклеточные или экзогенные антигены, такие как бактерии, паразиты, вирусы или даже раковые клетки, могут быть фагоцитированы антигенпрезентирующими клетками, переработаны

в более мелкие фрагменты и представлены в комплексе с молекулами МНС класса II. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка (клетки) настоящего раскрытия может быть предназначена для распознавания множества различных эпитопов множества различных внеклеточных антигенов. В некоторых случаях фрагмент распознавания опухолей представляет собой $\gamma\delta$ TCR, который обеспечивает клетку новым распознаванием антигена. Кассета экспрессии может содержать, например, CAR, экспрессируя антитело или лиганд, который интегрируется в геном $\gamma\delta$ Т-клетки и экспрессируется ею же. В некоторых случаях фрагмент распознавания опухолей может представлять собой биспецифическую конструкцию, содержащую, например, антитело, TCR, антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, или любую их комбинацию. $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована из опухоль-инфильтрирующего лимфоцита (TIL), и/или фрагмент распознавания опухолей, который кодируется экспрессионной кассетой, может быть выделен из TIL. $\gamma\delta$ Т-клетка, которая модифицирована из TIL, может быть опухолевой специфической аллогенной клеткой, которая эффективно мигрирует, стремится в определенное местоположение и взаимодействует с микроокружением опухоли. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована из TIL, выделенных из определенных опухолей, таких как рак молочной железы, рак простаты, рак мочевого пузыря, рак толстой кишки и прямой кишки, рак мозга, рак желудка, рак головы и шеи, рак почки, рак легкого, рак поджелудочной железы, саркома, мезотелиома, рак яичника или меланома. Фрагмент распознавания опухолей может быть получен из синтетической библиотеки или фрагмент распознавания опухолей может быть получен из В-клеток, Т-клеток, выделенных, например, от лимфомы, лейкемии, множественной миеломы, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, толстой кишки и рака прямой кишки, рака мозга, рака желудка, рака головы и шеи, рака почки, рака легкого, рака поджелудочной железы, саркомы, мезотелиомы, антигена рака яичника или меланомы. В некоторых случаях фрагмент распознавания опухолей получен из опухоль-инфильтрирующего лимфоцита, выделенного из рака.

[0035] Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может дополнительно содержать Т-клеточный ко-стимулирующий/активационный домен. Активационный домен Т-клеток может быть получен из $\alpha\beta$ Т-клетки и/или $\gamma\delta$ Т-клетки. Например, модифицированный $\alpha\beta$ TCR может быть сконструирован таким образом, чтобы быть связанным либо с доменом $\gamma\delta$ ко-стимуляции/активации или доменом $\alpha\beta$ костимуляции/активации.

Неограничивающие примеры $\alpha\beta$ костимулирующих/активирующих доменов включают CD28, CD2, CTLA4, ICOS, PD-1, 4-1 BB (CD 137), OX40, CD27, HVEM. Неограничивающие примеры $\gamma\delta$ костимулирующих/активирующих доменов включают CD28, CD2, ICOS, JAMAL, CD27, CD30, OX40, NKG2D, CD46. Фрагмент распознавания опухолей может быть связан с доменом активации Т-клеток или любым другим подходящим доменом активации. Домен активации Т-клеток может представлять собой CD3 ζ домен, CD28 домен или другой подходящий домен активации, включая CD2, ICOS, 4-1 BB (CD 137), OX40 (CD 134), CD27, CD30, CD46, CD70, CD80, CD86, DAP, CD122, CTLA4, CD152, PD-1, JAMAL, NKG2D, CD314 и/или Fc ϵ R1g. Трансмембранные домены могут включать, например, родственные домены CD28, CD4, CD3 ϵ , CD16 и иммуноглобулины.

[0036] Изобретение, раскрытое в настоящем документе, предпочтительно предусматривает модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку, которая экспрессирует экспрессионную кассету, которая кодирует распознающую молекулу. В некоторых случаях последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую экспрессионной кассете, клонируют и стабильно встраивают в геном модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки.

Последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая экспрессионную кассету, которая может включать фрагмент распознавания опухоли и соответствующие области активации, может быть синтетически модифицирована и стабильно встроена в геном модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки. Два или более различных фрагмента распознавания
 5 опухолей могут быть экспрессированы из одной и той же или из другой экспрессионной кассеты.

[0037] Для модифицирования таких клеток можно использовать множество методов. Например, клонированная или синтетически модифицированная ДНК может быть вставлена, заменена или удалена с целью создания модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки
 10 методами редактирования генома с модифицированными нуклеазами, такими как: а) система CRISPR/Cas; б) эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN); с) нуклеазы цинковые пальцы (ZFN); d) и модифицированные хоминг эндонуклеазы мегануклеаз. Система транспозонов «спящей красавицы» может также использоваться для переноса нуклеиновой кислоты, содержащей код фрагмента
 15 распознавания опухоли для создания модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки. Различные другие способы доставки полинуклеотидов, известные в данной области, могут быть пригодны для модифицирования $\gamma\delta$ Т-клеток, такие как трансфекция, электропорация, трансдукция, липофекция, наномодифицированные вещества, такие как Orgmosil, способы вирусной доставки, включая аденовирусы, ретровирусы, лентивирусы, аденоассоциированные
 20 вирусы или другой подходящий метод.

[0038] В некоторых случаях фрагмент распознавания получен из одного или нескольких видов, например полинуклеотидная последовательность фрагмента распознавания может быть получена, например, от человека (*Homo sapiens*), мыши (например, *Mus musculus*), крысы (например, *Rattus norvegicus* или *Rattus rattus*), верблюда
 25 (например, *Camelus dromedarius* или *Camelus bactrianus*) или ламы (*Lama vicugna*) или полинуклеотидная последовательность фрагмента распознавания может быть химерной комбинацией обоих. Фрагмент распознавания опухоли предпочтительно получают из человека, но в некоторых случаях он может быть получен из мыши или других видов, предпочтительно млекопитающих. В некоторых случаях фрагмент распознавания
 30 опухолей представляет собой химерный рецептор TCR или химерный CAR. В некоторых случаях полинуклеотидная последовательность фрагмента распознавания опухолей, полученного из вида не человека, модифицирована таким образом, чтобы увеличить его сходство с полинуклеотидной последовательностью из человеческого вида, тем самым «гуманизировав» фрагмент распознавания опухолей. В некоторых случаях вид,
 35 такой как мышь и крыса, является «гуманизированным», чтобы обеспечить, например, гуманизированные антитела и TCR.

[0039] Фрагмент распознавания опухоли предпочтительно конститутивно экспрессируется из экспрессионной кассеты в модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетке. В некоторых случаях фрагмент распознавания опухолей находится под экспрессией
 40 индуцибельной экспрессирующей системы, такой как система экспрессии млекопитающих T-REx™, регулируемая тетрациклином, подходящая система экспрессии Tet-on/Tet-off или другая подходящая система. В одном конкретном случае модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка происходит от человеческой V δ 1+Т-клетки, человеческой V δ 2+Т-клетки, человеческой V δ 3+Т-клетки, человеческой CD3+Т-клетки или человеческой CD3⁺ Т-клетки.
 45

[0040] Настоящее раскрытие предусматривает способы и модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку (клетки), которые экспрессируют фрагмент распознавания опухолей из кассеты экспрессии, которая может обнаруживать и нацеливать специфические антигены у

субъекта *in vivo*. Субъект может быть субъектом, нуждающимся в лечении терапевтическим средством, которое может распознавать и убивать или ослаблять клетку (клетки), экспрессирующую специфический антиген эффективным и селективным образом. В предпочтительных случаях антиген ассоциирован с раком. Антиген может быть специфичным к опухолевой линии антигеном. В одном варианте реализации антиген представляет собой опухолевый антиген, такой как CD19, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, альфафетопроtein (AFP), карциноэмбриональный антиген CEA), CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, PLIF, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, glycolipidF77, белок, активирующий фибробласты, PSMA, STEAP-1, STEAP -2, мезотелин, c-met, CSPG4, нектин-4, VEGFR2, PSCA, белок/рецептор, связывающий фолат, SLC44A4, Cripto, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, SLTRK6, gp100, MART1, тирозиназа, SSX2, SSX4, NYESO-1, эпителиальный опухолевый антиген (ETA), гены семейства MAGEA (такие как MAGE3A, MAGE4A), KKLC1, мутированный *gas*, β Raf, p53, молекула A, связанная с цепью MHC класса I (MICA), молекула B, связанная с цепью MHC класса I (MICB), HPV или CMV.

[0041] Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть аутологичной или аллогенной по отношению к MHC локусам субъекта. Например, аутологическая и аллогенная трансплантация костного мозга (BMT) используется как терапия для некоторых состояний, особенно гематологических злокачественных новообразований. Тем не менее, острое заболевание «трансплантат против хозяина» (GVHD) и болезнь «хозяин против трансплантата» (HVGD) остается наиболее серьезным осложнением BMT для аллогенной BMT.

[0042] Донорные Т-клетки и антиген-презентирующие клетки хозяина (АПК) являются критическими для индукции GVHD. Потому как $\gamma\delta$ Т-клетки не распознают молекулы MHC из организма хозяина, распознавание антигена модифицированной $\gamma\delta$ Т-клеткой по настоящему изобретению не может спровоцировать GVHD. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть модифицирована таким образом, чтобы вводиться неаутологичному субъекту без провоцирования заболевания «трансплантат против хозяина». Кроме того, модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована таким образом, чтобы не экспрессировать ген из одного или нескольких локусов MHC. Альтернативно, $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована с отсутствием одного или нескольких локусов MHC (локусов). Удаление локусов MHC или нарушение экспрессии гена в модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетке может быть достигнуто с помощью технологий редактирования генов, таких как нуклеазы цинковые пальцевые (ZFN), нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), CRISPR и модифицированные мегануклеазы или с помощью делеции β 2m. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия модифицирована таким образом, что отсутствует или нарушается экспрессия генов нескольких локусов MHC. В других случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка модифицирована таким образом, что у нее отсутствует или нарушается экспрессия гена по меньшей мере в одном локусе MHC класса I, по меньшей мере, одном локусе MHC класса II или обоих. Удаление одного или нескольких локусов MHC может обеспечить модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку, которая является универсальным донором для любого субъекта с любым гаплотипом MHC без инициирования заболевания «хозяин против трансплантата», тем самым обеспечивая модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку, которая может размножаться, сохраняться, расширяться и функционировать внутри хозяина, не будучи нацеленной на иммунную систему хозяина.

[0043] Принципы и композиции, описанные в данном документе, могут использоваться во множестве разнообразных применений. В предпочтительных вариантах реализации опухолевый антиген представляет собой антиген рака молочной железы, антиген рака предстательной железы, антиген рака мочевого пузыря, антиген рака толстой кишки и прямой кишки, антиген рака мозга, антиген рака желудка, антиген рака головы и шеи, антиген рака почки, антиген рака легкого, антиген рака поджелудочной железы, антиген саркомы, антиген мезотелиомы, антиген рака яичников или антиген меланомы. В таких случаях фрагмент распознавания опухолей может быть модифицированным $\alpha\beta$ TCR или антителом, которое предназначено для распознавания эпитопа, полученного из внутриклеточного или внеклеточного опухолевого антигена, представленного на поверхности опухолевой клетки в комплексе с МНС класса I или II класса.

Модифицированный $\alpha\beta$ TCR может распознавать внутриклеточный опухолевый антиген, который презентуется опухолью или АПК, например, в контексте комплекса HLA-A, HLA-B или HLA-C или в контексте HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-DM, HLA-DO или другой молекулы HLA.

[0044] В некоторых случаях антиген является аутоантигеном. Аутоантиген может быть, например, иммуноглобулином, рецептором Т-клеток, внутриклеточным опухолевым антигеном, внеклеточным опухолевым антигеном, молекулой МНС или внеклеточным фрагментом, связанным с состоянием. Например, клеточная экспрессия человеческого HLA DR2 связана с системной волчанкой и рассеянным склерозом, а клеточная экспрессия человеческого HLA DR4 связана с ревматоидным артритом и сахарным диабетом.

[0045] В других случаях антиген является чужеродным антигеном. Чужеродным антигеном может быть, например, вирус, бактерии, простейшие или аллерген, такой как пыльца или пища. Чужеродный антиген может быть связан, например, с инфекционным заболеванием, аутоиммунным нарушением или с повреждением ткани.

[0046] Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть модифицирована таким образом, чтобы она направлялась в специфическое физическое местоположение в теле субъекта и, следовательно, была нацелена на антиген в конкретном участке ткани, органа или тела. Эндогенные Т-клетки имеют определенный спектр переносчиков лигандов и рецепторов, которые влияют на их паттерны миграции. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть модифицирована таким образом, чтобы экспрессировать из кассеты экспрессии, содержащей фрагмент распознавания опухоли, или из отдельной экспрессионной кассеты, один или несколько лигандов переноса или рецептор (рецепторы), которые управляют миграцией модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки к определенному участку ткани, органа или тела.

[0047] Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может представлять собой опухолеспецифическую аллогенную клетку. Например, модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть получена из немодифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки, которая представляет собой опухоль-инфильтрирующий лимфоцит (TIL), выделенный из опухоли. Различные TIL могут быть выделены из разных типов опухолей. Кассета экспрессии, кодирующая фрагмент распознавания опухоли и домен активации или другой модифицированный признак, может быть встроена в геном TIL, выделенного из различных опухолей. Такие $\gamma\delta$ Т-клетки могут инфильтрировать солидные опухоли, ослаблять и убивать опухолевые клетки, экспрессирующие один или несколько целевых антигенов, и они могут обеспечить эффективное лечение различных злокачественных новообразований. Опухоль-специфическая аллогенная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована таким образом, чтобы экспрессировать по меньшей мере один

фрагмент распознавания опухоли, который распознает эпитоп выбора. В некоторых случаях опухоль-специфическая аллогенная $\gamma\delta$ Т-клетка предназначена для экспрессии, по меньшей мере, двух различных фрагментов распознавания опухолей, и каждый различный фрагмент распознавания опухолей предназначен для распознавания различного эпитопа одного и того же антигена, различных антигенов, антигена и рецептора (рецепторов) активирующей или инактивирующей ко-стимуляции/иммунной модуляции, антигена в комплексе с молекулой МНС или хоминг рецептора.

[0048] В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия предназначена для экспрессии специфических аллелей цепей рецепторов TCR δ и TCR γ . Специфические аллели цепей рецепторов TCR δ и TCR γ модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки могут направлять миграцию, или хоминг, модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки к одному или нескольким физическим местоположениям в теле субъекта. Например, у людей, $\gamma\delta$ Т-клетки, экспрессирующие V δ 1+TCR преимущественно ограничены, и стремятся к, эпителиальным или ассоциированным с эпителиальными/слизистыми тканями кожи, дыхательных путей, пищеварительного и урогенитального тракта и несколькими внутренними органами. Человеческие $\gamma\delta$ Т-клетки, экспрессирующие V δ 3+TCR, обильно представлены в печени. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть конститутивно активирована. В Т-клетках дикого типа TCR существуют как комплекс из нескольких белков, которые включают CD3-белки, такие как CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$, а также ζ -цепочки (CD3) ζ гомодимер). Некоторое количество мотивов активации иммунорецепторов на основе тирозина (ITAM) на ζ -цепях могут быть фосфорилированы для того, чтобы генерировать сигнал активации на Т-лимфоцитах. В отличие от α/β TCR CD8 и CD4 клеток, которые активируются, когда они распознают специфические антигены, связанные с молекулами МНС класса I или класса II, соответственно, $\gamma\delta$ Т-клетки активируются путем распознавания антигенов непосредственно МНС-нерестригированным способом. Такие антигены включают антигены, экспрессируемые опухолевыми клетками, такие как молекулы А и В, связанные с цепью МНС класса I (MICA и MICB), CD1, NKG2A, ULBP1-3, липиды и фосфоантигены. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть модифицирована таким образом, чтобы быть конститутивно активной. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия модифицирована таким образом, чтобы содержать фрагмент распознавания опухоли и активационный фрагмент. Активационный фрагмент может представлять собой белок в комплексе TCR-CD3. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия конститутивно экспрессирует генетически модифицированный CD3 ζ ген, в котором мотив активации иммунорецепторов на основе тирозина гена CD3 ζ модифицирован так, чтобы он содержал фосфомиметик гена тирозина в мотиве YxxL/I. Различные домены активации Т-клеток и трансмембранные домены, такие как CD3 ζ , CD28, CD2, ICOS, 4-1 BB (CD 137), OX40 (CD134), CD27, CD70, CD80, CD86, DAP, CD122, Fc ϵ RIg, CD4, CD3 ϵ , JAMAL, NKG2D или CD16 могут быть модифицированы таким образом, чтобы, например, содержать фосфомиметическую или другую мутацию нуклеиновой кислоты.

[0049] Дополнительно в данном документе раскрыт способ для *in vitro* (*ex vivo*) размножения модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки настоящего раскрытия. В некоторых случаях модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку можно размножать *ex vivo* без стимуляции антигенпрезентирующей клеткой или аминокислотом (аминокислотами). Модифицированная антигенная реактивная Т-клетка настоящего раскрытия может быть размножена *ex vivo* и *in vivo*. В некоторых случаях активная популяция

модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток настоящего раскрытия может быть размножена *ex vivo* без антигенной стимуляции антигенпрезентирующей клеткой, антигенным пептидом, непептидной молекулой или небольшим молекулярным соединением, таким как аминокислота (аминокислоты), но с использованием определенных антител, цитокинов, митогенов или слитых белков, таких как гибриды Fc IL-17, гибриды MICA Fc и гибриды CD70 Fc. Примеры антител, которые могут быть использованы при размножении $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции включают анти-CD3, анти-CD27, анти-CD30, анти-CD70, анти-OX40, анти-NKG2D или анти-CD2 антитела, примеры цитокинов включают IL-2, IL-15, IL-12 или IL-21, IL-18, IL-9, IL-7, IL-33 и примеры митогенов включают CD70 лиганд для CD27 человека, фитогемагглютинин (PHA), конвавалин А (ConA), митоген фитолакки (PWM) белок агглютинин арахиса (PBA), агглютинин сои (SBA), агглютинин *les culinaris* (LCA), агглютинин *pisum sativum* (PSA), агглютинин *Helix pomatia* (HPA), лектин *Vicia graminea* (VGA) или другой подходящий митоген, способный стимулировать пролиферацию Т-клеток. В некоторых случаях популяцию модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток можно размножить менее чем за 60 дней, менее чем за 48 дней, 36 дней, менее чем за 24 дня, менее чем за 12 дней или менее чем за 6 дней.

[0050] Дополнительно в данном документе раскрыт способ для лечения различных состояний с помощью модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки (клеток) настоящего раскрытия. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть использована для лечения субъекта, нуждающегося в лечении патологического состояния. Патологическим состоянием может быть рак, такой как рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак легкого, рак предстательной железы, рак печени, рак кожи, рак толстой кишки и прямой кишки, лимфома, лейкоз, множественная миелома, рак яичников, саркома, рак головы и шеи, мезотелиома, рак мозга, саркома или другой рак. Патологическим состоянием может быть инфекционное заболевание, аутоиммунное расстройство, трансплантация или сепсис. Также в данном документе раскрыт способ снабжения субъекта модифицированной $\gamma\delta$ Т-клеткой. В некоторых случаях модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку можно вводить субъекту, страдающему от патологического состояния. В некоторых случаях модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку можно вводить субъекту во время процедуры, такой как трансплантация костного мозга. Дополнительно раскрывается способ введения модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки субъекту без совместного введения регуляторного цитокина, такого как IL-2. В некоторых случаях $\gamma\delta$ Т-клетка модифицирована таким образом, чтобы экспрессировать один или несколько цитокинов или гормонов, которые могут усиливать их пролиферацию, выживание и функционирование при размножении *ex vivo* и введении *in vivo*, таких как IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, IL-12, IL-18, IL-9. $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована таким образом, чтобы экспрессировать еще одни цитокины или гормоны из той же самой или из другой экспрессирующей кассеты, содержащей фрагмент распознавания. Цитокины включают хемокины, интерфероны, интерлейкины и факторы некроза опухоли. Неограничивающие примеры цитокинов включают IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, IL-12, IL-18, IL-9, эритропоэтин (EPO), G-CSF, GM-CSF, тромбопоэтин (TPO) и члены подсемейства интерферона (IFN).

[0051] В некоторых случаях модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку можно вводить субъекту в виде комбинированной терапии. В некоторых случаях комбинированная терапия включает: а) модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку настоящего раскрытия; и б) иммуно-контрольную терапию.

Модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки

[0052] Модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть созданы различными способами, известными в данной области техники. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть

сконструирована таким образом, чтобы стабильно экспрессировать конкретный фрагмент распознавания опухоли. Полинуклеотид, кодирующий экспрессионную кассету, которая содержит фрагмент распознавания опухолей или другой тип фрагмента распознавания, может быть стабильно введен в $\gamma\delta$ Т-клетку с помощью системы транспозона/транспозазы или системы передачи гена на основе вируса, такой как система лентивируса или ретровируса, или другого подходящего способа, такого как трансфекция, электропорация, трансдукция, липофекция, фосфат кальция (CaPO_4), наноинженерные вещества, такие как Ormosil, способы вирусной доставки, включая аденовирусы, ретровирусы, лентивирусы, аденоассоциированные вирусы или другим подходящим методом. Антигенспецифический TCR, либо $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$, могут быть введены в $\gamma\delta$ Т-клетку путем стабильной вставки полинуклеотида, содержащего генетический код антигенспецифического TCR, в геном $\gamma\delta$ Т-клетки. Полинуклеотид, кодирующий CAR с фрагментом распознавания опухолей, может быть введен в модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку путем стабильной вставки полинуклеотида в геном $\gamma\delta$ Т-клетки. В некоторых случаях модифицированный фрагмент распознавания опухолей представляет собой модифицированный Т-клеточный рецептор, а экспрессионная кассета, встроенная в геном модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки, содержит полинуклеотид, кодирующий модифицированный ген TCR α (TCR альфа), модифицированный ген TCR β (TCR бета), ген TCR δ (TCR дельта), или модифицированный ген TCR γ (TCR гамма). В некоторых случаях экспрессионная кассета, встроенная в геном модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки, содержит полинуклеотид, кодирующий фрагмент антитела или его антигенсвязывающую часть. В некоторых случаях фрагмент антитела или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полинуклеотид, кодирующий целое антитело, фрагмент антитела, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), однодоменное антитело (sdAb), Fab, F(ab)₂, Fc, легкую или тяжелую цепи антитела, вариабельную или константную область антитела или любую их комбинацию, которая связывается с клеточным поверхностным антигеном опухоли как часть конструкции рецептора химерного антигенного (CAR), или биспецифическую конструкцию, содержащую CAR и Т-клеточный рецептор (TCR) или CAR с антителами, направленными на разные антигены. В некоторых случаях полинуклеотид получают из человека или из другого вида. Фрагмент антитела или антигенсвязывающего фрагмент полинуклеотида, который получен из видов, отличных от человека, может быть модифицирован для увеличения их сходства с вариантами антител, продуцируемых естественным образом у людей, и фрагмент антитела или антигенсвязывающий фрагмент может быть частично или полностью гуманизирован. Фрагмент антитела или антигенсвязывающий фрагмент полинуклеотида также может быть химерным, например химерой мышино-человеческого антитела. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка, которая экспрессирует CAR, также может быть модифицирована для экспрессии лиганда к антигену, который распознается фрагментом распознавания опухолей.

[0053] Различные способы, известные в данной области, могут быть использованы для введения клонированной или синтетически модифицированной нуклеиновой кислоты, содержащей генетический код для фрагмента распознавания опухоли в конкретное место в пределах генома модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки. РНК-направляемая нуклеаза Cas9 из микробной системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), нуклеазы цинковые пальцы (ZFN), нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN) и мегануклеазные технологии, как описано, соответственно, в WO 201409370, WO 2003087341, WO 2014134412 и WO 2011090804, каждый из которых полностью включен в настоящее описание путем

ссылки, могут быть использованы для обеспечения эффективной генной модификации в $\gamma\delta$ Т-клетке (клетках). Описанные в данном документе технологии также могут быть использованы для вставки кассеты экспрессии в геномное положение, которое одновременно предусматривает нокаут одного гена и нокин другого гена.

5 Например, полинуклеотид, содержащий экспрессионную кассету настоящего раскрытия, может быть встроен в геномную область, которая кодирует ген МНС. Такая модификация может одновременно обеспечивать нокин в одном или более генах, например, генах, входящих в состав экспрессионной кассеты, и нокаут другого гена, например локуса МНС.

10 [0054] В одном случае транспозон «спящей красавицы», который включает нуклеиновую кислоту, кодирующую фрагмент распознавания опухолей, вводится в $\gamma\delta$ Т-клетку, которая модифицируется. Транспозаза мутантной «спящей красавицы», которая предусматривает улучшенную интеграцию по сравнению с диким типом «спящей красавицы», такая как транспозаза, описанная в патенте США № 7985739, которая
15 включена в данном документе в виде ссылки во всей своей полноте, может быть использована для введения полинуклеотида в модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку.

[0055] В некоторых случаях вирусный метод используется для введения полинуклеотида, содержащего фрагмент распознавания опухоли, в геном модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки. Некоторое количество вирусных методов было
20 использован для генной терапии человека, таких как способы, описанные в WO 1993020221, который включен в данном документе во всей своей полноте. Неограничивающие примеры вирусных методов, которые могут быть использованы для модификации $\gamma\delta$ Т-клетки, включают ретровирусный, аденовирусный, лентивирусный методы, метод вируса простого герпеса, вируса осповакцины, вируса
25 оспы или вирусные методы, связанные с аденовирусом.

[0056] Полинуклеотид, содержащий генетический код для фрагмента распознавания опухолей, может содержать мутации или другие трансгены, которые влияют на рост, пролиферацию, активационный статус модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки или антиген, специфичный к опухолевым клеткам, такой как специфичные для яичка раковые
30 антигены. $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть модифицирована для экспрессии полинуклеотида, содержащего домен активации, который связан с фрагментом распознавания антигена, таким как молекула в комплексе TCR-CD3 или ко-стимулирующий фактор. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может экспрессировать внутриклеточный сигнальный домен, который является активационным доменом Т-лимфоцитов. $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована для экспрессии гена
35 внутриклеточного домена активации или внутриклеточного сигнального домена. Геном внутриклеточного сигнального домена может быть, например, CD3 ζ , CD28, CD2, ICOS, JAMAL, CD27, CD30, OX40, NKG2D, CD4, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, Fc ϵ RI γ , ILRB/CD 122, IL-2RG/CD132, молекулы DAP, CD70, рецептор цитокинов, CD40 или любая их
40 комбинацию. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка также модифицирована для экспрессии цитокина, антигена, клеточного рецептора или другой иммуномодулирующей молекулы.

[0057] Подходящий фрагмент распознавания опухоли, который должен быть экспрессирован в модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетке может быть выбран на основе
45 заболевания, подлежащего лечению. Например, в некоторых случаях фрагмент распознавания опухолей представляет собой TCR. В некоторых случаях фрагмент распознавания опухолей является рецептором лиганда, который экспрессируется на раковой клетке. Неограничивающие примеры подходящих рецепторов включают

NKG2D, NKG2A, NKG2C, NKG2F, LIT1, AICL, CD26, NKRP1, NKp30, NKp44, NKp46, CD244 (2B4), DNAM-1 и NKp80. В некоторых случаях фрагмент распознавания опухолей может включать лиганд, например лиганд IL-13, или лиганд, имитирующий опухолевый антиген, такой как IL-13, имитирующий IL13R.

- 5 [0058] $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована таким образом, чтобы экспрессировать химерный фрагмент распознавания опухоли, содержащий лиганд-связывающий домен, полученный из NKG2D, NKG2A, NKG2C, NKG2F, LIT1, AICL, CD26, NKRP1, NKp30, NKp44, NKp46, CD244 (2B4), DNAM-1, NKp80 или
- 10 противоопухолевое антитело, такое как анти-Her2neu или анти-EGFR, и сигнальный домен, полученный из CD3- ζ , Dap 10, CD28, 4 IBB и CD40L. В некоторых примерах химерный рецептор связывает MICA, MICB, Her2neu, EGFR, мезотелин, CD38, CD20, CD19, PSA, RON, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, альфафетопротейн (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, PLIF, Her2/Neu,
- 15 EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, гликолипид F77, белок, активирующий фибробласты, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, c-met, CSPG4, Nectin-4, VEGFR2, PSCA, белок/рецептор, связывающий фолат, SLC44A4, Cripto, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, SLTRK6, gp100, MART1, тирозиназу, SSX2, SSX4, NYESO-1, эпителиальный опухолевый антиген (ETA), гены семейства MAGEA (такие как MAGE3A, MAGE4A), KKL1, мутированный ras, β Raf,
- 20 p53, молекулу A, связанную с цепью МНС класса I (MICA) или молекулу B, связанную с цепью МНС класса I (MICB), HPV, CMV.

- [0059] Два или более фрагмента распознавания опухолей могут быть экспрессированы в $\gamma\delta$ Т-клетке из генетически различных, практически отличающихся или практически идентичных, $\alpha\beta$ TCR полинуклеотидов стабильно экспрессирующихся из
- 25 модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки или генетически отличных $\alpha\beta$ TCR полинуклеотидов стабильно встроенных в модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку. В случае генетически отличных $\alpha\beta$ TCR, могут быть использованы $\alpha\beta$ TCR, распознающие различные антигены, связанные с одним и тем же патологическим состоянием. В одном предпочтительном варианте реализации изобретения $\gamma\delta$ Т-клетка модифицирована таким образом, чтобы
- 30 экспрессировать различные TCR, человеческого или мышинного происхождения, от одной или более экспрессионных кассет, которые распознают один и тот же антиген в контексте разных гаплотипов МНС. В другом предпочтительном варианте реализации $\gamma\delta$ Т-клетка модифицирована таким образом, чтобы экспрессировать один TCR и два или более антитела, направленные к тем же или различным пептидам из данного
- 35 антигена в комплексе с различными гаплотипами МНС. В некоторых случаях экспрессия одного TCR модифицированной $\gamma\delta$ Т-клеткой способствует правильному спариванию TCR. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка, которая экспрессирует различные TCR, может обеспечить универсальную аллогенную модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку. Во втором предпочтительном варианте реализации изобретения $\gamma\delta$ Т-клетка модифицирована
- 40 таким образом, чтобы экспрессировать одно или несколько различных антител, направленных к комплексам пептид-МНС, каждый из которых направлен на один и тот же или другой пептид, образованный в комплексе с одинаковыми или разными гаплотипами МНС. В некоторых случаях фрагментом распознавания опухолей может быть антитело, которое связывается с комплексами пептид-МНС.

- 45 [0060] $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована таким образом, чтобы экспрессировать TCR из одной или нескольких экспрессионных кассет, которые распознают один и тот же антиген в контексте разных гаплотипов МНС. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка предназначена для экспрессии одного TCR или

TCR в сочетании с CAR, чтобы свести к минимуму вероятность ошибочного спаривания TCR в пределах модифицированной клетки. Фрагменты распознавания опухолей, экспрессируемые из двух или более экспрессионных кассет, предпочтительно имеют разные полинуклеотидные последовательности и кодируют фрагменты распознавания

опухолей, которые распознают различные эпитопы одной и той же мишени. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка, которая экспрессирует такие различные TCR или CAR, может обеспечить универсальную аллогенную модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку.

[0061] В некоторых случаях $\gamma\delta$ Т-клетка модифицирована таким образом, чтобы экспрессировать один или несколько фрагментов распознавания опухолей. Два или более фрагмента распознавания опухолей могут быть экспрессированы из генетически идентичных или практически идентичных антигенспецифических химерных (CAR) полинуклеотидов модифицированных в $\gamma\delta$ Т-клетке. Два или более фрагмента распознавания опухолей могут быть экспрессированы из генетически различных CAR полинуклеотидов модифицированных в $\gamma\delta$ Т-клетке. Генетически различные CAR могут быть предназначены для распознавания различных антигенов, связанных с одним и тем же патологическим состоянием.

[0062] $\gamma\delta$ Т-клетка может альтернативно быть биспецифичной. Биспецифичная модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может экспрессировать два или более фрагмента распознавания опухолей. Биспецифичная модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может экспрессировать как TCR, так и CAR фрагменты распознавания опухолей. Биспецифичная модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть сконструирована для распознавания различных антигенов, связанных с одним и тем же патологическим состоянием. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может экспрессировать два или более CAR/TCR биспецифических полинуклеотида, которые распознают идентичный или практически идентичный антиген. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может экспрессировать две или более CAR/TCR биспецифические конструкции, которые распознают различные антигены. В некоторых случаях биспецифическая конструкция настоящего раскрытия связывается с активирующим и инактивирующим доменом клетки-мишени, тем самым обеспечивая повышенную целевую специфичность. $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована таким образом, чтобы экспрессировать, по меньшей мере, 1 фрагмент распознавания опухолей, по меньшей мере 2 фрагмента распознавания опухолей, по меньшей мере 3 фрагмента распознавания опухолей, по меньшей мере 4 фрагмента распознавания опухолей, по меньшей мере 5 фрагментов распознавания опухолей, по меньшей мере 6 фрагментов распознавания опухолей, по меньшей мере, 7 фрагментов распознавания опухолей, по меньшей мере 8 фрагментов распознавания опухолей, по меньшей мере 9 фрагментов распознавания опухолей, по меньшей мере 10 фрагментов распознавания опухолей, по меньшей мере 11 фрагментов распознавания опухолей, по меньшей мере 12 фрагментов распознавания опухолей или другое подходящее число фрагментов распознавания опухолей.

[0063] Надлежащая функция TCR может быть усилена за счет двух функционирующих ζ (дзета) белков, содержащих IT-AM мотивы. Надлежащая функция TCR также может быть усилена выражением $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ активационных доменов, таких как CD28, CD2, CTLA4, ICOS, JAMAL, PD-1, CD27, CD30, 41-BB, OX40, NKG2D, HVEM или CD46.

Экспрессирующийся полинуклеотид может включать генетический код для фрагмента распознавания опухоли, линкерного фрагмента и активационного домена. Трансляция полинуклеотида модифицированной $\gamma\delta$ Т-клеткой может обеспечивать фрагмент распознавания опухоли и домен активации, связанный белковым линкером. Часто линкер содержит аминокислоты, которые не препятствуют складыванию фрагмента

распознавания опухоли и активационного домена. Молекула линкера может составлять, по меньшей мере, около 5 аминокислот, около 6 аминокислот, около 7 аминокислот, около 8 аминокислот, около 9 аминокислот, около 10 аминокислот, около 11 аминокислот, около 12 аминокислот, около 13 аминокислот, около 14 аминокислот, около 15 аминокислот, около 16 аминокислот, около 17 аминокислот, около 18 аминокислот, около 19 аминокислот или около 20 аминокислот в длину. В некоторых случаях по меньшей мере 50%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 90% аминокислот в линкере представляют собой серин или глицин.

В некоторых случаях домен активации может содержать одну или более мутаций.

Подходящими мутациями могут быть, например, мутации, которые делают активационный домен конститутивно активным. Изменение идентичности одной или нескольких нуклеиновых кислот изменяет аминокислотную последовательность транслированной аминокислоты. Мутация нуклеиновой кислоты может быть произведена таким образом, что закодированная аминокислота модифицирована до полярной, неполярной, основной или кислой аминокислоты. Мутация нуклеиновой кислоты может быть произведена таким образом, что фрагмент распознавания опухоли оптимизирован для распознавания эпитопа из опухоли. Модифицированный фрагмент распознавания опухоли, модифицированный домен активации или другой модифицированный компонент $\gamma\delta$ Т-клетки может включать мутацию более 1

аминокислоты, 2 аминокислотные мутации, 3 аминокислотные мутации, 4 аминокислотных мутаций, 5 аминокислотных мутаций, 6 аминокислотных мутаций, 7 аминокислотных мутаций, 8 аминокислотных мутаций, 9 аминокислотных мутаций, 10 аминокислотных мутаций, 11 аминокислотных мутаций, 12 аминокислотных мутаций, 13 аминокислотных мутаций, 14 аминокислотных мутаций, 15 аминокислотных мутаций, 16 аминокислотных мутаций, 17 аминокислотных мутаций, 18 аминокислотных мутаций, 19 аминокислотных мутаций, 20 аминокислотных мутаций, 21 аминокислотную мутацию, 22 аминокислотные мутации, 23 аминокислотные мутации, 24 аминокислотных мутаций, 25 аминокислотных мутаций, 26 аминокислотных мутаций, 27 аминокислотных мутаций, 28 аминокислотных мутаций, 29 аминокислотных мутаций, 30 аминокислотных мутаций, 31 аминокислотную мутацию, 32 аминокислотные мутации, 33 аминокислотные мутации, 34 аминокислотные мутации, 35 аминокислотных мутаций, 36 аминокислотных мутаций, 37 аминокислотных мутаций, 38 аминокислотных мутаций, 39 аминокислотных мутаций, 40 аминокислотных мутаций, 41 аминокислотную мутацию, 42 аминокислотные мутации, 43 аминокислотные мутации, 44 аминокислотных мутаций, 45 аминокислотных мутаций, 46 аминокислотных мутаций, 47 аминокислотных мутаций, 48 аминокислотных мутаций, 49 аминокислотных мутаций или 50 аминокислотных мутаций.

[0065] В некоторых случаях $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия не экспрессирует одну или более молекул МНС. Удаление одного или нескольких локусов МНС в модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетке может снизить вероятность того, что модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка будет распознаваться иммунной системой хозяина. Человеческий локус главного комплекса гистосовместимости (МНС), известный как система человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), включает большое семейство генов, которое экспрессируется в антигенпрезентирующих клетках, включая $\gamma\delta$ Т-клетки. Молекулы HLA-A, HLA-B и HLA-C функционируют так, чтобы представить внутриклеточные пептиды в качестве антигенов к антигенпредставляющим клеткам. Молекулы HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ и HLA DR функционируют так, чтобы представить внеклеточные пептиды в качестве антигенов к антигенпредставляющим клеткам. Некоторые аллели генов HLA связаны с GVHD, аутоиммунными нарушениями

и раком. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка, описанная в данном документе, может быть дополнительно модифицирована таким образом, что генная экспрессия одного или нескольких генов HLA отсутствует или нарушена. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка, описанная в данном документе, может быть дополнительно модифицирована таким образом, что экспрессия гена одного или нескольких компонентов комплекса МНС отсутствует или нарушена, таким как полная делеция одного или нескольких генов МНС, делеция специфических экзонов или делеция β_2 микроглобулина (B2m).

Генетическая эксцизия или генетический разрыв по меньшей мере одного гена HLA может обеспечивать клинически терапевтическую $\gamma\delta$ Т-клетку, которую можно вводить субъекту с любым гаплотипом HLA, не вызывая заболевания «хозяина против трансплантата». Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка, как описано в данном документе, может быть универсальным донором для человека с любым гаплотипом HLA.

[0066] $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована с отсутствием одного или разных локусов HLA. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована с отсутствием аллеля HLA-A, аллеля HLA-B, аллеля HLA-C, аллеля HLA-DR, аллеля HLA-DQ или аллеля HLA-DP. В некоторых случаях аллель HLA ассоциируется с патологическим состоянием человека, таким как аутоиммунное заболевание. Например, аллель HLA-B27 связан с артритом и увеитом, аллель HLA-DR2 связан с системной красной волчанкой, аллель HLA-DR3 связан с дефицитом 21-гидроксилазы, HLA-DR4 С связан с ревматоидным артритом и диабетом 1 типа. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка, которая не имеет, например, аллеля HLA-B27, может вводиться субъекту, страдающему артритом, без того, чтобы быть легко распознанной иммунной системой субъекта. В некоторых случаях делеция одного или нескольких локусов HLA предусматривает модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку, которая является универсальным донором для любого субъекта с любым гаплотипом HLA.

[0067] В некоторых случаях для модификации $\gamma\delta$ Т-клетки необходимо удаление части $\gamma\delta$ Т-клеточного генома. В некоторых случаях удаленная часть генома содержит часть локуса МНС (локусов). В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка происходит от человеческой $\gamma\delta$ Т-клетки дикого типа, а локус МНС является локусом HLA. В некоторых случаях удаленная часть генома содержит часть гена, соответствующего белку в МНС-комплексе. В некоторых случаях удаленная часть генома содержит ген β 2 микроглобулина. В некоторых случаях удаленная часть генома содержит ген иммунной контрольной точки, такой как PD-1, CTLA-4, LAG3, ICOS, BTLA, KIR, TIM3, A2aR, B7-H3, B7-H4 и CECAM-1. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована таким образом, чтобы экспрессировать домен активации, который усиливает активацию Т-клеток и цитотоксичность. Неограничивающие примеры доменов активации, которые могут быть экспрессированы модифицированной $\gamma\delta$ Т-клеткой включают: CD2, ICOS, 4-1 BB (CD 137), OX40 (CD 134), CD27, CD70, CD80, CD86, DAP, CD122, GITR, Fc ϵ RIg.

[0068] Любая часть генома модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки может быть удалена, чтобы нарушить экспрессию эндогенного гена $\gamma\delta$ Т-клетки. Неограничивающие примеры геномных участков, которые могут быть удалены или разрушены в геноме $\gamma\delta$ Т-клетки включают промотор, активатор, энхансер, экзон, интрон, некодирующую РНК, микро-РНК, малоядерную РНК, tandemные повторы с изменяющимся числом (VNTR), короткие tandemные повторы (STR), SNP-паттерны, гипервариабельные участки, минисателлиты, динуклеотидные повторы, тринуклеотидные повторы, тетрануклеотидные повторы или простые повторяющиеся последовательности. В некоторых случаях удаленная часть генома находится в диапазоне от 1 нуклеиновой кислоты до около 10 нуклеиновых

кислот, от 1 нуклеиновой кислоты до около 100 нуклеиновых кислот, от 1 нуклеиновой кислоты до около 1000 нуклеиновых кислот, от 1 нуклеиновой кислоты до около 10000 нуклеиновых кислот, 1 нуклеиновой кислоты до около 100000 нуклеиновых кислот, от 1 нуклеиновой кислоты до около 1000000 нуклеиновых кислот или другого подходящего

5 диапазона.

[0069] Экспрессия гена HLA в модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетке также может быть разрушена различными способами, известными в данной области техники. В некоторых случаях, большие технологии редактирования генов локуса используются, чтобы вырезать ген из модифицированного $\gamma\delta$ Т-клеточного генома или нарушить экспрессию

10 гена, по крайней мере, одного локуса HLA в модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетке.

Неограничивающие примеры технологий редактирования генов, которые могут быть использованы для редактирования желаемого локуса в геноме модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки, включают систему коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR) -Cas, нуклеазы цинковые пальцы (ZFN), нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN) и технологии мегануклеазы, как описано, соответственно, в WO 201409370, WO 2003087341, WO 2014134412 и WO 2011090804, и каждая из которых включена в качестве ссылки во всей ее полноте.

[0070] $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована из изолированной немодифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки, которая уже экспрессирует фрагмент распознавания

20 опухолей. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может сохранять фрагмент распознавания опухолевых клеток, который эндогенно экспрессируется выделенной $\gamma\delta$ Т-клеткой дикого типа. В некоторых случаях фрагмент распознавания клеток опухоли модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки заменяет $\gamma\delta$ TCR дикого типа.

[0071] $\gamma\delta$ Т-клетка может быть модифицирована таким образом, чтобы

25 экспрессировать одну или несколько хоминг молекул, таких как хоминг молекула лимфоцитов. Хоминг молекулами могут быть, например, рецепторы хоминга лимфоцитов или молекулы клеточной адгезии. Хоминг молекула может помочь модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетке мигрировать и инфильтрироваться в солидную опухоль, включая целевую солидную опухоль после введения модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки

30 субъекту. Неограничивающие примеры хоминг рецепторов включают члены семейства CCR, например: CCR2, CCR4, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CLA, CD44, CD103, CD62L, Е-селектин, Р-селектин, L-селектин, интегрины, такие как VLA-4 и LFA-1.

Неограничивающие примеры молекул клеточной адгезии включают ICAM, N-CAM, VCAM, PE-CAM, L1-CAM, нектин (PVRL1, PVRL2, PVRL3), LFA-1, интегрин $\alpha\text{X}\beta\text{2}$, $\alpha\text{v}\beta\text{7}$, антиген макрофага-1, CLA- 4, гликопротеин IIb/IIIa. Дополнительные

35 примеры молекул клеточной адгезии включают кальций-зависимые молекулы, такие как Т-кадгерин, и антитела к матриксным металлопротеиназам (MMP), таким как MMP9 или MMP2.

[0072] Стадии, участвующие в созревании, активации, пролиферации и функции Т-

40 клеток, могут регулироваться посредством ко-стимулирующих и ингибирующих сигналов через иммунные белковые контрольные точки. Иммунные контрольные точки являются ко-стимулирующими и ингибирующими элементами, присущими иммунной системе. Иммунные контрольные точки помогают поддерживать аутоотолерантность и модулировать продолжительность и амплитуду физиологических иммунных реакций

45 для предотвращения повреждения тканей, когда иммунная система реагирует на болезненные состояния, такие как трансформация клеток или инфекция. Равновесие между ко-стимулирующими и ингибирующими сигналами, которые используются для контроля иммунного ответа либо $\gamma\delta$, либо $\alpha\beta$ Т-клетками, могут модулироваться

иммунными белковыми контрольными точками. Иммунные белковые контрольные точки, такие как PD1 и CTLA4, присутствуют на поверхности Т-клеток и могут быть использованы для переключения иммунного ответа «включено» или «выключено».

Опухоли могут нарушать функцию белков контрольной точки в качестве механизма иммунного сопротивления, особенно против Т-клеток, которые специфичны для опухолевых антигенов. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть дополнительно модифицирована таким образом, что у нее отсутствует один или несколько локусов контрольной точки иммунной системы, такие как PD-1, CTLA-4, LAG3, ICOS, BTLA, KIR, TIM3, A2aR, CEACAM1, B7-H3 и B7-H4. Альтернативно, экспрессия эндогенного гена иммунной контрольной точки в модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетке настоящего раскрытия могут быть разрушены с помощью технологий редактирования гена.

[0073] Иммунологические контрольные точки могут представлять собой молекулы, которые регулируют ингибирующие сигнальные пути (например, CTLA4, PD1 и LAG3) или молекулы, которые регулируют сигнальные пути стимуляции (например, ICOS) в модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетке настоящего раскрытия. Несколько белков в размноженном суперсемействе иммуноглобулинов могут быть лигандами для иммунологических контрольных точек. Неограничивающие примеры иммунных белков-лигандов контрольных точек включают B7-H4, ICOSL, PD-L1, PD-L2, MegaCD40L, MegaOX40L и CD137L. В некоторых случаях иммунные белки-лиганды контрольной точки являются антигенами, которые экспрессируются опухолью. В некоторых случаях ген иммунной контрольной точки представляет собой ген CTLA-4. В некоторых случаях ген иммунной контрольной точки представляет собой ген PD-1.

[0074] PD1 является ингибирующим рецептором, принадлежащим к семейству CD28/CTLA4, и экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах, В-клетках, моноцитах, DC и T-reg. Известны два известных лиганда для PD1, PD-L1 и PD-L2, которые экспрессируются на Т-клетках, АПК и злокачественных клетках, для подавления самореактивных лимфоцитов и для ингибирования эффекторной функции Т-а-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL). Соответственно, модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка, у которой отсутствует PD1, может сохранять свою цитотоксическую активность независимо от экспрессии PD-L1 и PD-L2 опухолевыми клетками. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия не имеет генного локуса для гена PD-1. В некоторых случаях экспрессия гена PD-1 в модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетке нарушается с помощью технологий редактирования генов.

[0075] CTLA4 (цитотоксический антиген 4 Т-лимфоцитов) также известен как CD 152 (кластер дифференцировки 152). CTLA4 имеет общую гомологию последовательностей и лиганды (CD80/B7-1 и CD86/B7-2) с костимулирующей молекулой CD28, но отличается тем, что подает ингибирующие сигналы к Т-клеткам, экспрессирующим CTLA4 в качестве рецептора. CTLA4 имеет гораздо более высокую общую аффинность к обоим лигандам и может конкурировать с CD28 за связывание, когда плотности лиганда являются предельными. CTLA4 часто экспрессируется на поверхности CD8+эффекторных Т-клеток и играет функциональную роль на начальных стадиях активации как наивных, так и Т-клеток памяти. CTLA4 противодействует активности CD28 благодаря повышенной аффинности к CD80 и CD86 на ранних стадиях активации Т-клеток. Основные функции CTLA4 включают понижающую модуляцию хелперных Т-клеток и усиление регуляторной Т-клеточной иммуносупрессивной активности. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка данного раскрытия не имеет гена CTLA4. В

некоторых случаях экспрессия гена CTLA4 в модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетке нарушается с помощью технологий редактирования генов.

[0076] LAG3 (ген 3 активации лимфоцитов) экспрессируется на активированных антигенспецифических цитотоксических Т-клетках и может усиливать функцию регуляторных Т-клеток и независимо ингибировать активность CD8+эффекторных Т-клеток. LAG3 представляет собой CD4-негативный регуляторный белок с высокой аффинностью связывания с белками МНС класса II, которые активируются на некоторых эпителиальных опухолях, что приводит к толерантности Т-клеток к пролиферации и гомеостазу. Снижение взаимодействия LAG-3/класса II с использованием гибридного белка LAG-3-IG может усиливать противоопухолевые иммунные реакции. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия не имеет генного локуса для гена LAG3. В некоторых случаях экспрессия гена LAG3 в модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетке нарушается с помощью технологий редактирования генов.

Фенотип модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток

[0077] модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может стремиться к определенному физическому месту в теле субъекта. Миграция и хоминг модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток, может зависеть от комбинированной экспрессии и действия специфических хемокинов и/или молекул адгезии. Хоминг модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток может контролироваться путем взаимодействия между хемокинами и их рецепторами. Например, цитокины, включая, но не ограничиваясь ими, CXCR3 (лиганды которого представлены IP-10/CXCL10 и 6Ckine/SLC/CCL21) CCR4+CXCR5+(рецептор для RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β) CCR6+и CCR7 могут влиять на хоминг модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может стремиться в очаги воспаления и повреждения, и к больным клеткам для выполнения восстановительных функций. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может стремиться к опухоли. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может стремиться к тимусу, костному мозгу, коже, гортани, трахеи, плевре, легкому, пищеводу, брюшной полости, желудку, тонкому кишечнику, толстой кишке, печени, поджелудочной железе, почкам, мочеиспускательному каналу, мочевому пузырю, яичкам, предстательной железе, семяпроводу, яичнику, уретусу, молочной железе, парашитовидной железе, селезенке или другому участку тела субъекта. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может экспрессировать один или несколько хоминг фрагментов, таких как конкретный аллель TCR и/или хоминг молекула лимфоцитов.

[0078] Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может иметь специфический фенотип, и фенотип может быть описан с точки зрения экспрессии маркера клеточной поверхности. Различные типы $\gamma\delta$ Т-клеток могут быть модифицированы, как описано в данном документе. В предпочтительных вариантах реализации изобретения модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка получена от человека, но модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка также может быть получена из другого источника, такого как млекопитающее или синтетическая клетка.

Антигены

[79] Изобретение, раскрытое в данном документе, предусматривает модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку, которая экспрессирует фрагмент распознавания антигена, при этом фрагмент распознавания антигена распознает специфичный для заболевания эпитоп. Антиген может быть молекулой, которая провоцирует иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать либо продукцию антител, активацию специфических иммунологически компетентных клеток, либо и то, и другое. Антигеном может быть, например, пептид, белок, гаптен, липид, углевод, бактерия, патоген или

вирус. Антигеном может быть опухолевый антиген. Опухолевый эпитоп может быть представлен комплексами МНС I или МНС II на поверхности опухолевых клеток. Эпитоп может быть частью антигена, который экспрессируется на поверхности клетки и распознается фрагментом распознавания опухолей.

5 [0080] Неограничивающие примеры антигенов, которые распознаются модифицированной $\gamma\delta$ Т-клеткой включают CD-19, CD-30, CD-22, CD37, CD38, CD-33, CD-138, CD-123, CD-79b, CD-70, CD-75, CA6, GD2, альфафетопротеин, карциноэмбриональный антиген, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, гликолипидF77, белок, активирующий фибробласты, 10 PSMA, STEAP-1, STEAP-2, мезотелин, C-met, CSPG4, Nectin-4, VEGFR2, PSCA, белковый рецептор связывания фолата, SLC44A4, Cripto, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, SLTRK6, gp100, MART1, тирозиназа, SSX2, SSX4, NYESO-1, эпителиальный опухолевый антиген, MAGEA, KKLC1, мутированный ras, β Raf, p53, MICA и MICB, или другой антиген, ассоциированный с патологическим состоянием. См. пересмотренный список - CD19, 15 CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, альфафетопротеин (AFP), карциноэмбриональный антиген CEA), RON, CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, PLIF, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, glycolipidF77, белок, активирующий фибробласты, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, мезотелин, c-met, CSPG4, нектин-4, VEGFR2, PSCA, белок/рецептор, связывающий фолат, 20 SLC44A4, Cripto, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, SLTRK6, gp100, MART1, тирозиназа, SSX2, SSX4, NYESO-1, эпителиальный опухолевый антиген (ETA), гены семейства MAGEA (такие как MAGE3A, MAGE4A), KKLC1, мутированный ras, β Raf, p53, молекула A, связанная с цепью МНС класса I (MICA) или молекула B, связанная с цепью МНС класса I (MICB), HPV, CMV.

25 [0081] Антиген может быть экспрессирован во внутриклеточном или внеклеточном компартменте клетки и модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может распознавать внутриклеточный или внеклеточный опухолевый антиген. В некоторых случаях $\alpha\beta$ TCR в модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетке распознает пептид, полученный из внутриклеточного или внеклеточного опухолевого антигена. Например, антиген может представлять 30 собой белок, внутриклеточно или внеклеточно продуцируемый клеткой, инфицированной вирусом, таким как ВИЧ, EBV, CMV или белок HPV. Антиген может также представлять собой белок, который экспрессируется раковой клеткой внутриклеточно или внеклеточно.

[0082] Фрагмент распознавания антигена может распознавать антиген из клетки, 35 которая находится в дистрессе, такой как раковая клетка или клетка, которая была инфицирована вирусом. Например, гены, связанные с цепочкой МНС класса I человека (MICA и MICB), расположены в пределах участка HLA I класса 6 хромосомы. MICA и MICB белки считаются маркерами «стресса» в эпителии человека и действуют как лиганды для клеток, экспрессирующих общий рецептор клеток натуральных киллеров 40 (NKG2D). В качестве маркеров стресса MICA и MICB могут быть высоко экспрессированы из раковых клеток. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может распознавать MICA или MICB эпитоп опухолей.

[0083] Фрагмент распознавания опухолей может быть модифицирован для распознавания антигена с определенной авидностью. Например, фрагмент 45 распознавания опухоли, кодируемый конструкцией TCR или CAR, может распознавать антиген с константой диссоциации, по меньшей мере 10 фМ, по меньшей мере 100 фМ, по меньшей мере 1 пикомоль (пМ), по меньшей мере 10 пМ, по меньшей мере 20 пМ, по меньшей мере 30 пМ, по меньшей мере 40 пМ, по меньшей мере 50 пМ, по меньшей

мере 60 пМ, по меньшей мере 7 пМ, по меньшей мере 80 пМ, по меньшей мере 90 пМ, по меньшей мере 100 пМ, по меньшей мере 200 пМ, по меньшей мере 300 пМ, по меньшей мере 400 пМ, по меньшей мере 500 пМ, по меньшей мере 600 пМ, по меньшей мере 700 пМ, по меньшей мере 800 пМ, по меньшей мере 900 пМ, по меньшей мере 1 нмоль (нМ), по меньшей мере 2 нМ, по меньшей мере 3 нМ, По меньшей мере 4 нМ, по меньшей мере 5 нМ, по меньшей мере 6 нМ, по меньшей мере 7 нМ, по меньшей мере 8 нМ, по меньшей мере 9 нМ, по меньшей мере 10 нМ, по меньшей мере 20 нМ, по меньшей мере 30 нМ, по меньшей мере 40 нМ, По меньшей мере 50 нм, по меньшей мере 60 нМ, по меньшей мере 70 нМ, по меньшей мере 80 нМ, по меньшей мере 90 нМ, по меньшей мере 100 нМ, по меньшей мере 200 нМ, по меньшей мере 300 нМ, по меньшей мере 400 нМ, по меньшей мере 500 нМ, по меньшей мере 600 нМ, по меньшей мере 700 нМ, по меньшей мере 800 нМ, по меньшей мере 900 нМ, по меньшей мере 1 мкМ, по меньшей мере 2 мкМ, по меньшей мере 3 мкМ, по меньшей мере 4 мкМ По меньшей мере, 5 мкМ, по меньшей мере 6 мкМ, по меньшей мере 7 мкМ, по меньшей мере 8 мкМ, по меньшей мере 9 мкМ, по меньшей мере 10 мкМ, по меньшей мере 20 мкМ, по меньшей мере 30 мкМ, по меньшей мере 40 мкМ, по меньшей мере 50 мкМ, по меньшей мере 60 мкМ, по меньшей мере 70 мкМ, по меньшей мере 80 мкМ, по меньшей мере 90 мкМ или по меньшей мере 100 мкМ.

[0084] В некоторых случаях, фрагмент распознавания опухолей может быть модифицирован для того, чтобы распознавать антиген с константой диссоциации по большей мере 10 фМ, по большей мере 100 фМ, по большей мере 1 пикомоль (пМ), по большей мере 10 пМ, по большей мере 20 пМ, по большей мере 30 пМ, по большей мере 40 пМ, по большей мере 50 пМ, по большей мере 60 пМ, по большей мере 7 пМ, по большей мере 80 пМ, по большей мере 90 пМ, по большей мере 100 пМ, по большей мере 200 пМ, по большей мере 300 пМ, по большей мере 400 пМ, по большей мере 500 пМ, по большей мере 600 пМ, по большей мере 700 пМ, по большей мере 800 пМ, по большей мере 900 пМ, по большей мере 1 нмоль (нМ), по большей мере 2 нМ, по большей мере 3 нМ, по большей мере 4 нМ, по большей мере 5 нМ, по большей мере 6 нМ, по большей мере 7 нМ, по большей мере 8 нМ, по большей мере 9 нМ, по большей мере 10 нМ, по большей мере 20 нМ, по большей мере 30 нМ, по большей мере 40 нМ, по большей мере 50 нМ, по большей мере 60 нМ, по большей мере 70 нМ, по большей мере 80 нМ, по большей мере 90 нМ, по большей мере 100 нМ, по большей мере 200 нМ, по большей мере 300 нМ, по большей мере 400 нМ, по большей мере 500 нМ, по большей мере 600 нМ, по большей мере 700 нМ, по большей мере 800 нМ, по большей мере 900 нМ, по большей мере 1 мкМ, по большей мере 2 мкМ, по большей мере 3 мкМ, по большей мере 4 мкМ, по большей мере 5 мкМ, по большей мере 6 мкМ, по большей мере 7 мкМ, по большей мере 8 мкМ, по большей мере 9 мкМ, по большей мере 10 мкМ, по большей мере 20 мкМ, по большей мере 30 мкМ, по большей мере 40 мкМ, по большей мере 50 мкМ, по большей мере 60 мкМ, по большей мере 70 мкМ, по большей мере 80 мкМ, по большей мере 90 мкМ, по большей мере 100 мкМ.

Выделение γδ Т-клеток

[0085] В некоторых аспектах настоящее раскрытие предусматривает способы генной модификации γδ Т-клеток, выделенных у субъекта. γδ Т-клетка может быть выделена из комплексного образца испытуемого. Комплексный образец может представлять собой образец периферической крови, образец пуповинной крови, опухоль, предшественник стволовых клеток, биопсию опухоли, ткань, лимфу или эпителиальные участки субъекта, непосредственно контактирующие с внешней средой или происходящие из стволовых клеток-предшественников. γδ Т-клетка может быть

непосредственно выделена из комплексного образца субъекта, например, путем сортировки $\gamma\delta$ Т-клетки (клеток), которые экспрессируют один или несколько маркеров клеточной поверхности с помощью методов проточной цитометрии. Дикий тип $\gamma\delta$ Т-клеток демонстрирует многочисленные распознавания антигена, антиген-презентацию, ко-стимуляцию и молекулы адгезии, которые могут быть связаны с $\gamma\delta$ Т-клеткой (клетками). Один или несколько маркеров клеточной поверхности, таких как специфичные $\gamma\delta$ TCR, распознавание антигена, представление антигена, лиганды, молекулы адгезии или ко-стимулирующие молекулы могут быть использованы для выделения $\gamma\delta$ Т-клетки дикого типа из комплексного образца. Различные молекулы, связанные с, или экспрессированные, $\gamma\delta$ Т-клеткой, могут быть использованы для выделения $\gamma\delta$ Т-клетки из комплексного образца. В некоторых случаях настоящее раскрытие предусматривает способы выделения смешанной популяции $V\delta 1^+$, $V\delta 2^+$, $V\delta 3$ -клеток или любой их комбинации.

[0086] Одноядерные клетки периферической крови могут быть собраны у субъекта, например, с помощью аппарата для афереза, включая систему Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare) или другое подходящее устройство/систему. $\gamma\delta$ Т-клетку (клетки) или желаемая субпопуляция $\gamma\delta$ Т-клетки (клеток), может быть очищена из собранного образца, например, методами проточной цитометрии. Клетки пуповинной крови могут также быть получены из пуповинной крови при рождении субъекта.

[0087] Положительная и/или отрицательная селекция маркеров клеточной поверхности, экспрессированных на собранной $\gamma\delta$ Т-клетке (клетках) могут быть использованы для непосредственного выделения $\gamma\delta$ Т-клетки, или популяции $\gamma\delta$ Т-клетки (клеток), экспрессирующей сходные маркеры клеточной поверхности, из образца периферической крови, образца пуповинной крови, опухоли, биопсии опухоли, ткани, лимфы или из эпителиального образца субъекта. Например, $\gamma\delta$ Т-клетка может быть выделена из комплексного образца на основе положительной или отрицательной экспрессии CD2, CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD44, Kit, TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ , NKG2D, CD70, CD27, CD30, CD16, CD337 (NKp30), CD336 (NKp46), OX40, CD46, CCR7 и других подходящих маркеров поверхности клеток.

[0088] $\gamma\delta$ Т-клетка может быть выделена из комплексного образца, который культивируется *in vitro*. В некоторых вариантах реализации общая популяция РВМС может быть активирована и размножена без предварительного уменьшения количества специфических клеточных популяций, таких как моноциты, $\alpha\beta$ Т-клетки, В-клетки и НК-клетки. В других вариантах реализации обогащенные $\gamma\delta$ Т-клеточные популяции могут генерироваться до их специфической активации и размножения. В некоторых аспектах активацию и размножение $\gamma\delta$ Т-клетки выполняют без присутствия нативных или модифицированных АПК. В некоторых аспектах выделение и размножение $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов из опухолевых образцов можно проводить с использованием иммобилизованных $\gamma\delta$ Т-клеточных митогенов, включая антитела, специфичные к $\gamma\delta$ TCR и другие активаторы $\gamma\delta$ TCR, включая лектины.

[0089] В некоторых вариантах реализации, $\gamma\delta$ Т-клетка (клетки) может быстро размножаться в ответ на контакт с одним или несколькими антигенами. Некоторые $\gamma\delta$ Т-клетки, такие как $V\gamma 9V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ Т-клетки быстро размножаются *in vitro* в ответ на контакт с некоторыми антигенами, такими как пренил-пирофосфаты, алкиламины и метаболиты или микробные экстракты во время культивирования ткани. Кроме того, некоторые $\gamma\delta$ Т-клетки дикого типа, такие как $V\gamma 2V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ Т-клетки быстро размножаются *in vivo* у людей в ответ на определенные типы вакцинации.

Стимулированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут демонстрировать многочисленные антиген-презентации, ко-стимуляцию и молекулы адгезии, которые могут облегчить выделение $\gamma\delta$ Т-клетки (клеток) из комплексного образца. $\gamma\delta$ Т-клетку (клетки) в пределах комплексного образца можно стимулировать *in vitro* по меньшей мере одним антигеном в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или другого подходящего периода времени. Стимулирование $\gamma\delta$ Т-клетки с подходящим антигеном может расширять $\gamma\delta$ Т-клеточную популяцию *invitro*.

[0090] Неограничивающие примеры антигенов, которые могут быть использованы для стимулирования размножения $\gamma\delta$ Т-клетки (клеток) из комплексного образца *invitro*, включают пренил-пирофосфаты, такие как изопентенилпирофосфат (IPP), алкиламины, метаболиты человеческих микробных патогенов, метаболиты комменсальных бактерий, -метил-3-бутенил-1-пирофосфат (2МЗВ1РР), (Е)-4-гидрокси-3-метилбут-2-енилпирофосфат (НМВ-РР), этилпирофосфат (ЕРР), фарнезилпирофосфат (FPP), диметилаллилфосфат (DMAP), диметилаллилпирофосфат (DMAPP), этил-аденозинтрифосфат (ЕРРРА), геранилпирофосфат (GPP), геранилгеранилпирофосфат (GGPP), изопентенил-аденозинтрифосфат (IPPPA), моноэтилфосфат (MEP), моноэтилпирофосфат (MEPP), 3-формил-1-бутил-пирофосфат (TUBAg 1), X-пирофосфат (TUBAg 2), 3-формил-1-бутил-уридинтрифосфат (TUBAg 3), 3-формил-1-бутилдезокситимидинтрифосфат (TUBAg 4), моноэтилалкиламины, аллилпирофосфат, кротоилпирофосфат, диметилаллил-у-уридинтрифосфат, кротоил- γ -уридинтрифосфат, аллил- γ -уридинтрифосфат, этиламин, изобутиламин, втор-бутиламин, изоамиламин и азотсодержащие бисфосфонаты.

[0091] Активация и размножение $\gamma\delta$ Т-клеток могут быть выполнены с использованием активирующих и ко-стимулирующих агентов, описанных в данном документе, для запуска пролиферации специфических $\gamma\delta$ Т-клеток и выживаемости популяций. В некоторых вариантах реализации активацией и размножением $\gamma\delta$ Т-клеток из разных культур можно достигнуть различных клональных или смешанных подмножеств поликлональных популяций. В некоторых вариантах реализации можно использовать различные агенты-агонисты для идентификации агентов, которые обеспечивают специфические $\gamma\delta$ активирующие сигналы. В одном аспекте агенты, которые предусматривают конкретные $\gamma\delta$ активирующие сигналы могут быть различными моноклональными антителами (MAb), направленными против $\gamma\delta$ TCR. В одном аспекте MAb могут связываться с различными эпитопами на константных или переменных участках γ TCR и/или δ TCR. В одном аспекте MAb могут включать $\gamma\delta$ TCR пан MAb. В одном аспекте $\gamma\delta$ TCR пан MAb могут распознавать домены, общие для разных γ и δ TCR обоих, включая δ 1 и δ 2, клеточных популяций. В одном аспекте антитела могут быть 5A6.E9 (Thermo scientific), B1 (Biolegend), IMMU510 и/или 11F12 (Beckman Coulter). В одном аспекте MAb могут быть направлены на конкретные домены, уникальные для переменных участков γ цепи (7A5 Mab, направленное на подобное к V γ 9 TCR (Thermo Scientific # TCR1720)), или домены на V δ 1 переменном участке (Mab TS8.2 (Thermo scientific # TCR1730; MAb TCI, MAb R9.12 (Beckman Coulter)) или V δ 2 (Mab 15D (Thermo Scientific # TCR1732)). Проводили тестирование способности этих MAb специфически активировать и расширять уникальную популяцию V δ 1 или V δ 2 подтипов клеток (фиг.4). Фигура 4 иллюстрирует рост δ 2 Т-клеток в среде, содержащей сыворотку (R2: RPMI+10% FBS), и бессывороточной средой (AIMV+бычий альбумин; CTS Optimizer без сыворотки с CTS добавкой без сыворотки). Все среды содержат 100 МЕ/мл IL-2, 2 мМ глутамин и 1 пенициллин/стрептомицин. Клетки стимулировали золедроновой кислотой при 1, 5 и 20 мкМ в день 0. Среду пополняли каждые 2-3 дня без

дополнительного добавления золедроновой кислоты. Общее количество размноженных $\delta 2$ Т-клеток с 10^6 РВМС и кратность размножения после 13 дней указывалось для каждого условия. В некоторых вариантах реализации антитела против различных доменов $\gamma\delta$ TCR (пан-антитела и антитела, распознающие специфические эпитопы

5
вариабельного участка в популяциях подмножества) могут быть объединены для оценки их способности к усиленной активации $\gamma\delta$ Т-клеток. В некоторых вариантах реализации, активаторы $\gamma\delta$ Т-клеток могут включать $\gamma\delta$ TCR-связывающие агенты, такие как MICA, антитело-агонист к NKG2D, (гибридный белок Fc) MICA, ULBP1, ULBP3 (системы R & D Minneapolis, MN) ULBP2 или ULBP6 (Sino Biological Beijing, China). В некоторых

10
вариантах реализации могут быть идентифицированы сопутствующие ко-стимулирующие агенты для содействия в иницировании пролиферации специфических $\gamma\delta$ Т-клеток без индукции клеточной анергии и апоптоза. Эти ко-стимулирующие агенты могут включать лиганды к рецепторам, которые экспрессируются на $\gamma\delta$ клетках, такие как NKG2D, CD161, CD70, JAML, вспомогательная молекула DNAX-1 (DNAM-1) ICOS, CD27, CD137, CD30, HVEM, SLAM, CD122, DAP и CD28-. В некоторых аспектах ко-стимулирующие

15
агенты могут быть антителами, специфичными к уникальным эпитопам на молекулах CD2 и CD3. CD2 и CD3 могут иметь различные конформационные структуры, если они экспрессированы на $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ Т-клетках, а в некоторых случаях специфические антитела к CD3 и CD2 могут приводить к определенной активации $\gamma\delta$ Т-клеток.

20
[0092] Популяция $\gamma\delta$ Т-клетки (клеток) может быть размножена *ex vivo* до модификации $\gamma\delta$ Т-клетки (клеток). Неограничивающий пример реагентов, которые могут быть использованы для облегчения размножения $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции *in vitro* включает анти-CD3 или анти-CD2, анти-CD27, анти-CD30, анти-CD70, антитела против OX40, IL-2, IL-15, IL-12, IL-9, IL-33, IL-18 или IL-21, CD70 (CD27-лиганд),

25
фитогемагглютинин (PHA), конвавалин А (ConA), покуид (PWM), белок агглютинин арахиса (PNA), агглютинин сои (SBA), агглютинин Les Culinaris (LCA), агглютинин Pisum Sativum (PSA), агглютинин Helix pomatia (HPA), лектин Vicia graminea (VGA) или другой подходящий митоген, способный стимулировать пролиферацию Т-клеток. Генетическая модификация $\gamma\delta$ Т-клетки (клеток) может включать стабильную

30
интеграцию конструкции, экспрессирующей фрагмент распознавания опухолей, такой как $\alpha\beta$ TCR, $\gamma\delta$ TCR, CAR, кодирующий антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или домен активации лимфоцитов, в геном выделенной $\gamma\delta$ Т-клетки (клеток), цитокин (ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-21, ИЛ-18, ИЛ-19, ИЛ-33, ИЛ-4, ИЛ-9, ИЛ-23, ИЛ-1 β) для усиления пролиферации, выживания и функционирования Т-клеток *ex vivo* и *in vivo*. Генетическая

35
модификация выделенной $\gamma\delta$ Т-клетки может также включать делецию или нарушение экспрессии гена от одного или нескольких эндогенных генов в геноме, выделенной $\gamma\delta$ Т-клетки, такого как локус (локусы) МНС.

Ex-vivo размножение модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток

40
[0093] В других аспектах настоящее раскрытие предусматривает способы для *ex vivo* размножения популяции модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток для терапии путем адаптивного переноса. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть размножена *ex vivo*. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть размножена *in vitro* без активации АПК или без совместной культуры с АПК и аминокислотами.

45
[0094] Способ согласно изобретению может позволить расширять различные $\gamma\delta$ Т-клеточные популяции, такие как $V\gamma 1^+$, $V\gamma 2^+$, $V\gamma 3^+$ $\gamma\delta$ Т-клеточная популяция. В некоторых случаях $\gamma\delta$ Т-клеточная популяция может быть размножена *in vitro* менее чем за 36 дней, менее чем за 35 дней, менее чем за 34 дня, менее чем за 33 дня, менее чем

за 32 дня, менее чем за 31 день, менее чем за 30 дней, менее чем за 29 дней, менее чем за 28 дней, менее чем за 27 дней, менее чем за 26 дней, менее чем за 25 дней, менее чем за 24 дня, менее чем за 23 дня, менее чем за 22 дня, менее чем за 21 день, менее чем за 20 дней, менее чем за 19 дней, менее чем за 18 дней, менее чем за 17 дней, менее чем за 16 дней, менее чем за 15 дней, менее чем за 14 дней, менее чем за 13 дней, менее чем за 12 дней, менее чем за 11 дней, менее чем за 10 дней, менее чем за 9 дней, менее чем за 8 дней, менее чем за 7 дней, менее чем за 6 дней, менее чем за 5 дней, менее чем за 4 дня, менее чем за 3 дня.

[0095] В некоторых аспектах предусматриваются способы размножения различных $\gamma\delta$ Т-клеток, включая модифицированные и немодифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки, путем контактирования $\gamma\delta$ Т-клеток с активатором. В некоторых случаях активатор связывается со специфическим эпитопом на рецепторе клеточной поверхности $\gamma\delta$ Т-клетки. Активатором может быть антитело, такое как моноклональное антитело. Активатор может специфически активировать рост одного или более типов $\gamma\delta$ Т-клеток, таких как δ 1, δ 2 или δ 3 клеточные популяции. В некоторых вариантах реализации активатор специфически активирует рост δ 1 клеточных популяций. В других случаях активатор специфически активирует рост δ 2 клеточных популяций.

[0096] Активатор может стимулировать размножение модифицированных и немодифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток с быстрым темпом роста. Например, агент, который стимулирует размножение популяции $\gamma\delta$ Т-клеток при средней скорости 1 клеточного деления менее чем за 30 часов, 1 клеточного деления менее чем за 29 часов, 1 клеточного деления менее чем за 28 часов, 1 клеточного деления менее чем за 27 часов, 1 клеточного деления менее чем через 26 часов, 1 клеточного деления менее чем за 25 часов, 1 клеточного деления менее чем за 24 часа, 1 клеточного деления менее чем за 23 часа, 1 клеточного деления менее чем за 22 часа, 1 клеточного деления менее чем за 21 час, 1 клеточного деления менее чем за 20 часов, 1 клеточного деления менее чем за 19 часов, 1 клеточного деления менее чем за 18 часов, 1 клеточного деления менее чем за 17 часов, 1 клеточного деления менее чем за 16 часов, 1 клеточного деления менее чем за 15 часов, 1 клеточного деления менее чем за 14 часов, 1 клеточного деления менее чем за 13 часов, 1 клеточного деления менее чем за 12 часов, 1 клеточного деления менее чем за 11 часов, 1 клеточного деления менее чем за 10 часов, 1 клеточного деления менее чем за 9 часов, 1 клеточного деления менее чем за 8 часов, 1 клеточного деления менее чем за 7 часов, 1 клеточного деления менее чем за 6 часов, 1 клеточного деления менее чем за 5 часов, 1 клеточного деления менее чем за 4 часа, 1 клеточного деления менее чем за 3 часа, 1 клеточного деления менее чем за 2 часа.

[0097] В некоторых случаях активатор может стимулировать размножение модифицированных и немодифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток со средней скоростью около 1 деления за около 4 часа, со средней скоростью около 1 деления за около 5 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 6 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 7 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 8 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 9 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 10 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 11 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 12 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 13 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 14 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 15 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 16 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 17 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 18 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 19 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 20 часов,

со средней скоростью около 1 деления за около 21 часа, со скоростью около 1 деления за около 22 часа, со скоростью около 1 деления за около 23 часа, со средней скоростью около 1 деления за около 24 часа, со средней скоростью около 1 деления за около 25 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 26 часов, со средней скоростью
 5 около 1 деления за около 27 часов, со скоростью около 1 деления за около 28 часов, со скоростью около 1 деления за около 29 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 30 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 31 часа, со средней скоростью около 1 деления за около 32 часа, со средней скоростью около 1 деления за около 33 часа, со скоростью около 1 деления за около 34 часа, со скоростью около 1
 10 деления за около 35 часов, со средней скоростью около 1 деления за около 36 часов.

[0098] Активатор может стимулировать размножение субпопуляций модифицированных и немодифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток с разной скоростью роста. Например, активатор может стимулировать рост δ 1 клеточной популяции с более высокой скоростью таким образом, что в течение периода времени от 1 дня до 90 дней
 15 культивирования, это приводит к более чем 10-кратному, 100-кратному, 200-кратному, 300-кратному, 400-кратному, 500-кратному, 600-кратному, 700-кратному, 800-кратному, 900-кратному, 1000-кратному, 10000-кратному, 100 000-кратному или 1 000 000-кратному росту по сравнению с другой $\gamma\delta$ Т-клеточной популяцией, такой как δ 2 или δ 3 популяция или другая $\gamma\delta$ субпопуляция. В других случаях активатор может
 20 стимулировать рост популяции δ 2 или δ 3 с более высокими скоростями таким образом, что в течение периода времени от 1 дня до 90 дней культивирования, это приводит к более чем 10-кратному, 100-кратному, 200-кратному, 300-кратному, 400-кратному, 500-кратному, 600-кратному, 700 кратному, 800 кратному, 900 кратному, 1000 кратному, 10000 кратному, 100 000 кратному или в 1 000 000 кратному размножению δ 1 Т-
 25 клеточной популяции или другой $\gamma\delta$ Т-клеточной субпопуляции. В других случаях активатор может стимулировать рост популяции δ 2 с более высокими скоростями таким образом, что в течение периода времени от 1 дня до 90 дней культивирования, это приводит к более чем 10-кратному, 100-кратному, 200-кратному, 300-кратному, 400-кратному, 500-кратному, 600-кратному, 700 кратному, 800 кратному, 900 кратному,
 30 1000 кратному, 10000 кратному, 100 000 кратному или в 1 000 000 кратному размножению δ 1 Т-клеточной популяции, δ 3 Т-клеточной популяции или другой $\gamma\delta$ Т-клеточной субпопуляции.

[0099] В некоторых аспектах раскрытие предусматривает $\gamma\delta$ Т-клеточную популяцию, при этом размножение $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции активируется активатором, который
 35 стимулирует размножение $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции с быстрой скоростью, такой как скорость около 1 клеточного деления за 1 час или быстрее. В некоторых случаях активатор селективно стимулирует пролиферацию либо δ 1, δ 2 или δ 3 Т-клеток. $\gamma\delta$ Т-клеточная популяция может содержать количество немодифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток и количество модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток. В некоторых случаях $\gamma\delta$ Т-клеточная
 40 популяция содержит разные проценты δ 1, δ 2 и δ 3 Т-клеток. Модифицированная или немодифицированная $\gamma\delta$ Т-клеточная популяция может содержать, например, менее чем 90% δ 1 Т-клеток, менее чем 80% δ 1 Т-клеток, менее чем 70% δ 1 Т-клеток, менее чем 60% δ 1 Т-клеток, менее чем 50% δ 1 Т-клеток, менее чем 40% δ 1 Т-клеток, менее чем 30% δ 1 Т-клеток, менее чем 20% δ 1 Т-клеток, менее чем 10% δ 1 Т-клеток или
 45 менее чем 5% δ 1 Т-клеток. В качестве альтернативы модифицированная или немодифицированная $\gamma\delta$ Т-клеточная популяция может содержать более чем 5% δ 1 Т-клеток, более чем 10% δ 1 Т-клеток, более чем 20% δ 1 Т-клеток, более чем 30% δ 1 Т-клеток, более чем 40% δ 1 Т-клеток, более чем 50% δ 1 Т-клеток, более чем 60% δ 1 Т-

клеток, более чем 70% δ 1 Т-клеток, более чем 80% δ 1 Т-клеток, или более чем 90% δ 1 Т-клеток.

[00100] Модифицированная или немодифицированная $\gamma\delta$ Т-клеточная популяция может содержать, например, менее чем 90% δ 2 Т-клеток, менее чем 80% δ 2 Т-клеток, менее чем 70% δ 2 Т-клеток, менее чем 60% δ 2 Т-клеток, менее чем 50% δ 2 Т-клеток, менее чем 40% δ 2 Т-клеток, менее чем 30% δ 2 Т-клеток, менее чем 20% δ 2 Т-клеток, менее чем 10% δ 2 Т-клеток или менее чем 5% δ 2 Т-клеток. В качестве альтернативы модифицированная или немодифицированная $\gamma\delta$ Т-клеточная популяция может содержать более чем 5% δ 2 Т-клеток, более чем 10% δ 2 Т-клеток, более чем 20% δ 2 Т-клеток, более чем 30% δ 2 Т-клеток, более чем 40% δ 2 Т-клеток, более чем 50% δ 2 Т-клеток, более чем 60% δ 2 Т-клеток, более чем 70% δ 2 Т-клеток, более чем 80% δ 2 Т-клеток, или более чем 90% δ 2 Т-клеток.

[00101] Модифицированная или немодифицированная $\gamma\delta$ Т-клеточная популяция может содержать, например, менее чем 90% δ 3 Т-клеток, менее чем 80% δ 3 Т-клеток, менее чем 70% δ 3 Т-клеток, менее чем 60% δ 3 Т-клеток, менее чем 50% δ 3 Т-клеток, менее чем 40% δ 3 Т-клеток, менее чем 30% δ 3 Т-клеток, менее чем 20% δ 3 Т-клеток, менее чем 10% δ 3 Т-клеток, или менее чем 5% δ 3 Т-клеток. В качестве альтернативы модифицированная или немодифицированная $\gamma\delta$ Т-клеточная популяция может содержать более чем 5% δ 3 Т-клеток, более чем 10% δ 3 Т-клеток, более чем 20% δ 3 Т-клеток, более чем 30% δ 3 Т-клеток, более чем 40% δ 3 Т-клеток, более чем 50% δ 3 Т-клеток, более чем 60% δ 3 Т-клеток, более чем 70% δ 3 Т-клеток, более чем 80% δ 3 Т-клеток или более чем 90% δ 3 Т-клеток.

[00102] Один или несколько активаторов могут контактировать с $\gamma\delta$ Т-клетками, и после этого костимулирующая молекула может контактировать с $\gamma\delta$ Т-клетками, чтобы обеспечить дополнительную стимуляцию и размножить $\gamma\delta$ Т-клетки. В некоторых вариантах реализации активатор и/или костимулирующий агент могут представлять собой лектины растительного и не растительного происхождения, моноклональные антитела, которые активируют $\gamma\delta$ Т-клетки и другие нелектиновые/неантителные агенты. В других случаях растительный лектин может быть конканавалином А (ConA), хотя могут использоваться другие лектины растений, такие как фитогемагглютинин (PHA). Другие примеры лектинов включают белковый агглютинин арахиса (PNA), агглютинин сои (SBA), агглютинин *les culinaris* (LCA), агглютинин *pisum sativum* (PSA), агглютинин *Helix pomatia* (HPA), лектин *Vicia graminea* (VGA).

[103] Неограничивающие примеры активирующих агентов и костимулирующих молекул включают антитела, такие как 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, γ 3.20, 7A5, IMMU510, R9.12, 11F2 или их комбинацию. Другие примеры активаторов и костимулирующих молекул включают золедронат, форбол 12-миристат-13-ацетат (TPA), мезерейн, стафилококковый энтеротоксин А (SEA), стрептококковый белок А или их комбинацию.

[00104] В других случаях активатором и/или костимулирующим агентом могут быть антитела или лиганды для α TCR, β TCR, γ TCR, δ TCR, CD277, CD28, CD46, CTLA4, ICOS, PD-1, CD30, NKG2D, NKG2A, HVEM, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD70, CD80, CD86, DAP, CD122, GITR, Fc ϵ R1g, CD1, CD16, CD161, DNAX, вспомогательная молекула-1 (DNAM-1), SLAM, вирус коксаки и рецептор аденовируса или их комбинация.

Идентификация эпитопа

[00105] В одном аспекте раскрытие предусматривает способ идентификации эпитопа агента, который стимулирует размножение модифицированных и немодифицированных

$\gamma\delta$ Т-клеток с быстрым темпом роста. Эпитоп может содержать по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и несмежных аминокислот, сопоставленных третичной укладкой белка.

5 Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, могут обычно сохраняться при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичной укладкой могут обычно теряться при обработке денатурирующими растворителями.

[00106] Картирование эпитопов может быть выполнено для идентификации линейной
10 или нелинейной, прерывистой последовательности (последовательностей) аминокислот, то есть эпитопа, который распознается представляющим интерес активатором, таким как, 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, 3.20, IMMU510, R9.12, 11F2 и 7A5. В общем подходе к картированию эпитопов может потребоваться экспрессия полноразмерной последовательности полипептида, которая распознается представляющим интерес
15 антителом или лигандом, а также различными фрагментами, т.е. укороченными формами полипептидной последовательности, как правило, в гетерологичной системе экспрессии. Эти различные рекомбинантные полипептидные последовательности или их фрагменты (например, слитые с N-концевым белком (например, GFP)) затем могут быть использованы для определения того, способно ли антитело или лиганд, представляющие
20 интерес, связываться с одной или несколькими укороченными формами полипептидной последовательности. Благодаря использованию повторного укорочения и генерации рекомбинантных полипептидных последовательностей с перекрывающимися аминокислотными участками можно идентифицировать участок полипептидной последовательности, который распознается представляющим интерес антителом (см.,
25 например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)). Методы основываются на способности агента, такого как представляющее интерес антитело, связываться с последовательностями, которые были воссозданы из библиотек эпитопов, таких как библиотеки эпитопов, полученных из синтетических пептидных массивов на мембранных носителях, библиотеки
30 комбинаторных фаговых дисплейных пептидов. Затем библиотеки эпитопов обеспечивают ряд возможностей, среди которых проводят скрининг на антитела. Кроме того, для подтверждения идентичности эпитопа может быть проведен сайт-специфический мутагенез или случайное сканирование Ala, нацеленное на один или несколько остатков эпитопа.

35 [00107] Библиотека эпитопов может быть создана путем искусственного конструирования различных возможных рекомбинаций $\gamma\delta$ Т-клеточного рецептора ($\gamma\delta$ TCR) в виде конструкций кДНК и экспрессии их в подходящей системе. Например, множество сегментов гена V δ 1, отличающиеся по своему J δ участку, может быть синтетически модифицировано, включая J δ 1, J δ 2 и J δ 3 генные сегменты.
40 Альтернативно, V δ 2J δ 1 и V δ 3J δ 1 цепи также могут быть упорядочены как синтетические гены и клонированы в подходящие векторы. Множество синтетически клонированных цепей δ TCR, таких как V δ 1J δ 1, V δ 1J δ 2, V δ 1J δ 3, V δ 1J δ 4, V δ 2 и V δ 3 цепи, могут быть совместно трансфицированы в систему хозяина с синтетически клонированными цепями γ TCR, такими как V γ 2, V γ 3, B γ 4, V γ 5, V γ 8, V γ 9 и V γ 10
45 синтетически сконструированных сегментов гена. В других случаях цепи δ TCR, такие как V δ 1J δ 1, V δ 1J δ 2, V δ 1J δ 3, V δ 1J δ 4, V δ 2 и V δ 3 цепи, могут быть амплифицированы из тотальной РНК, выделенной из человеческих РВМС или $\gamma\delta$ Т-клеток, выделенных из нормальной и злокачественной ткани человека.

[00108] Системой хозяина может быть любая подходящая экспрессионная система, такая как клетки 293, клетки насекомых или подходящая система трансляции in-vitro. Множество различных возможных рекомбинаций синтетически сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеточных сегментов трансфицированных в систему хозяина, могут обеспечивать, например, более чем 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90 возможных комбинаций спаривания $\gamma\delta$ TCR. Связывание агента с одним из эпитопов в ранее описанной библиотеке может быть обнаружено путем контактирования меченого антитела, такого как TS-1, 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, γ 3.20., R9.12, 7A5, с эпитопом библиотеки и детектированием сигнала от метки.

[00109] Для картирования эпитопов также были разработаны вычислительные алгоритмы, которые, как было показано, отображают конформационные прерывистые эпитопы. Конформационные эпитопы можно идентифицировать путем определения пространственной конформации аминокислот методами, которые включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерный магнитный резонанс. Некоторые методы картирования эпитопов, такие как рентгеновский анализ кристаллов комплексов антиген: антитело, могут обеспечить атомное разрешение эпитопа. В других случаях вычислительные комбинаторные методы для картирования эпитопов могут быть использованы для моделирования потенциального эпитопа на основе последовательности антитела, такого как антитело TS-1 или антитело TS8.2. В таких случаях антиген связывающий участок антитела секвенируется и вычислительные модели используются для реконструкции и прогнозирования потенциального сайта связывания антитела.

[00110] В некоторых случаях раскрытие изобретения предусматривает способ определения эпитопа $\gamma\delta$ Т-клеточного рецептора, включающий: (а) подготовку библиотеки эпитопов из $\gamma\delta$ Т-клеточного рецептора; (b) контактирование библиотеки эпитопов с антителом; и (b) идентификацию аминокислотной последовательности по меньшей мере одного эпитопа в библиотеке эпитопов, который связан антителом. В некоторых случаях антитело выбирают из группы, состоящей из антител 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, R9.12, 11F2 и 7A5. В одном случае антитело присоединяется к твердой подложке. Библиотека эпитопов может содержать последовательности, которые соответствуют непрерывным и прерывистым эпитопам рецептора Т-клеток, такого как γ TCR или δ TCR. В некоторых случаях библиотека эпитопов содержит фрагменты из $\gamma\delta$ Т-клеточного рецептора в интервале от около 10 аминокислот до около 30 аминокислот в длину, от около 10 аминокислот до около 20 аминокислот в длину или от около 5 аминокислот до около 12 аминокислот в длину. В некоторых случаях антитело метят и метка представляет собой радиоактивную молекулу, люминесцентную молекулу, флуоресцентную молекулу, фермент или биотин.

Методы лечения

[00111] Фармацевтические композиции, содержащие модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку, описанную в данном документе, могут быть введены для профилактического и/или терапевтического лечения. При терапевтических применениях композиции могут быть введены субъекту, уже страдающему заболеванием или патологическим состоянием, в количестве, достаточном для лечения или по меньшей мере частичной остановки симптомов заболевания или патологического состояния. Модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку можно также вводить, чтобы уменьшить вероятность развития, возникновения или ухудшения патологического состояния. Эффективные количества популяции модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток для терапевтического применения могут варьировать в зависимости от тяжести и течения заболевания или патологического состояния,

предшествующей терапии, состояния здоровья пациента, веса и/или реакции на лекарственные средства и/или суждения лечащего врача.

[00112] Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть использована для лечения субъекта, нуждающегося в лечении патологического состояния. Примеры патологического состояния включают рак, инфекционное заболевание, аутоиммунное заболевание и сепсис. Субъектами могут быть люди, приматы не являющиеся человеком, такие как шимпанзе и другие виды приматов и обезьян; сельскохозяйственные животные, такие как крупный рогатый скот, лошади, овцы, козы, свиньи; домашние животные, такие как кролики, собаки и кошки; лабораторные животные, включая грызунов, таких как крысы, мыши и морские свинки и тому подобное. Субъект может быть любого возраста. Субъектами могут быть, например, пожилые взрослые, взрослые, подростки, пред-подростки, дети, малыши, младенцы.

[00113] Способ лечения патологического состояния (например, недуга) у субъекта с помощью $\gamma\delta$ Т-клетки может включать введение субъекту терапевтически эффективного количества модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки. $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть введена при различных схемах лечения (например, времени, концентрации, дозировке, интервалах между лечением и/или лекарственной формы). Субъект также может быть предварительно подготовлен, например, химиотерапией, лучевой терапией или их комбинацией до получения модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки настоящего раскрытия. В рамках лечения модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку можно вводить субъекту при первом режиме, и субъект может наблюдаться, чтобы определить, соответствует ли лечение при первом режиме определенному уровню терапевтической эффективности. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка или другой модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть введена субъекту при втором режиме. **ФИГ. 2** схематически иллюстрирует способ лечения субъекта. При первой операции **201**, по меньшей мере, одну модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку вводят субъекту, который имеет или подозревается в наличии данного патологического состояния (например, рака). Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть введена при первом режиме. При второй операции **202** субъект может контролироваться, например, медицинским работником (например, лечащим врачом или медсестрой). В некоторых примерах субъект контролируется для определения или оценки эффективности модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки при лечении патологического состояния у пациента. В некоторых ситуациях субъект может также контролироваться для определения размножения *in vivo* $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции у субъекта. Затем при третьей операции **203**, по меньшей мере, одну другую модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку вводят субъекту при втором режиме. Второй режим может быть таким же, как первый режим или отличаться от первого режима. В некоторых ситуациях третью операцию **203** не выполняют, например, если введение модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки в первой операции **201** оказывается эффективным (например, один раунд введения может быть достаточным для лечения патологического состояния). Вследствие их аллогенных и универсальных донорных характеристик, популяцию модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток можно вводить различным субъектам с разными гаплотипами МНС. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка может быть заморожена или криоконсервирована до введения субъекту.

[00114] Популяция модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток также могут быть заморожена или криоконсервирована до введения субъекту. Популяция модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток может содержать две или более клетки, которые экспрессируют идентичные, различные или комбинацию идентичных и различных фрагментов распознавания

опухолей. Например, популяция модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток может содержать несколько различных модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток, которые предназначены для распознавания различных антигенов или разных эпитопов одного и того же антигена. Например, клетки человека, пораженные меланомой, могут экспрессировать онкоген NY-ESO-1. Инфицированные клетки человека могут перерабатывать онкобелок NY-ESO-1 на более мелкие фрагменты и представлять различные части белка NY-ESO-1 для распознавания антигена. Популяция модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток может содержать различные модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки, которые экспрессируют различные фрагменты распознавания опухолей, предназначенные для распознавания различных частей белка NY-ESO-1. **ФИГ. 3** схематично иллюстрирует способ лечения субъекта с популяцией модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток, которые распознают различные эпитопы антигена меланомы NY-ESO-1. В первой операции **301** отбирают популяцию модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена. Например, популяция модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток может включать две или более клетки, которые экспрессируют различные фрагменты распознавания опухолей, которые распознают различные части белка NY-ESO-1. Во второй операции **302** популяцию модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток можно вводить при первом режиме. При второй операции **303** субъект может контролироваться, например, медицинским работником (например, лечащим врачом или медсестрой).

[00115] $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть использована для лечения различных патологических состояний. В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть использована для лечения рака, включая солидные опухоли и гематологические злокачественные опухоли. Неограничивающие примеры рака включают: острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденокарциному, раковые заболевания, связанные со СПИДом, связанную со СПИДом лимфому, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитомы, нейробластому, карциному базальных клеток, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак костей, опухоли головного мозга, такие как мозжечковая астроцитома, церебральная астроцитома/злокачественная глиома, эпендимомы, медуллобластома, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, глиома визуального пути и гипоталамическая глиома, рак молочной железы, бронхиальные аденомы, лимфому Беркитта, карциному неизвестного первичного происхождения, лимфому, мозжечковую астроцитому, рак шейки матки, рак детского возраста, хронический лимфолейкоз, хронический миелолейкоз, хронические миелопролиферативные расстройства, рак толстой кишки, кожную Т-клеточную лимфому, десмопластическую малую опухоль круглых клеток, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, саркому Юинга, герминогенные опухоли, рак желчного пузыря, рак желудка, карциноидная опухоль желудочно-кишечного тракта, опухоль стромы желудочно-кишечного тракта, глиомы, лейкоз волосатых клеток, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоцеллюлярный рак, лимфому Ходжкина, гипотиреоидный рак, внутриглазную меланому, карциному островковых клеток, саркому Капоши, рак почки, рак гортани, рак губы и рак полости рта, липосаркому, рак печени, раки легкого, такие как немелкоклеточный рак и мелкоклеточный рак легкого, лимфомы, лейкемии, макроглобулинемию, злокачественную фиброзную гистиоцитому костей/остеосаркому, медуллобластому, меланому, мезотелиому, метастатический рак шейки матки с неизвестным происхождением, рак полости рта, синдром множественной эндокринной неоплазии, миелодиспластические синдромы, миелоидный лейкоз, опухоль полости носа и параназального синуса, карциному носоглотки, нейробластому, неходжкинскую

лимфому, немелкоклеточный рак легкого, рак полости рта, рак ротоглотки, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому костей, рак яичников, рак яичника, эпителиальный рак яичников, рак поджелудочной железы, рак островковых клеток поджелудочной железы, рак параназального синуса и рак носовой полости, 5 раком паращитовидной железы, рак полового члена, фарингеальный рак, феохромоцитому, пинеальную астроцитому, пинеальную герминому, аденому гипофиза, плевролегочную бластому, неоплазию плазматических клеток, лимфому первичной центральной нервной системы, рак простаты, рак прямой кишки, рак почек, рак почечной лоханки и мочеточника почек, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак 10 слюнных желез, саркому, рак кожи, рак кожи из клеток Меркеля, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному, рак желудка, Т-клеточную лимфому, рак горла, тимому, карциному тимуса, рак щитовидной железы, трофобластическую опухоль (гестационную), рак неизвестного первичного происхождения, рак уретры, маточную саркому, вагинальный рак, рак вульвы, 15 макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса.

[00116] В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка по настоящему изобретению может быть использована для лечения инфекционного заболевания. Инфекционное заболевание может быть вызвано, например, патогенной бактерией или вирусом. Различные патогенные белки, нуклеиновые кислоты, липиды или их фрагменты 20 могут экспрессироваться больной клеткой. Антигенпредставляющая клетка может интернализировать такие патогенные молекулы, например путем фагоцитоза или опосредуемого рецепторами эндоцитоза, и презентировать фрагмент антигена, связанного с подходящей молекулой МНС. Например, АПК может презентировать различные 9 мер фрагменты патогенного белка. Модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки 25 настоящего раскрытия могут быть предназначены для распознавания различных антигенов и фрагментов антигенов патогенной бактерии или вируса. Неограничивающие примеры патогенных бактерий могут быть найдены в: а) роду *Bordetella*, таком как вид *Bordetella pertussis*; b) роду *Borrelia*, таких видах как *Borrelia burgdorferi*; c) роду *Brucella*, таком как *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis* и/или вид *Brucella suis*; d) роду 30 *Campylobacter*, таком как вид *Campylobacter jejuni*; e) *Chlamydia* и *Chlamydophila*, такие как *Chlamydia pneumonia*, *Chlamydia trachomatis* и/или *Chlamydophila psittaci*; f) роду *Clostridium*, таком как *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani* виды; g) роду *Corynebacterium*, таком как вид *Corynebacterium diphtheriae*; h) роду *Enterococcus*, таком как *Enterococcus faecalis* и/или *Enterococcus faecium*; i) роду 35 *Escherichia*, таком как виды *Escherichia coli*; j) роду *Francisella*, таком как виды *Francisella tularensis*; k) роду *Haemophilus*, таком как виды *Haemophilus influenza*; l) роду *Helicobacter*, таком как виды *Helicobacter pylori*; m) роду *Legionella*, таком как виды *Legionella pneumophila*; n) роду *Leptospira*, таком как виды *Leptospira interrogans*; o) роду *Listeria*, таком как виды *Listeria monocytogenes*; p) роду *Mycobacterium*, таком как *Mycobacterium 40 leprae*, *mycobacterium tuberculosis* и/или виды *mycobacterium ulcerans*; q) роду *Mycoplasma*, таком как виды *Mycoplasma pneumonia*; r) роду *Neisseria*, таком как *Neisseria gonorrhoeae* и/или *Neisseria meningitidis* виды; s) роду *Pseudomonas*, таком как вид *Pseudomonas aeruginosa*; t) роду *Rickettsia*, таком как виды *Rickettsia rickettsii*; u) роду *Salmonella*, таком как виды *Salmonella typhi* и/или *Salmonella typhimurium*; v) роду *Shigella*, таком как виды 45 *Shigella sonnei*; w) роду *Staphylococcus*, таком как *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и/или *Staphylococcus saprophyticus* species; x) роду *Streptococcus*, таких как *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* и/или *Streptococcus pyogenes*; y) роду *Treponema*, таких как вид *Treponema pallidum*; z) роду *Vibrio*, таким как *Vibrio cholera*; и/

или aa) роду *Yersinia*, таком как вид *Yersinia pestis*.

[00117] В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть использована для лечения инфекционного заболевания, инфекционное заболевание может быть вызвано вирусом. Неограничивающие примеры вирусов можно найти в следующих семействах вирусов и они иллюстрируются примерами видов: а) семейства *Adenoviridae*, таких как виды *Adenovirus*; б) семейства *Herpesviridae*, таком как *Herpes simplex 1* типа, *Herpes simplex 2* типа, вирус *Varicella-zoster*, вирус Эпштейна-Барра, цитомегаловирус человека, вид вируса герпеса человека 8; в) семейства *Papillomaviridae*, таком как виды вируса папилломы человека; г) семейства *Polyomaviridae*, таких как вирус ВК, виды вируса JC; д) семейства *Poxviridae*, таких как виды оспы; е) семейства *Hepadnaviridae*, таких как виды вируса гепатита В; з) семейства *Parvoviridae*, таких как бокавирус человека, *Parvovirus B19*; и) семейства *Astroviridae*, такое как виды человеческого астровируса; й) семейства *Caliciviridae*, таких как виды вируса Норуолк; j) семейства *Flaviviridae*, таких как вирус гепатита С (HCV), вирус желтой лихорадки, вирус денге, виды вируса Западного Нила; к) семейства *Togaviridae*, таких как виды вируса краснухи; л) семейства *Hepeviridae*, таких как виды вируса гепатита Е; м) семейства *Retroviridae*, таких как виды вируса иммунодефицита человека (ВИЧ); н) семейства *Orthomyxoviridae*, таких как виды вируса гриппа; о) семейства *Arenaviridae*, таких как вирус *Guanarito*, вирус *Junin*, вирус *Lassa*, вирус *Machupo* и/или вирус *Sabia*; п) семейства *Bunyaviridae*, таких как виды вируса крымской геморрагической лихорадки; q) семейства *Filoviridae*, таких как вирус Эбола и/или марбургские вирусы; семейства *Paramyxoviridae*, таких как вирус кори, вирус эпидемического паротита, вирус парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус человека, вирус *Hendra* и/или вирус *Nipah*; r) рода *Rhabdoviridae*, таких как виды вируса бешенства; s) семейства *Reoviridae*, таких как виды *Rotavirus*, *Orbivirus*, *Coltivirus* и/или *Banna*. В некоторых примерах вирус не причисляют к вирусному семейству, такой как гепатит D.

[00118] В некоторых случаях модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего раскрытия может быть использована для лечения иммунного заболевания, такого как аутоиммунное заболевание. Воспалительные заболевания, включая аутоиммунные заболевания, также представляют собой класс заболеваний, связанных с расстройствами В-клеток. Примеры иммунных заболеваний или патологических состояний, включая аутоиммунные состояния, которые можно лечить с помощью модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки, раскрытой в данном документе, включают: ревматоидный артрит, ревматическую лихорадку, рассеянный склероз, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, псориаз, увеит, сахарный диабет, системную красную волчанку (СКВ), волчаночный нефрит, экзему, склеродермию, полимиозит/склеродермию, полимиозит/дерматомиозит, проктит, тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID), синдром ДиГорджа, атаксию-телеангиэктазию, сезонные аллергии, многолетние аллергические реакции, пищевую аллергию, анафилаксию, мастоцитоз, аллергический ринит, atopический дерматит, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, гиперспленизм, лейкоцитарную недостаточность адгезии, X-сцепленный лимфопролиферативный синдром, X-сцепленную агаммаглобулинемию, селективный дефицит секреторного иммуноглобулина А, гипер-IgM-синдром, ВИЧ, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, синдром Вискотта-Олдрича, хроническое гранулематозное заболевание, общий переменный иммунодефицит (CVID), синдром гипериммуноглобулина Е, тиреоидит Хашимото, острую идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, хроническую идиопатическую тромбоцитопению, дерматомиозит, хорею Сиденхема, миастению, полигландулярные синдромы, буллезный пемфигоид, пурпуру Генох-

Шонлейн, постстрептококковый нефрит, узловатую эритему, мультиформную эритему, gA-нефропатию, артериит Такаяны, болезнь Аддисона, саркоидоз, язвенный колит, узелковый полиартериит, анкилозирующий спондилит, синдром Гудпасчера, тромбоангитуберанты, синдром Шегрена, первичный билиарный цирроз, тиреоидит

5 Хасимото, тиреотоксикоз, хронический активный гепатит, полихондрит, памфигус обыкновенный, гранулематоз Вегенера, мембранную нефропатию, боковой амиотрофический склероз, сухотку спинного мозга, гигантский клеточный артериит/полимиалгию, быстро прогрессирующий гломерулонефрит, псориаз, фиброзирующий альвеолит и рак.

10 [00119] Лечение с помощью $\gamma\delta$ Т-клетки настоящего раскрытия может быть обеспечено субъекту до, во время и после начала клинического состояния. Лечение может быть обеспечено субъекту через 1 день, 1 неделю, 6 месяцев, 12 месяцев или через 2 года после начала клинического заболевания. Лечение может быть обеспечено субъекту более 1 дня, 1 недели, 1 месяца, 6 месяцев, 12 месяцев, 2 года, 3 года, 4 года, 5 лет, 6 лет, 7 лет,

15 8 лет, 9 лет, 10 лет или более после начала клинического заболевания. Лечение может быть предоставлено субъекту в течение менее 1 дня, 1 недели, 1 месяца, 6 месяцев, 12 месяцев или 2 лет после начала клинического заболевания. Лечение может также включать лечение человека в клиническом испытании. Лечение может включать введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку

20 настоящего раскрытия.

[00120] В некоторых случаях введение модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки настоящего раскрытия субъекту модулирует активность эндогенных лимфоцитов в организме субъекта. В некоторых случаях введение модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки (клеток) субъекту предусматривает антиген к эндогенной Т-клетке и может стимулировать

25 иммунный ответ. В некоторых случаях Т-клетка памяти представляет собой CD4+Т-клетку. В некоторых случаях Т-клетка памяти представляет собой CD8+Т-клетку. В некоторых случаях введение модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки (клеток) субъекту активирует цитотоксичность другой иммунной клетки. В некоторых случаях, другая иммунная клетка представляет собой CD8+ Т-клетку. В некоторых случаях, другая

30 иммунная клетка представляет собой Т-клетку натурального киллера. В некоторых случаях введение модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки (клеток) субъекту подавляет регуляторную Т-клетку. В некоторых случаях регуляторная Т-клетка представляет собой клетку Fox3+Treg. В некоторых случаях регуляторная Т-клетка представляет собой клетку Fox3 -Treg. Неограничивающие примеры клеток, активность которых

35 может модулироваться с помощью модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки раскрытия включают: гемопоэтические стволовые клетки; В-клетки; CD4; CD8; красные клетки крови; белые клетки крови; дендритные клетки, включая дендритные антигенпрезентирующие клетки; лейкоциты; макрофаги; В-клетки памяти; Т-клетки памяти; моноциты; клетки натуральные киллеры; нейтрофильные гранулоциты; Т-хелперные клетки; и Т-киллерные клетки.

40

[00121] Во время большинства трансплантаций костного мозга обычно используют комбинацию циклофосфамида с общим облучением тела, чтобы предотвратить отторжение гемопоэтических стволовых клеток (HSC) в трансплантате иммунной системой субъекта. В некоторых случаях инкубация донорского костного мозга с

45 интерлейкином-2 (IL-2) *ex vivo* производят для усиления генерации киллерных лимфоцитов в донорском мозге. Интерлейкин-2 (IL-2) представляет собой цитокин, необходимый для роста, пролиферации и дифференцировки лимфоцитов дикого типа. Текущие исследования адоптивного переноса $\gamma\delta$ Т-клеток в организм человека могут

требовать совместного введения γδ Т-клеток и интерлейкина-2. Однако как низкие, так и высокие дозы ИЛ-2 могут иметь высокотоксичные побочные эффекты. Токсичность ИЛ-2 может проявляться во многих органах/системах, наиболее значительно в сердце, легких, почках и центральной нервной системе. В некоторых случаях настоящее раскрытие предусматривает способ введения модифицированной γδ Т-клетки субъекту без совместного введения цитокина, такого как ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-21. В некоторых случаях модифицированную γδ Т-клетку можно вводить субъекту без совместного введения с ИЛ-2. В некоторых случаях модифицированную γδ Т-клетку вводят субъекту во время процедуры, такой как трансплантация костного мозга без совместного введения ИЛ-2.

Способы введения

[00122] Одну или несколько модифицированных γδ Т-клеток можно вводить субъекту в любом порядке или одновременно. В случае одновременного введения несколько модифицированных γδ Т-клеток могут быть представлены в единой унифицированной форме, такой как внутривенная инъекция, или в нескольких формах, например, в виде множественных внутривенных инфузий, подкожных инъекций или пилюль. Модифицированная γδ Т-клетка (клетки) может быть упакована вместе или по отдельности в одной упаковке или в нескольких упаковках. Одна или все из модифицированных γδ Т-клеток могут вводиться в нескольких дозах. В случае не одновременного введения, время между многократными дозами может варьироваться до около недели, месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев или года. В некоторых случаях модифицированная γδ Т-клетка (клетки) может размножаться внутри тела субъекта, *in vivo*, после введения субъекту. Модифицированная γδ Т-клетка (клетки) может быть заморожена, чтобы обеспечить клетки для множественных обработок одним и тем же препаратом клеток. Модифицированная γδ Т-клетка (клетки) настоящего раскрытия и фармацевтические композиции, содержащие их, могут быть упакованы в виде набора. Набор может включать инструкции (например, письменные инструкции) об использовании модифицированной γδ Т-клетки (клеток) и композиции, содержащей их.

[00123] В некоторых случаях способ лечения рака включает введение субъекту терапевтически эффективного количества модифицированной γδ Т-клетки (клеток), при этом введение лечит рак. В некоторых вариантах реализации терапевтически эффективное количество модифицированной γδ Т-клетки (клеток) вводят в течение, по меньшей мере, около 10 секунд, 30 секунд, 1 минуты, 10 минут, 30 минут, 1 часа, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев или 1 года. В некоторых вариантах реализации терапевтически эффективное количество модифицированной γδ Т-клетки (клеток) вводят в течение по меньшей мере одной недели. В некоторых вариантах реализации терапевтически эффективное количество модифицированной γδ Т-клетки (клеток) вводят в течение по меньшей мере двух недель.

[00124] Модифицированная γδ Т-клетка (клетки), описанная в данном документе, может быть введена до, во время или после возникновения заболевания или патологического состояния и сроки введения фармацевтической композиции, содержащей модифицированную γδ Т-клетку могут варьировать. Например, модифицированная γδ Т-клетка может быть использована в качестве профилактического средства и может вводиться непрерывно субъектам со склонностью к заболеваниям или патологическим состояниям, чтобы уменьшить вероятность возникновения заболевания или патологического состояния. Модифицированную γδ Т-клетку (клетки)

можно вводить субъекту во время или как можно скорее после появления симптомов. Введение модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки (клеток) может быть инициирована немедленно в начале симптомов в течение первых 3 часов после появления симптомов, в течение первых 6 часов после появления симптомов, в течение первых 24 часов после появления симптомов, в течение 48 часов с момента появления симптомов или в течение какого-либо периода времени с момента появления симптомов. Начальное введение может быть осуществлено любым путем, таким как любой путь, описанный в данном документе, с использованием любого состава, описанного в данном документе. В некоторых примерах введение модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки настоящего раскрытия представляет собой внутривенное введение. Одну или несколько доз модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки можно вводить как можно скорее после начала заболевания раком, инфекционным заболеванием, иммунным заболеванием, сепсисом или при трансплантации костного мозга и в течение периода времени, необходимого для лечения иммунного заболевания, например, от примерно 24 часов до примерно 48 часов, от примерно 48 часов до примерно 1 недели, от примерно 1 недели до примерно 2 недель, от примерно 2 недель до примерно 1 месяца, от примерно 1 месяца до примерно 3 месяцев. Для лечения рака одну или несколько доз модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки можно вводить спустя годы после начала заболевания и до или после других видов лечения. В некоторых примерах модифицированную $\gamma\delta$ Т-клетку (клетки) можно вводить в течение, по меньшей мере, 10 минут, 30 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов, по меньшей мере 48 часов, по меньшей мере 72 часов, по меньшей мере 96 часов, по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 1 года, по меньшей мере 2 лет по меньшей мере 3 лет, по меньшей мере 4 лет или по меньшей мере 5 лет. Продолжительность лечения может варьировать для каждого субъекта.

Дозы

[00125] Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка (клетки), описанная в данном документе, может быть составлена в виде единичных лекарственных форм, подходящих для однократного введения точных дозировок. В некоторых случаях единичные лекарственные формы содержат дополнительные лимфоциты. В единичной лекарственной форме препарат разделяют на единичные дозы, содержащие соответствующие количества одного или нескольких соединений. Единичная доза может быть в форме упаковки, содержащей дискретные количества препарата. Неограничивающие примеры представляют собой упакованные таблетки или капсулы и порошки во флаконах или ампулах. Водные суспензионные композиции могут быть упакованы в однодозовые контейнеры без повторного закрывания. Многодозовые повторно закрываемые контейнеры могут использоваться, например, в комбинации с консервантом или без консерванта. В некоторых примерах фармацевтическая композиция не содержит консервант. Препараты для парентеральной инъекции могут быть представлены в единичной лекарственной форме, например, в ампулах или в контейнерах с несколькими дозами с консервантом.

[00126] Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка, описанная в данном документе, может присутствовать в композиции в количестве по меньшей мере 5 клеток, по меньшей мере 10 клеток, по меньшей мере 20 клеток, по меньшей мере 30 клеток, по меньшей мере

[illegible]

[00127] Терапевтически эффективная доза модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки по настоящему изобретению может составлять от около 1 клетки до около 10 клеток, от около 1 клетки до около 100 клеток, от около 1 клетки до около 10 клеток, от около 1 клетки до около 20 клеток, от около 1 клетки до около 30 клеток, от около 1 клетки до около 40 клеток, от около 1 клетки до около 50 клеток, от около 1 клетки до около 60 клеток, от около 1 клетки до около 70 клеток, от около 1 клетки до около 80 клеток, от около 1 клетки до около 90 клеток, от около 1 клетки до около 100 клеток, от около 1 клетки до около 1×10^3 клеток, от около 1 клетки до около 2×10^3 клеток, от около 1 клетки до около 3×10^3 клеток, от около 1 клетки до около 4×10^3 клеток, от около 1 клетки до около 5×10^3 клеток, от около 1 клетки до около 6×10^3 клеток, от около 1 клетки до около 7×10^3 клеток, от около 1 клетки до около 8×10^3 клеток, от около 1 клетки до около 9×10^3 клеток, от около 1 клетки до около 1×10^4 клеток, от около 1 клетки до около 2×10^4 клеток, от около 1 клетки до около 3×10^4 клеток, от около 1 клетки до около 4×10^4 клеток, от около 1 клетки до около 5×10^4 клеток, от около 1

8×10^5 клеток, от около 1×10^3 клеток до около 9×10^5 клеток, от около 1×10^3 клеток до
 около 1×10^6 клеток, от около 1×10^3 клеток до около 2×10^6 клеток, от около 1×10^3 клеток
 до около 3×10^6 клеток, от около 1×10^3 клеток до около 4×10^6 клеток, от около 1×10^3
 5 клеток до около 5×10^6 клеток, от около 1×10^3 клеток до около 6×10^6 клеток, от около
 1×10^3 клеток до около 7×10^6 клеток, от около 1×10^3 клеток до около 8×10^6 клеток, от
 около 1×10^3 клеток до около 9×10^6 клеток, от около 1×10^3 клеток до около 1×10^7 клеток,
 от около 1×10^3 клеток до около 2×10^7 клеток, от около 1×10^3 клеток до около 3×10^7
 10 клеток, от около 1×10^3 клеток до около 4×10^7 клеток, от около 1×10^3 клеток до около
 5×10^7 клеток, от около 1×10^3 клеток до около 6×10^7 клеток, от около 1×10^3 клеток до
 около 7×10^7 клеток, от около 1×10^3 клеток до около 8×10^7 клеток, от около 1×10^3 клеток
 15 до около 9×10^7 клеток, от около 1×10^3 клеток до около 1×10^8 клеток, от около 1×10^3
 клеток до около 2×10^8 клеток, от около 1×10^3 клеток до около 3×10^8 клеток, от около
 1×10^3 клеток до около 4×10^8 клеток, от около 1×10^3 клеток до около 5×10^8 клеток, от
 около 1×10^3 клеток до около 6×10^8 клеток, от около 1×10^3 клеток до около 7×10^8 клеток,
 20 от около 1×10^3 клеток до около 8×10^8 клеток, от около 1×10^3 клеток до около 9×10^8
 клеток или от около 1×10^3 клеток до около 1×10^9 клеток.

Хранение

[00129] В некоторых вариантах реализации, $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть приготовлены
 в замороженной среде и помещены в криогенные отсеки хранения, такие как
 25 морозильники с жидким азотом (-195°C) или ультранизкотемпературные морозильники
 (-65°C , -80°C или -120°C) для длительного хранения, по меньшей мере, около 1 месяца,
 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 3 лет или по меньшей
 мере 5 лет. Морозильная среда может содержать диметилсульфоксид (ДМСО) и/или
 30 хлорид натрия (NaCl) и/или декстрозу, и/или декстрансульфат, и/или гидроэтилкрахмал
 (ГЭК) с физиологическими рН-буферными агентами для поддержания рН от около 6,0
 до около 6,5, от около 6,5 до около 7,0, от около 7,0 до около 7,5, от около 7,5 до около
 8,0 или от около 6,5 до около 7,5. Криоконсервированные $\gamma\delta$ Т-клетки можно
 разморозить и дополнительно обработать путем стимуляции антителами, белками,
 пептидами и/или цитокинами, как описано в данном документе. Криоконсервированные
 35 $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть разморожены и генетически модифицированы вирусными
 векторами (включая ретровирусные и лентивирусные векторы) или невирусными
 средствами (включая РНК, ДНК и белки), как описано в данном документе. Измененные
 $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть дополнительно криоконсервированы для создания банков
 40 клеток в количествах по меньшей мере около 1,5, 10, 100, 150, 200, 500 флаконов по
 меньшей мере на 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или по меньшей мере около 10^{10}
 клеток на мл в замороженных средах. Криоконсервированные банки клеток могут
 сохранять свою функциональность и могут размораживаться, а затем стимулироваться
 и размножаться. В некоторых аспектах размороженные клетки могут быть
 45 стимулированы и размножены в подходящих закрытых сосудах, таких как мешки для
 клеточной культуры и/или биореакторы, для получения количества клеток в качестве
 аллогенного клеточного продукта. Криоконсервированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут сохранять
 свои биологические функции в течение по крайней мере 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев,
 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 13 месяцев, 15 месяцев, 18 месяцев, 20

месяцев, 24 месяцев, 30 месяцев, 36 месяцев, 40 месяцев, 50 месяцев или по меньшей мере около 60 месяцев в условиях криогенного хранения. В некоторых аспектах консерванты не используются в композиции. Криоконсервированные $\gamma\delta$ Т-клетки можно разморозить и ввести нескольким пациентам в качестве аллогенного готового клеточного продукта.

5 [00130] Настоящее изобретение можно лучше понять со ссылкой на следующие примеры, которые не предназначены для ограничения объема формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Выделение первичных клеток

10 [00131] Первичные моноклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) собирали от здоровых доноров с использованием аппарата для афереза. PBMC очищали с помощью системы Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) или аналогичных систем. Затем клетки повторно суспендировали в соответствующей среде для роста.

15 [00132] Альтернативно первичные клетки человека собирали из периферической крови, пуповинной крови, костного мозга, здоровых тканей или тканей, пораженных болезнью, таких как раковые ткани.

Пример 2. Ткань здоровых доноров

[133] Свежие ткани от здоровых доноров получали от Кооперативной сети человеческих тканей (CHTN) и транспортировали в лабораторию в среде RPMI-1640.

20 Ткани нарезали на фрагменты 1-3 мм³ скальпелем. По 2-5 фрагмента на лунку помещали в 24-луночный планшет (Costar) в 2 мл RPMI-1640, дополненную GlutaMAX, 25 мМ HEPES pH 7,2, 100 Ед/мл пенициллина, 100 Е/мл стрептомицина и 10% сыворотки АВ человека и 100 МЕ/мл rhIL-2 или обрабатывали, как описано ниже. Планшеты инкубировали в увлажненном инкубаторе при 37°C с 5% CO₂ в воздухе. Культуры
25 проверяли через день для контроля пролиферации лимфоцитов. Половину среды заменяли во всех лунках каждые 7 дней после начала культивирования. Лимфоциты собирали, когда плотный лимфоцитарный ковер покрывал окружающие фрагменты, или популяция лимфоцитов, полученных из обработанных тканей, достигала надлежащей концентрации, как описано ниже.

Пример 3. Ферментативная обработка ткани

30 [00134] Свежие образцы ткани от здоровых доноров получали от Кооперативной сети человеческих тканей (CHTN) и транспортировали в лабораторию в среде RPMI-1640. Лимфоциты выделяли с помощью ферментативной обработки с использованием
35 двух ферментных смесей Liberase™ DL Research Grade (Sigma Aldrich Co., Сент-Луис, Миссури) или Liberase™ TM Research Grade (Sigma Aldrich Co., Сент-Луис, Миссури). Ткани разрезали на фрагменты размером 2-3 мм³ и обрабатывали в течение 1 часа при 37°C и 5% CO₂. Обработанную клеточную суспензию пропускали через 40-микронный
40 фильтр, центрифугировали и промывали средой RPMI-1640. Клетки подсчитывали и ресуспендировали в среде RPMI (GIBCO BRL), дополненной 10% человеческой сывороткой АВ (Coming) и 100 мЕд/мл rhIL-2. Собранную клеточную популяцию высевали в количестве от 0,5 до 1×10⁶ клеток/мл в 24-луночных планшетах для
45 культивирования тканей. Клетки разделяли на среду, содержащую RPMI-IL2, когда клетки превышали концентрацию до 1,5×10⁶ клеток/мл.

Пример 4. Культура опухолевых образцов

[00135] Образцы свежих опухолей пациентов с первичным и метастатическим раком, включая рак толстой кишки, молочной железы, яичника, почек, головы и шеи, полости

рта, поджелудочной железы и печени, были получены от Кооперативной сети человеческих тканей (CHTN) транспортировали в лабораторию в среде RPMI. Образцы опухолей нарезали на фрагменты 1-3 мм³ скальпелем. По 2-5 фрагмента на лунку помещали в 24-луночный планшет (Costar) в 2 мл RPMI-1640, дополненную GlutaMAX, 25 мМ HEPES pH 7,2, 100 Ед/мл пенициллина, 100 Е/мл стрептомицина и 10% сыворотки АВ человека и 100 МЕ/мл rhIL-2. Планшеты инкубировали в увлажненном инкубаторе при 37°C с 5% CO₂ в воздухе. Культуры проверяли через день для контроля пролиферации лимфоцитов. Половину среды заменяли во всех лунках каждые 7 дней после начала культивирования. Лимфоциты собирали, когда плотный лимфоцитарный ковер покрывал окружающие фрагменты.

Пример 5. Ферментативная обработка свежих опухолевых образцов

[00136] Образцы свежих опухолей пациентов с первичным и метастатическим раком, включая рак толстой кишки, молочной железы, яичника, почек, головы и шеи, полости рта, поджелудочной железы и печени, были получены от Кооперативной сети человеческих тканей (CHTN) транспортировали в лабораторию в среде RPMI. Лимфоциты выделяли с помощью ферментативной обработки с использованием двух ферментных смесей LiberaseTM DL Research Grade (Sigma Aldrich Co., Сент-Луис, Миссури) или LiberaseTM TMResearch Grade (Sigma Aldrich Co., Сент-Луис, Миссури). Ткани нарезали на 2-3 мм³ фрагменты и обрабатывали в течение 1 часа при 37°C с 5% CO₂ в воздухе. Обработанную клеточную суспензию пропускали через 40-микронный фильтр, центрифугировали и промывали средой RPMI 1640. Клетки подсчитывали и ресуспендировали в среде RPMI (GIBCO BRL), дополненной 10% человеческой сывороткой АВ (Coming) и 100 мЕд/мл rhIL-2. Собранную клеточную популяцию высевали в количестве 0,5-1×10⁶ клеток/мл в 24-луночные планшеты для культивирования тканей. Клетки разделяли на среду, содержащую RPMI-IL2, когда клетки превышали концентрацию до 1,5×10⁶ клеток/мл.

Пример 6. Культура первичных клеток в типичной дополненной сывороткой среде

[00137] Популяции PBMC получали путем отделения от лейкоцитарных пленок, полученных от здоровых доноров, с использованием Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences, Пенсильвания, США). PBMC культивировали при 1×10⁶ клеток/мл в 24-луночном планшете для культуры ткани в RPMI-1640 (Coming CellGro), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (Gibco), 2 ммоль/л L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 ЕД/мл стрептомицина и 100 rhIL-2/мл.

[00138] Аналогичные условия культивирования могут быть использованы для выращивания первичных клеток человека, собранных из периферической крови, пуповинной крови, костного мозга, здоровых тканей или тканей, пораженных болезнью, таких как раковые ткани, описанные ранее.

Пример 7. Культура первичных клеток в типичной среде без сыворотки

[00139] Популяции PBMC получали путем отделения от лейкоцитарных пленок, полученных от здоровых доноров, с использованием Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences, Пенсильвания, США). PBMC культивировали при 1×10⁶ клеток/мл в 24-луночном планшете для культуры ткани в бессывороточной среде CTS с добавкой CTS-Optmizer.

[00140] Аналогичные условия культивирования могут быть использованы для выращивания первичных клеток человека, собранных из периферической крови,

пуповинной крови, костного мозга, здоровых тканей или тканей, пораженных болезнью, таких как раковые ткани, описанные ранее.

Пример 8. Уменьшение количества адгезивных моноцитов и макрофагов

[141] РМВС собирали методами афереза, как описано выше, и эритроциты удаляли 5 путем гипотонической обработки или разделения плотности с использованием центрифугирования с градиентом Ficoll. РМВС, не содержащие красных кровяных телец, инкубировали в крупных емкостях для тканевой культивации, таких как 10 стековая или 40 стековая клетка Factory (Nunc), роторные бутылки (Nunc). Адгезивные популяции, содержащие макрофаги и моноциты, как правило, оставались связанными 10 на поверхности емкостей для клеточной культивации. Клеточная популяция, выращенная в суспензионной популяции, обогащена $\gamma\delta$ Т-клетками. Приблизительно 10^8 , 10^9 или 10^{10} РМВС инкубировали с микрочастицами, содержащими железо и покрытыми CD4 и CD8 (например, микрочастицы Miltenyi Biotech). Инкубированную клеточную 15 популяцию пропускали сквозь магнитное поле, в котором удерживались CD4+ и CD8+ Т-клетки. «Проточная» клеточная популяция обогащалась $\gamma\delta$ Т-клетками.

Пример 9. Уменьшение количества моноцитов и макрофагов

[142] РМВС собирали методами афереза, как описано выше, и эритроциты удаляли путем гипотонической обработки или разделения плотности с использованием 20 центрифугирования с градиентом Ficoll. РМВС, не содержащие красных кровяных телец, инкубировали в крупных емкостях для тканевой культивации, таких как 10 стековая или 40 стековая клетка Factory (Nunc), роторные бутылки (Nunc). Моноциты и макрофаги удаляли путем пропускания РМВС после удаления эритроцитов через набитую стекловатой колонку. «Проточная» клеточная популяция обогащается $\gamma\delta$ Т-клетками для дальнейшей обработки. 25

Пример 10. Обогащение $\gamma\delta$ Т-клетками

[00143] РМВС собирали методами афереза, как описано выше, и эритроциты удаляли путем гипотонической обработки или разделения плотности с использованием центрифугирования с градиентом Ficoll. РМВС, не содержащие красных кровяных 30 телец, инкубировали в крупных емкостях для тканевой культивации, таких как 10 стековая или 40 стековая Cell Factory (Nunc), роторные бутылки (Nunc). Моноциты и макрофаги истощаются либо методами, описанными в примере 8, либо в примере 9.

Приблизительно 10^8 , 10^9 или 10^{10} РМВС инкубировали с микрочастицами, содержащими железо и покрытыми CD4 и CD8 (например, микрочастицы Miltenyi Biotech). 35 Инкубированную клеточную популяцию пропускали сквозь магнитное поле, в котором удерживались CD4+и CD8+Т-клетки. «Проточная» клеточная популяция обогащалась $\gamma\delta$ Т-клетками. Нежелательные клетки, такие как NK, $\gamma\delta$ Т-клетки, В-клетки, моноциты и макрофаги удаляли с помощью разделения иммуномагнитных шариков (например, системы Miltenyi Biotech AutoMACS), используя смесь антител, направленных против 40 нежелательных типов клеток.

[00144] Альтернативно, нежелательные типы клеток удаляли с использованием комплекса тетрамерных антител или биспецифического антитела, направленного против поверхностных рецепторов на NK, Т-клетках, В-клетках, моноцитах и макрофагах.

Пример 11. Выделение $\gamma\delta$ Т-клеток из первичных клеток с антителами

45 [00145] В одном примере, нативные $\gamma\delta$ Т-клетки выделяли из первичных культур с сортировкой проточной цитометрией, основываясь на положительной (т.е. $\gamma\delta$ TCR) или отрицательной (т.е. $\alpha\beta$ TCR, CD4, CD8, CD56), экспрессии маркеров клеточной поверхности.

Пример 12. Выделение $\gamma\delta$ Т-клеток из первичных опухолей

[00146] Свежие собранные образцы опухолей были получены из NCI Кооперативной сети человеческих тканей (CHTN). Метастазы аденокарциномы толстой кишки в печени (TIL 1) и почечную опухоль (TIL 2) транспортировали в среде RPMI-1640. Опухолевые

5 ткани измельчали на небольшие кусочки размером 2 мм³ с использованием плоского лезвия с последующей обработкой 2 мл смеси фермента либеразы (Sigma Chemical Co., Сент-Луис, Миссури) в RPMI и 3000 единиц ДНКазы, как описано. После обработки опухоли фильтровали через стерильную 40 микронную сетку из нейлона и дважды

10 промывали в RPMI-1640. Клетки подсчитывали и высевали в 24-луночный планшет при 1×10⁶/мл в RPMI-1640, содержащем 10% человеческой сыворотки АВ, дополненной L-глутамином и 100 ЕД/мл rhIL-2. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты собирали через 6 дней культивирования. Наличие $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов анализировали с помощью

15 проточной цитометрии анти- δ 1 TCR (конъюгированный с FITC анти-V δ 1TS8.2, (Thermo Fisher) и анти-V δ 2 B6 (Biolegend). Данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo.

[00147] Фиг. 4 иллюстрирует график, демонстрирующий рост $\gamma\delta$ 1 и $\gamma\delta$ 2 лимфоцитов, выделенных из метастазов аденокарциномы толстой кишки в печени (TIL 1) и почечных

20 опухолей (TIL 2). Было показано, что эти лимфоциты экспрессировали CCR4 и CCR7. Как проиллюстрировано на фиг. 4, V δ 1 подгруппа была преобладающей популяцией, выделенной из обоих типов опухолей.

Пример 13. Стимуляция и размножение $\gamma\delta$ Т-клеток

[00148] $\gamma\delta$ Т-клетки стимулировали и размножали в бессывороточных средах, таких как Ex-Vivo 10, Ex-Vivo 15, Ex-Vivo 20, AIMV среда, Optimizer CTS, содержащих цитокины (IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, IL-12, IL-21, IL-23 или IL-33), факторы роста (инсулин и

25 трансферрин, инсулиноподобные факторы роста), альбумин, липиды (холестерин, липидные растворы, липидные прекурсоры), витамины, медь, железо, селен, белковый гидролизат, незаменимые аминокислоты, незаменимые аминокислоты и защитное средство от сдвига (Pluronic F-68).

[00149] Среда без сыворотки, описанная в этих примерах, может быть дополнена

30 добавками для поддержания высокой плотности роста $\gamma\delta$ Т-клеток от 10⁵ до 2×10⁷ клеток/мл в суспензионной культуре (например, биореактор WAVE), при сохранении биологической функциональности $\gamma\delta$ Т-клеток.

Пример 14. Добавки, обеспечивающие устойчивый рост $\gamma\delta$ Т-клеток в среде без сыворотки

[00150] Дополнительные добавки, которые обеспечивают устойчивый рост $\gamma\delta$ Т-клеток, включают хлорид кальция, ангидрид, нитрат кальция, сульфат меди, пентагидрат, цитрат железа, нитрат железа, сульфат железа, сульфат цинка и/или путресцин.

[00151] Металлы микроэлементы были предусмотрены в среде без сыворотки для обеспечения низкого уровня элементарных компонентов для замены сыворотки, включая

40 парамолибдат аммония, ванадий, манганы, никель, селенит натрия, метасиликат натрия, неонагидрат, хлорид олова, хлорид алюминия, ацетат бария, хлорид кадмия, хлористый хром, кобальт, двуокись германия, бромид калия, йодид калия, хлорид рубидия, нитрат серебра, фторид натрия и/или цирконилхлорид.

[00152] Другие компоненты, добавленные в среду для культивирования клеток, которые поддерживают устойчивый рост $\gamma\delta$ Т-клеток представляют собой аденозин, гуанозин, цитидин, уридин, бетаин, таурин, фолиновую кислоту, этаноламин, линолевую

45 кислоту, гидрокортизон олеиновой кислоты, пируват, гидролизаты растений, гидролизаты дрожжей и/или бета-меркаптоэтанол.

[00153] Витамины, добавленные для повышения устойчивости роста $\gamma\delta$ Т-клеток включают: Биотин (В7), пантотенат D-кальция (В5), холинхлорид, цианокобаламин (В12), фолиевую кислоту (В9), *l*-инозитол (мио-инозитол), ниацинамид (В3), пиридоксаль, моногидрохлорид, пиридоксин, моногидрохлорид (В6), Рибофлавин (В2), тиамин и/или моногидрохлорид (В1).

Пример 15. Характеристика размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток: Иммунофенотип

[00154] Размноженные популяции Т-клеток характеризуются окрашиванием FACS для маркеров клеточной поверхности, которые отличают разные популяции. Клетки промывали один раз в забуференном HEPES солевом растворе (HBSS), содержащем 2% фетальной бычьей сыворотки, инкубировали с соответствующими количествами МАb при 4°C в течение 30 минут и повторно промывали в HBSS. Вкратце, 1×10^6 клеток окрашивали в 100 мкл объема FACS-окрашивающей среды (FSM, HBSS, содержащей 2% фетальную бычью сыворотку), содержащей флуоризотиоцианат (FITC) или фикоэритрин (PE) конъюгированные МАb, направленные против CD2, CD3 (BioLegend, клон ОКТ3), CD4 (BioLegend клон ОКТ4), CD7, CD8 (BioLegend, клон РРАТ8), CD11a, CD16, CD18, CD19, CD27, CD28, CD38, CD45RA, CD56, CD57, CD69, CD71, CD95, CD107, ICAM-1 MICA/B, NKG2D DR5, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5 CCR6, CCR7, CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR5, CXCR5, CXCR6, CXCR7, IL-2R, IL-7R, Ki67, L-селектина, VLA-4, JAML, PD1, PDL1, CTLA-4, Oх40, TCR V δ 1 (ThermoFisher Scientific, клон TS8.2) или TCR V δ 2 (BioLegend, клон В6).

[00155] В дополнение к поверхностным маркерам, охарактеризована секреция цитокинов, внутриклеточных цитокинов и/или связанных с мембраной цитокинов, включая TNF- α IFN- γ , GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-17 или IL-21.

[00156] Живые клетки определяли по отсутствию или низкому включению аминокислотного красителя зомби-фиолетового (BioLegend). Контроли флуоресценции Minus One (FMO) используются для определения положительных и отрицательных границ ворот поверхностной экспрессии каждого антигена. Окрашенные клетки собирали на цитометре Sony SH800 и анализировали данные с использованием FlowJo v10. 1. Данные проточной цитометрии визуализировались как точечные графики.

Пример 16. Размножение δ 2 Т-клеток в средах с сывороткой и без сывороток

[157] Рост и скорость размножения различных δ 2 Т-клеток оценивали в среде, содержащей сыворотку (R2: RPMI+10% FBS), и бессывороточной среде (AIMV+бычий альбумин, CTS добавка без сыворотки). **ФИГ. 5** иллюстрирует график, демонстрирующий рост δ 2 Т-клеток. Все среды, используемые в текущем эксперименте, содержали 100 МЕ/мл IL-2, 2 мМ глутамин и 1х пенициллина/стрептомицина. Кроме того, клетки стимулировали Золедроновой кислотой при 1, 5 и 20 мкМ в день 0. Среду пополняли каждые 2-3 дня без дополнительного добавления золедроновой кислоты. Общее число δ 2 Т-клеток, размноженных от 10^6 РВМС, и кратность размножения каждой из обработок после периода 13 дня показано на **фиг. 5**.

Пример 17. Блокирующие и конкурирующие анализы антител анти- $\gamma\delta$ TCR

[00158] **Фиг. 6** и **Фиг. 7** иллюстрируют графики, демонстрирующие эксперименты по блокированию антител анти- $\gamma\delta$ TCR и **фиг. 8** и **Фиг. 9** иллюстрируют конкурентные анализы на антитела. **Фиг. 6** и **Фиг. 7** иллюстрируют результаты экспериментов по блокированию, когда РВМС предварительно инкубировали с различными антителами, а именно 5А6.Е9, В1, TS8.2, 15D, В3, В6, TS-1, γ 3.20, IMMU510 или 11F2. Клетки в дальнейшем промывали и окрашивали вторичными TS8.2-FITC (δ 1-специфичными) или В6-РЕ (δ 2-специфическими) антителами. Образцы РВМС анализировали проточной цитометрией. Для оценки степени блокировки использовали уменьшение средней

геометрической интенсивности флуоресценции (gMFI). Уровень ингибирования проиллюстрирован против TS8.2-FITC (фиг. 6) и против B6-PE (фиг. 7).

[00159] Исследования конкуренции между MAб TS-1 и TS8.2 и антителами 5A6, E9, B1, IMMU510, R9.12-2 или 11F2 для связывания на $\gamma\delta$ экспрессирующей TCR клеточной

линии BE13 осуществляли путем инкубирования 1×10^5 клеток с 1, 2 или 10 мкг немеченого конкурирующего антитела (IgG1, 5A6.E9, B1, TS8.2, TS-1, R9.12, IMMU510 или 11F2) и 0,2 мкг конъюгированного с FITC анти-V δ 1 TCR клона TS8.2 (фиг. 8) или анти-V δ 1 TCR клона TS-1 (фиг. 9) одновременно на льду в течение 30 минут. % Конкуренции рассчитывался путем изменения средней геометрической флуоресценции, деленной на максимальное изменение средней геометрической флуоресценции. Как проиллюстрировано на фиг. 9, антитело TS-1 конкурировало с TS8.2 за связывание с клетками так же эффективно, как и само антитело TS8.2. Ни одно из других антител не могло конкурировать с TS8.2. TS8.2 антитело конкурировало с TS-1 за связывание с клетками, но не так эффективно, как само TS-1. Некоторый уровень конкуренции с TS-1 связыванием также наблюдался с антителом 11F2. Эти результаты демонстрируют, что антитела TS-1 и TS8.2 связываются как $\gamma\delta$ 1, но, вероятно, не с одним и тем же эпитопом.

Пример 18. Ферментативная обработка опухолевых образцов и размножение $\gamma\delta$ Т-клеток с помощью антител к специфичным $\gamma\delta$ эпитопам

[00160] 24-луночные планшеты покрывали 0,5-1 мкг анти- $\gamma\delta$ TCR антителами. Клетки, выделенные из обработанных опухолевых тканей, как описано в примере 10, подсчитывали и высевали на лунки с антителами при $0,5-1 \times 10^6$ клеток/мл в среде RPMI 1640, дополненной 10% человеческой сывороткой АВ и rhIL-2 (100 МЕ/мл), Культуры инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 74-21 дня.

Пример 19. Ферментативная обработка опухолевых образцов и размножение $\gamma\delta$ Т-клеток с помощью антител к специфичным $\gamma\delta$ эпитопам

[00161] Клетки, выделенные из расщепленных обработанных тканей, как описано в примере 5, подсчитывали и высевали на лунки, покрытые антителами, на планшете для трехмерного культивирования клеток (Coming® Costar® Ultra-Low attachment multi well plates) при $0,5-1 \times 10^6$ клеток/мл в среде RPMI 1640, дополненной 10% человеческой сывороткой АВ и rhIL-2 (100 МЕ/мл). Культуры инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 74-21 дня.

Пример 20. Активация и размножение $\gamma\delta$ Т-клеток из РВМС

[00162] Активирующие агенты испытывали либо в виде растворимых агентов, либо агентов, иммобилизованных в лунках для культивирования. Растворимые антигены и антитела добавляли при конечной концентрации 0,1-5 мкг/мл для РВМС человека, культивируемых на 24-луночном планшете при плотности клеток 1×10^6 клеток/мл. Альтернативно, такие же анти $\gamma\delta$ TCR-антитела иммобилизуют, покрывая лунки 24-луночных культуральных планшетов. Анти $\gamma\delta$ TCR-антитела добавляли при концентрации 0,1-10 мкг/мл. Лунки дважды промывали PBS, затем РВМС переносили на планшеты и культивировали либо в средах либо RPMI-1640, AIM-V, либо в CTS-OpTizer, как описано выше. Культуральная среда была дополнена с 100 МЕ/мл rhIL-2.

Пример 21. Активация и размножение $\gamma\delta$ Т-клеток из РВМС

[00163] Один миллион РВМС/мл от донора В3 стимулировали в день 0 различными антителами, иммобилизованными при 0,5, 1 и 2 мкг на лунку в 24-луночных планшетах. Тестируемыми антителами были контрольный клон MG1-45 (Bio Legend) мышинного

IgG1 Isotype, UCHT-1, 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, γ 3.20, 7A5 и Золедронат. **Фиг. 10** и **Фиг. 11** иллюстрируют графики, демонстрирующие активацию и размножение δ 1 и δ 2 Т-клеток соответственно из РВМС. Клетки активировали и размножали в средах, содержащих RPMI с 10% FBS, 100 МЕ/мл rhIL-2, глутамином и Ix-пенициллином стрептомицином. В день 7 после первоначальной стимуляции клетки пассивировали в свежих средах и помещали в 24-луночный планшет, заново покрытый теми же антителами в тех же концентрациях. Среда в повторно стимулированных культурах пополнялась каждые 2-3 дня до 13-го дня и анализировалась проточной цитометрией.

[00164] **Фиг. 12** иллюстрирует общее количество δ 1 Т-клеток, и **фиг. 13** иллюстрирует общее количество δ 2 Т-клеток после 13 дня роста и размножения. Общее количество $\gamma\delta$ Т-клеток рассчитывали, умножая процент δ 1 и δ 2 Т-клеток (как определено методом проточной цитометрии с использованием TS8.2-FITC и B6-PE, соответственно) по общему числу жизнеспособных клеток и вычитанию отрицательных контрольных значений из δ 1 и δ 2 Т-клеток, активированных неспецифическим мышинным IgG MG 1-45.

[00165] Активация размножения клеток была получена только тогда, когда антитела были иммобилизованы на культуральных планшетах, без обнаруженного размножения, когда эти антитела были добавлены к культуре в растворимой форме, включая всю популяцию клеток РВМС (данные не показаны). Пан $\gamma\delta$ TCR MAb 5A6.E9 и B1 и активировали рост обоих δ 1 и δ 2 клеточных популяций. MAb 15D и B6 индуцировали селективный рост δ 2 клеточной популяции. MAb TS8.2 и TS-1 индуцировали селективный рост δ 1 клеточной популяции. Интересно, что хотя MAb TS-1 и TS8.2 конкурировали друг с другом при связывании с клеточной поверхностью, TCR, TS-1 индуцированная пролиферация была в 3 раза выше. Аналогичным образом различная степень индукции пролиферации популяции δ 2 клеток была обнаружена между антителами B1, 5A6.E9, 15D, B6 и B3. Эти данные показывают, что уникальные эпитопы необходимы для запуска специфического и устойчивого размножения $\gamma\delta$ клеточных популяций.

[00166] Пример 22. Картирование эпитопов активации $\gamma\delta$ TAB MAb

[00167] Специфические активирующие эпитопы на $\gamma\delta$ TCR идентифицированы, как описано ниже для TS-1 MAb. Аналогичные шаги проводятся для идентификации активирующих эпитопов других $\gamma\delta$ активирующих антител, описанных в данном документе.

[00168] Во-первых, идентифицирована специфическая $\gamma\delta$ рекомбинация, которая распознается TS-1. Антитело TS-1 (Thermo Fisher Scientific) создавали иммунизацией мышей $\gamma\delta$ клеточной линией MOLT-13 острой лимфобластной лейкемии Т-клеток человека (Brenner et al., US 005260223A). Мы секвенировали цепи $\gamma\delta$ TCR MOLT-13 и определили специфическую перегруппировку δ цепи, которая состоит из V δ 1D δ 3J δ 1 сегментов гена. Чтобы определить, относится ли специфичность связывания TS-1 к вариативной области V δ 1, или если сайт связывания охватывает участок CDR3 TCR, который включает V δ 1 - J δ 1, и оценить роль γ цепи в распознавании эпитопов, обширный набор γ и δ цепей клонировали в векторе экспрессии pCI (Promega). Разные сконструированные γ и δ цепи TCR были заказаны как синтетические gBlock из IDT. Синтетические гены, обработанные с помощью NheI-NotI, клонировали в вектор pCI-нео. Последовательность плазмидной ДНК из отдельных бактериальных колоний подтверждалась секвенированием.

[00169] Были сконструированы три V δ 1 сегмента гена, отличающиеся по своим J δ участкам (J δ 1, J δ 2 и J δ 3). Кроме того, V δ 2J δ 1 и V δ 3J δ 1 цепи упорядочены как синтетические гены и клонированы аналогичным образом. 5 δ TCR цепей (V δ 1J δ 1,

V δ 1J δ 2, V δ 1J δ 3, V δ 2 и V δ 3), должны были быть трансфецированы с γ TCR цепями с использованием V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5, V γ 8, V γ 9 и V γ 10 сегментов гена. 35 возможных комбинаций спаривания $\gamma\delta$ TCR трансфицировали и экспрессировали на поверхности 293 трансфецированных клеток. Кратковременную трансфекцию 293

5 клеток с векторами pCI, кодирующими $\gamma\delta$ цепи, выполняли с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Трансфецированные 293 клетки характеризовались экспрессией $\gamma\delta$ TCR с помощью проточной цитометрии с использованием набора анти- $\gamma\delta$ TCR антител различной специфичности. Анализы FACS проводились на проточном цитометре FACSCanto (BD Biosciences) и анализировались с использованием

10 программного обеспечения FlowJo (Tree Star). Как только специфичное спаривание $\gamma\delta$ TCR цепей, которое распознавалось с помощью mAb TS-1, было идентифицировано, специфический связывающий эпитоп характеризовали как линейный или как конформационно зависимый.

[00170] Способность антитела связываться с денатурированным или нативным TCR

15 подтверждалась анализом Вестерн-блоттинга. Клеточные лизаты клеток, экспрессирующих TCR, получали гомогенизацией в охлажденном льдом модифицированном буфере для лизиса RIPA с использованием смеси ингибиторов протеазы (Sigma). Концентрацию белка определяли с помощью анализа Брэдфорда (анализ белка Bio-Rad, анализ Microplate Standard). Клеточный лизат кипятили в течение

20 5 мин в 1x SDS нагрузочном буфере (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 12,5% глицерина, 1% додецилсульфата натрия, 0,01% бромфенолового синего), содержащего 5% b-меркаптоэтанола, и проводили электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE). После электрофореза выделенные молекулы переносили на мембрану PVDF. Затем мембрану блокировали и инкубировали с антителом. Вторичное флуоресцентно меченное антитело

25 использовали для обнаружения с помощью флуоресцентной системы визуализации.

[00171] В случае, если связывание с δ цепью обнаруживается с помощью Вестерн-блот-анализа, используется набор синтетических-связанных с мембраной перекрывающихся пептидов, полученных из полипептидной последовательности

30 реакционной цепи. (JPT пептид технологии GmbH Германия). Пептидный массив состоит из перекрывающихся 12-мерных пептидов, SPOTscan анализ с одним остаточным смещением, покрывающим всю V δ 1 последовательность, выполняли следующим образом. Мембрану промывали три раза в TBS и блокировали в течение ночи в блокирующем буфере (5% молока с низким содержанием жира в TBST (0,05% Tween 20 в TBS)). Мембрану промывали в TBS и инкубировали с TCs-1 MAb, разведенным в

35 блокирующем буфере, при 1 мкг/мл в течение 3 часов при комнатной температуре.

[00172] После трехкратного промывания мембраны в TBS связанный MAb детектировали конъюгированным с HRP козьим антимышиным IgG (Jackson immunReaserch), разведенным в блокирующем буфере в течение 2 часов при комнатной температуре. Мембрану окончательно промывали три раза в TBS и инкубировали с

40 раствором для модифицирования сигнала. Цветовой реакции дали развиваться в течение 10-40 мин при комнатной температуре. Сайт связывания проявлялся последовательностью положительных пептидных пятен.

Пример 23. Эпитопное картирование конформационного эпитопа

[00173] Эпитопы, для которых необходимо образование дисульфидных связей для

45 правильной укладки/сборки связывающего эпитопа антитела, известны как конформационные эпитопы. Идентификация критических связывающих остатков может быть выполнена путем сайт-направленного мутагенеза реакционной V-дельта-цепи. Мутантные цепи тестировали на потерю реакционной способности к конкретному

антителу. Остаток, охватываемый сайтом связывания, может быть идентифицирован, когда мутагенез критического остатка в других нереконструктивных цепях приводит к восстановлению связывания антитела TS-1.

[00174] Случайное Ala- сканирование реакционноспособных цепей TCR можно использовать для оценки изменения аффинности связывания, потери распознавания или повышения аффинности с помощью mAb TS-1.

Пример 24. Эпитопное картирование новых модуляторов активации и размножения дТ-клеток

[00175] CD2 эпитопы:

[00176] Молекула CD2 состоит из двух внеклеточных доменов суперсемейства иммуноглобулинов: Ig-подобного домена V-типа и Ig-подобного домена C-типа, для которых описаны три основные иммуногенные участки (Davis et al., Immunol Today 1996, 17: 177-187). Участки 1 и 2 расположены в первом домене, а участок 3 - во втором домене. Моноклональные антитела (MAb), которые распознают участок 1, связывают как находящиеся в покое, так и активированные Т-клетки и могут сильно ингибировать связывание CD58 с CD2. Моноклональные антитела, которые распознают участок 2, обладают сходными связывающими свойствами, но не эффективны при блокировании связывания CD58. Моноклональные антитела, которые распознают участок 3, распознают CD2 только на активированных Т-клетках и не блокируют связывание CD58.

[00177] Картирование связывающего эпитопа MAb агониста CD2 проводят конкурентным анализом против CD58, природного лиганда CD2 и анализов активации. Кроме того, сайт-направленный мутагенез критических CD2-связывающих остатков, который приводит к потере связывания CD58, тестируется на связывание MAb. Примеры мутаций включают мутагенез последовательности CD2 в положении 67 (от К до R), 70 (от Q до K), 110 (от Y до D) и в положении 111 (от D до H). Для разработки конструкций для картирования эпитопа связывания CD2 проводили выравнивание последовательностей CD2 человека и мыши с использованием VectorNTI (Thermo Fisher). Выравнивания демонстрировали гомологию последовательности 50% между CD2 человека и мыши. MAb, которые связывали внеклеточный домен человеческого CD2, как ожидается, не будет реагировать с CD2 мыши. Чтобы идентифицировать эпитопы связывания, мы производили перестройку доменов мышинных/человеческих химерных конструкций CD2. В таких конструкциях человеческий N-концевой Ig-подобный домен V-типа (остатки 25-128) замещали мышинными остатками (23-121) в экспрессирующем векторе, который экспрессировал внеклеточный домен CD2. Химерные виды кДНК временно трансфицировали в клетки CHO или 293. Человеческие CD2 дикого типа и человеческие мышинные химерные конструкции экспрессируются на поверхности клеток CHO. Экспрессия химерного CD2 на клеточной поверхности анализируется с помощью FACScanto. Связывание или потеря связывания с химерной молекулой выявляется методом проточной цитометрии и подтверждается активационными исследованиями.

[00178] NKG2D эпитопы:

[00179] Эпитопное картирование активационных MAb против NKG2D тестировали по способности анти-hNKG2D-антитела снижать или блокировать взаимодействия NKG2D с одним или несколькими его лигандами (MICA/MICB) или путем конкуренции с антителом, как известно, способным блокировать hNKG2D-лиганд взаимодействие. Агонист MAb идентифицируют по его способности уменьшать NKG2D-опосредованную активацию NK или Т-клеток. Это может быть оценено с помощью типичных анализов

цитотоксичности, добавления лиганд-блокирующих антител или путем блокирования $\gamma\delta$ Т-клеток опосредованной гибели МІСА-экспрессирующих опухолевых клеток дозозависимым образом.

[00180] CD27 эпитопы:

- 5 [00181] Эпитопное картирование антител агонистов против CD27 осуществляется функциональным анализом и анализом их способности блокировать взаимодействие между человеческим CD27 и его природным человеческим лигандом CD70. CD27-экспрессирующие клетки инкубировали в течение 30 мин с 5 мкг МАb при 4°C, после чего в пробирку добавляли 1 мкг биотинилированного CD70. Смесь инкубировали в
10 течение еще 15 мин при 4°C перед промыванием. Затем клетки инкубировали в течение 30 мин со смесью стрептавидин-РЕ (для определения связывания лиганда CD70) с последующим проведением нескольких стадий промывки и анализом с использованием FACS. Блокирование связывания CD70 указывает на то, что МАb и CD70 имели один и тот же эпитоп.

15 **Пример 25. Характеристика TCR V δ спектра популяции размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток**

- [00182] Клональное разнообразие размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток от индивидуальных доноров оцениваются с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Клональное разнообразие свежих выделенных РВМС от здоровых доноров сравнивали с
20 клональным разнообразием культур, которые стимулировали в течение 7 и 13 дней с различными активирующими агентами, описанными в данном документе, включая анти-TCR специфические антитела, лиганд и лектины.

- [00183] Из вышеупомянутых $\gamma\delta$ Т-клеток выделяли РНК, обратно транскрибировали в кДНК и амплифицировали с помощью ПЦР с использованием V δ 1, V δ 2 и V δ 3-специфических пар праймеров. V δ 1 прямой праймер (5'ATGCTGTTCTCCAGCCTGCT
25 GTGTGTATT 3', SEQ ID NO: 1) V δ 2 прямой праймер (5'ATGCAGAGGATCTCCTCCC TCATCCATCT 3'; SEQ ID NO: 2) и V δ 3 прямой праймер (5'ATGATTCTTACTGTGGGCT TTAGCTTTT 3'; SEQ ID NO: 3) использовали в комбинации с A C δ обратным праймером (5'CTTGGGGTAGAATTCCTTCACCAGACAAGC3'; SEQ ID NO: 4) для амплификации 500 п.о. ДНК фрагментов.

- 30 [00184] γ Цепь была амплифицирована в отделенной ОТ-ПЦР реакции с использованием V γ специфических праймеров для амплификации V γ 2, V γ 3, V γ 4 и V γ 5 (5'GGTGCTTCTAGCTTTCCTGTCTCCTGC3'), V γ 8 (5'ATGCTGTTGGCTCTAGCTCTGCTTCTA3') и V γ 9 (5'ATGCTGTCACTGCTCCACACAT CAACG3') V γ праймеры сопряжены с C γ обратным праймером
35 (5'GGAAGAAAAATAGTGGGCTTGGGGGAA3'). γ обратный праймер, основанный на консенсусной последовательности C γ 1 и C γ 2. ПЦР-фрагменты клонировали и получали нуклеотидную последовательность 80 независимых V γ вставок. Анализировали V δ , D δ и J δ сопоставленные последовательности, а также выравнивание последовательности CDR3.

40 **Пример 26. МАb и связанные с ними целевые конструкции для модификации $\gamma\delta$ Т-клеток**

- [00185] Человеческий ген CD20 получали из клона кДНК (Origene Technologies, Inc., 6 Taft Court, Suite 100, Rockville, Md. 20850). Ген CD20 амплифицировали с использованием прямого праймера (5'ATGACAACACCCAGAAATTCAGTAAATGG3') и обратного праймера (5'TCAAGGAGAGCTGTCAATTTCTATTGGTG3') амплифицированную кДНК
45 CD20 встраивали в pCDNA3.4 (Thermo Fisher Scientific) как вектор высокой экспрессии для клеток млекопитающих и трансфицировали в клетки CHO как клетки-хозяева. Рекомбинантные клетки CHO (клетки CD20/CHO), экспрессирующие молекулы CD20 на высоком уровне на их клеточных поверхностях, были идентифицированы с помощью

анализа FACS.

[00186] Клетки CD20/CHO использовали для иммунизации мышей BALB/C или трансгенных мышей, модифицированных для получения полностью человеческих антител, как описано у Jakobovits and Bornstein (Jakobovits Curr. Opin. Biotechnol. 1995 6: 561-6; Bornstein et al., Invest New Drugs. 2010 28:561-74.). Антитела с высокой аффинностью и специфичностью по отношению к CD20 человека подвергали скринингу с помощью анализа FACS. Мышечные антитела гуманизировали с помощью CDR-прививки (Kim and Hong Methods Mol Biol. 2012;907:237-45. Однодоменные человеческие антитела CD20 также создавались от мышей или крыс, модифицированных для продуцирования однодоменных человеческих антител тяжелой цепи (Janssens et al., PNAS 2006, vol. 103: 15130).

[00187] Ген, кодирующий антитело CD20 высокой специфичности/специфичности, описанный выше, клонировали в основную цепь ретровирусного вектора MSGV1 или лентивирусный вектор pCAG. VH и VL домены клонировали либо из мышинной гибридомы, экспрессирующей выбранное MAb, либо из гуманизированных цепей антитела. $\gamma\delta$ Т-клетки были модифицированы с CD20 MAb, описанными в данном документе.

Пример 27. Конструкции TCR для модификации $\gamma\delta$ Т-клеток

[188] Конструкции, экспрессирующие TCR, содержащие последовательности высокореакционных цепей $\alpha\beta$ TCR выделяли из Т-лимфоцитов, экспрессирующих комплексы специфичных пептидов NY-ESO-1-МНС. Комплексы специфических пептидов NY-ESO-1-МНС индуцировали потенциальную *in vitro* и *in vivo* противоопухолевую активность против различных опухолей, экспрессирующих NYESO-1.

[00189] Высокореакционные цепи $\alpha\beta$ TCR были выделены из меланомы, саркомы пациентов или из мышей, несущих полученные от пациента ксенотрансплантаты, полученные из человеческой меланомы или саркомы. Альтернативно, TCR были получены из мышей, измененных таким образом, что имели гуманизированную иммунную систему, которая экспрессирует пептиды NY-ESO-1 или комплексы NYESO-1-пептид (см. Gonzales et al., Immunol Res. 2013 57: 326-334; Boucherma et al., J Immuno. 2013. 191; 583-593; Liang-PingL. Et al., Nature Med. 2010, 16:1029-1035). Были определены Т-клетки, которые распознавали эпитопы NY-ESO-1 в контексте доминанты аллелей HLA-A* 02 класса I (например, пептид SLLMWITQC остатки 157-167) и доминанты HLA-A* 01-связанного пептида.

[00190] Последовательности TCR α и TCR β транскриптов генерировали с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием набора одностадийной ОТ-ПЦР (Qiagen Hilden Germany) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Первую цепь кДНК генерировали из РНК, выделенной из реактивной Т-клетки. Тотальную РНК выделяли с помощью TRIzol реагента для выделения тотальной РНК (Invitrogen Life Technologies) из клонов CTL. Амплификацию цепей TCR α и β проводили с помощью набора вырожденных праймеров, которые могут связываться с высококонсервативным участком цепи TCR α и β V-участков, сосредоточенных вокруг остатков триптофана-тирозина в аминокислотных положениях 34 и 35 (нумерация Кабата), использовали в комбинации с α и β константным участком обратных праймеров (Moonka and Loh Journal Immunological Methods 169 (1994) 41-51). Амплифицированные фрагменты ПЦР очищали из геля и непосредственно секвенировали. Информация о последовательности использовалась для разработки праймеров ПЦР, подходящих для клонирования отдельных полноразмерных кДНК.

[00191] Гены TCR клонировали и встраивали в ретровирусные векторы на основе

MSGV и полноразмерных кДНК, амплифицированных из отобранных Т-клеток.

Ретровирусные векторы, кодирующие как α , так и β цепи реактивного человеческого TCR дикого типа NY-ESO-1 конструировали с использованием основной цепи MSGV1. Связывание TCR α и TCR β цепей осуществляли с помощью элемента участка внутренней

5 посадки рибосомы (IRES) в одной конструкции или путем разделения с использованием расщепляемой пептидной последовательности пиковирусов.

[00192] Ретровирусные супернатанты производили путем совместной трансфекции клеток 293, которые стабильно экспрессировали MAGV gag и pol белки с каждым вектором TCR MSGV1 и вектором, кодирующим эндогенный ретровирусный белок

10 оболочки, используя Lipofectamine 2000 (Invitrogen), как описано ранее, или электропорацией с использованием Nucleofector (Lonza). Супернатанты собирали в день 2 и 3 после трансфекции и разбавляли 1: 1 свежей DMEM, содержащей 10% FCS. Модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки способны надлежащим образом экспрессировать гены, кодирующие TCR α и β цепи без каких-либо дальнейших манипуляций.

15 **Пример 28. Модификация $\gamma\delta$ Т-клеток с конструкцией $\alpha\beta$ TCR**

[00193] Полинуклеотид, содержащий $\alpha\beta$ TCR (фрагмент распознавания опухолей) клонировали из Т-клеток, выбранных таким образом, чтобы быть специфичными к желаемому антигену, используя стандартные методики. Выделенные эндогенные $\gamma\delta$ Т-клетки дикого типа выращивали способами, описанными в предыдущих примерах, по

20 меньшей мере, до 6×10^6 клеток для того, чтобы инфицировать ретровирусом или лентивирусом, содержащим экспрессионную кассету, кодирующую фрагмент распознавания опухолей. Стандартный протокол для вирусной инфекции может быть использован для введения векторной системы в $\gamma\delta$ Т-клетку дикого типа. Экспрессия селективного маркера используется для выбора клеток, которые были успешно

25 трансфицированы.

[00194] Экспрессия модифицированного $\alpha\beta$ TCR может быть оценена методом проточной цитометрии и/или количественной QRT-PCR и функциональными анализами с клетками-мишенями для цитотоксичности и секрецией цитокинов. Экспрессия модифицированного домена активации также может быть оценена методом проточной

30 цитометрии и/или количественной qRT-PCR. Количество модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток, экспрессирующих маркер клеточной поверхности, представляющий интерес, определяли с помощью проточной цитометрии. Модифицированная $\gamma\delta$ Т-клетка дополнительно модифицирована с использованием подходящей методики, описанной в данном документе, такой как технологии CRISPR-Cas, talen, мегануклеазы, цинковые

35 пальцы или «спящая красавица» для удаления экзона, связанного с геном HLA или β 2M.

Пример 29. Модификация $\gamma\delta$ Т-клеток с конструкциями CAR и TCR

[195] $\gamma\delta$ Т-клетки трансдуцировали с векторами на основе ретро- или лентивирусов для экспрессии целевых фрагментов, которые могут направлять модифицированные

40 $\gamma\delta$ Т-клетки для специфического распознавания опухолевых клеток и активации, чтобы убить их. Трансдуцированные целевые фрагменты включали MAб, направленные против опухоль-специфичных поверхностных белков или опухоль-специфичных внутриклеточных пептидов. $\gamma\delta$ Т-клетки также были модифицированы с TCR высокой аффинности, направленными на комплексы пептид-МНС.

45 [00196] Альтернативно, клетки могут быть модифицированы посредством трансдукции с невирусными векторами.

Пример 30. Модификация выделенных $\gamma\delta$ Т-клеток с целевыми фрагментами

[00197] Разработка CAR конструкции включает различные основные функциональные

домены, целевой фрагмент, который распознает белок или ассоциированный с МНС пептид, представляющий интерес, проявляющийся на опухолевой клетке, короткий спейсер, который соединяет элемент направленного внеклеточного рецептора с трансмембранным доменом, который пронизывает клеточную мембрану и соединяется с внутриклеточным сигнальным доменом активации.

[00198] Рецептор целевого фрагмента, экспрессируемый на поверхности $\gamma\delta$ Т-клетки будет модифицирован таким образом, чтобы специфически связываться с белком-мишенью, который экспрессируется на раковой клетке. Фрагменты распознавания опухолей будут модифицированы против мишеней лейкемии, включая CD19, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, альфафетопротейн (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, PLIF, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, гликолипид F77, белок, активирующий фибробласты, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, Мезотелин, c-met, CSPG4, нектин-4, VEGFR2, PSCA, белок/рецептор, связывающий фолат, SLC44A4, Cripto, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R и SLTRK6.

[00199] Рецептор целевого фрагмента может быть получен из части антитела, специфичного к гликопротеину опухоли, экспрессируемого на поверхности опухолевых клеток, или, альтернативно, модифицированный рецептор может быть получен из рецептора TCR с известной специфичностью, или антитела, распознающего специфическую пептидную последовательность, полученную из внутриклеточного опухолевого специфического антигена, представленного на поверхности в ассоциации с комплексом МНС, включая gp100, MART1, тирозиназу, SSX2, SSX4, NYESO-1, эпителиальный опухолевый антиген (ETA), гены семейства MAGEA (такие как MAGE3A, MAGE4A), KKLС1, мутированный ras, β Raf, p53, молекулу А, связанную с цепью МНС класса I (MICA), молекулу В, связанную с цепью МНС класса I (MICB), HPV или CMV. Такой высокоаффинный рецептор Т-клеток, подобный фрагменту распознавания опухолей, будет распознавать комплекс пептид-МНС с высокой степенью специфичности.

Пример 31. Нацеливание конструкций фрагмента со спейсером и трансмембранным доменом

[00200] Различные спейсеры будут модифицированы в конструкцию фрагмента распознавания опухолей, чтобы оптимизировать эффективность модифицированной Т-клетки в отношении раковой клетки. Размер каждого спейсера будет варьировать в зависимости от размера целевого белка, эпитопа, распознаваемого рецептором, размера модифицированного фрагмента распознавания опухоли и аффинности рецептора. Спейсеры, которые могут вместить конформационные изменения, включая последовательности шарнирного участка человеческого IgG, CD8a и CD4.

[00201] Спейсеры, которые тестировали, состоят из аминокислот Gly, Ser и Thr, используемых на разной длине (от 19 до 9 остатков), чтобы обеспечить химерный рецептор с улучшенными свойствами аффинности связывания. Шарнирная и трансмембранная части каждой конструкции получены из последовательности CD8a (остатки 117-178 человеческого CD8a) или, альтернативно, кДНК шарнира человеческого IgG1-Fc с трансмембранным доменом CD28 (остатки 153-179).

Пример 32. Нацеливание конструкций фрагментов с ко-стимулирующими доменами

[00202] Различные ко-стимулирующие домены будут модифицированы в конструкцию, содержащую фрагмент распознавания опухолей. Ко-стимулирующий домен, содержащий костимуляторный сигнальный домен CD28, 4-1BB, CD2, CD27, NKG2D, CD161, CD30, JAML, CD244 или CD100, модифицирован в виде $\gamma\delta$ Т-клетки, чтобы имитировать

«второй сигнал», который усиливает активацию через химерный рецептор, что приводит к более надежному сигналу для размножения и уничтожения раковой клетки.

[00203] Цитоплазматический участок получен из эндодоменов $\alpha\beta$ и/или $\gamma\delta$ Т-клеточных ко-стимулирующих молекул, включая: CD28 (остатки 180-220), CD137 (остатки 214-255), ICOS (остатки 165-199) CD27 (остатки 213-260) NKG2D (остатки 1-51), JAML (остатки 297-394) CD2 (остатки 236-351), CD30 (остатки 408-595) OX40 (остатки 1-23), HVEM (остатки 224-283) или молекулы CD46. Оптимальные конструкции выбираются в зависимости от степени активации популяций модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки для индуцированной клеточной цитотоксичности и на основании степени секреции цитокинов *in vitro* и *in-vivo*.

Пример 33. Нацеливание фрагментов, содержащих CD3 ζ активирующий домен

[00204] Был клонирован нутриклеточный CD3 ζ (Остатки 52-164), содержащий три ITAM-домена (ITAM1: APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR, (SEQ ID NO: 5); ITAM 2: PQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM, (SEQ ID NO: 6); и ITAM3: ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ, (SEQ ID NO: 7).

[00205] Внутриклеточный домен TCR ζ амплифицировали с использованием праймеров 5' AGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCA -3' (SEQ ID NO: 8) и обратного праймера 5' CTCGAGTGGCTGTAGCCAGA-3' (SEQ ID NO: 9).

Конструкции CAR генерировали посредством многоступенчатой ПЦР с перекрытием. Продукты были слиты в отдельной реакции ПЦР с использованием праймеров, снабженных набором Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), с использованием протокола полимеразной цепной реакции удлинения Overlap. ДНК, кодирующая полноразмерную конструкцию, была лигирована в ретровирусный вектор MSGV1. Конструкция предусматривает фрагмент для нацеливания CAR, содержащий CD3 ζ активирующий домен.

Пример 34. Модификация $\gamma\delta$ Т-клеток с более чем одним распознающим фрагментом

[00207] $\gamma\delta$ Т-клетки были трансдуцированы с более чем одной конструкцией, содержащей фрагмент распознавания опухолей, включая TCR и MAб, направленные к одному и тому же внутриклеточному опухолеспецифическому белку. Каждая конструкция выбрана для распознавания конкретного пептида в контексте различных гаплотипов МНС, таких как A2 и A1, антитела, направленные к различным мишеням, экспрессированным в тех же опухолевых клетках или антителах, направленных к различным эпитопам на одной и той же мишени.

Пример 35. *In vitro* размножение модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток

[00208] Модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки выращивали и размножали с подходящими тканевыми культуральными средами, такими как среда для культивирования тканей, описанная в предыдущих примерах. Модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки росли экспоненциально до около 1×10^6 в 5% CO₂ -инкубаторе при 37 ° C со стимуляцией или без стимуляции внешним антигеном и без совместной культуры с АПК или аминокислотами.

Пример 36. Функциональная характеристика цитокинов, выделяемых активированными модифицированными и немодифицированными $\gamma\delta$ Т-клетками

[00209] Экспрессия IFN- γ , TNF- α (R&D Systems), IL-1 β , IL-2, (Biosource International), IL-12 (Diacalone Research) и IL-18 будут измеряться с использованием коммерческих комплектов иммуносорбентного анализа на основе фермента (ELISA). Иммуноферментные анализы на основе фермента будут проводиться в соответствии с инструкциями производителей. Количество цитокина будет измеряться в различные моменты времени (от 24 до 72 часов) в 96-луночной планшете из полистирола (Maxisorb,

Nunc), покрытом моноклональным мышиним IgG1 против человеческого цитокина, в концентрации 1 мкг/мл в 0,05 М буфера бикарбоната натрия в течение ночи при 4°C. После промывания PBS, содержащего 0,05% Tween 20, планшет блокируют 3% бычьим сывороточным альбумином (BSA, мас./Об., Sigma) в PBST в течение 1 часа при 37°C.

- 5 Стандарт (рекомбинантный человеческий цитокин от R & D) и супернатант от $\gamma\delta$ образцов культур будут добавлены, и планшет будет инкубирован при комнатной температуре в течение 2 часов. Обнаружение пар сопряженных антител в отношении стандартов рекомбинантных цитокинов человека.

Пример 37. Идентификация ко-стимулирующих агентов

- 10 [00210] Способность различных ко-стимулирующих агентов поддерживать активацию, размножение и жизнеспособность модифицированных и немодифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток испытывают, добавляя ко-стимулирующие агенты в целые РВМС или обогащенные модифицированными и немодифицированными $\gamma\delta$ Т-клеточными популяциями. Ко-стимулирующие агенты добавляли в растворимой или
- 15 иммобилизованной форме к различным активирующим агентам, включая анти- $\gamma\delta$ TCR специфические MAб. РВМС человека, очищенные от лейкоцитов здоровых доноров, как описано в предыдущих примерах, или лимфоциты, выделенные из тканей, высевали при 2×10^6 в 1 мл полной среды RPMI-1640, дополненной 100 МЕ/мл rhIL-2, в 24-луночную плоскодонную ткань с 2-10 мкг анти- $\gamma\delta$ TCR-антителом в присутствии или в отсутствие
- 20 растворимых или иммобилизованных агонистических антител к CD2, CD27, CD28, CD30, CD 137, ICOS, CD161, CD122, CD244 и NKG2D или стимулирующих лигандов, включая CD70-FC (лиганд-CD27) MICA, MICB и ULBP (лиганды к NKG2D), 4-1BB (лиганд к CD137) и Pilar 9 (лиганд на CD 161).

Пример 38. Активация цитокинов поддержки

- 25 Способность различных цитокинов поддерживать активацию, размножение и жизнеспособность модифицированных и немодифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток тестируют, добавляя цитокины в цельные РВМС или обогащенные модифицированными и немодифицированными $\gamma\delta$ Т-клеточными популяциями. Для тестирования поддержки активации цитокинов различные цитокины индивидуально добавляли в отдельные
- 30 клеточные культуры каждые 3 дня при 100 МЕ/мл. Тестируемые цитокины включали IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-33, IL-21, IL-18, IL-19, IL-4, IL-9, IL-23 и IL1 β . По окончании выбранного периода времени образец клеток собирали и определяли состав клеточной популяции, то есть проценты $\gamma\delta$ Т-клеток, $\alpha\beta$ Т-клеток, В-клеток и НК-клеток определяли проточной цитометрией.

- 35 [00212] Клетки держали в культуре, и размножение выбранных популяций тестировали на 14-й день и 21-й день.

Пример 39. Анализ *in vitro* цитотоксичности модифицированных и немодифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток *in vitro*

- 40 [00213] *In vitro* цитотоксический анализ модифицированных или немодифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток осуществляли с помощью 4 различных анализов на цитотоксичность: 1) лизиса опухолевых клеток; 2) высвобождения цитокинов активированными Т-клетками; 3) анализа LDH; и 4) активации экспрессии CD 107a. В качестве клеток-мишеней использовали различные клеточные линии опухолевых клеток человека или человеческих клеток опухолевого происхождения (линии опухолевых клеток ксенотрансплантата у
- 45 пациента), полученные, но не ограничиваясь ими, из толстой кишки, молочной железы, яичника, почки, головы и шеи, ротовой полости, поджелудочной железы и рака печени. В качестве отрицательного контроля использовали нормальные клетки эпителия молочной железы человека (НМЕС). Вкратце, пролиферирующие клетки-мишени

высеивали при 1×10^4 клеток на лунку в 96-луночный планшет. Через 24 часа среду удаляли и добавляли активированные $\gamma\delta$ Т-клетки в среду RPMI (RPMI-1640 от Corning, 10% фетальной бычьей сыворотки Hyclone, 2 ммоль/л L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 ЕД/мл стрептомицина) при соотношении эффектор-мишень 20: 1 или 40: 1 и инкубировали в течение 5 часов при 37°C в увлажненной атмосфере для 5% CO₂. Цитокин высвобождался модифицированными и немодифицированными $\gamma\delta$ Т-клетками, после этой инкубации определяли путем сбора супернатанта совместно культивирования и количественного определения секреции цитокинов, включая IFN- γ , IL2, TNF α , IL-6 и IL1 β используя коммерчески доступный набор для ELISA (BioLegend). Анализ LDH проводили с использованием набора для обнаружения цитотоксичности LDH (Roche) в соответствии с инструкциями производителя. Наконец, экспрессию CD107a определяли добавлением 5 мкл антитела CD 107a, конъюгированного с Cy7PE (BioLegend), после добавления $\gamma\delta$ Т-клеток к клеткам-мишеням. Пластинку кратковременно центрифугировали и инкубировали в течение 1 часа при 37°C в увлажненной атмосфере для 5% CO₂, а затем добавляли 8.5 мкл разведения 1:50 Golgi stop BD Biosciences (BD). Клетки инкубировали еще в течение 2 часов при 37°C в увлажненной атмосфере для 5% CO₂. После этой инкубации клетки собирали на лед, промывали один раз холодным HBSS и окрашивали 1 мкл аминного красителя зомби-аква (BioLegend), чтобы определить популяцию живых клеток в 100 мкл HBSS. Клетки промывали в окрашивающей среде FACS (FSM, HBSS, содержащей 2% фетальной бычьей сыворотки) и ресуспендировали в 100 мкл FSM, содержащем насыщающие количества антител, включая V δ 1 антитела, конъюгированные с FITC (клон TS8.2 от ThermoFisher) и V δ 2 антитела, конъюгированные с PE (клон B6 от BioLegend). Антитела инкубировали с клетками в течение 30 минут на льду и затем промывали избыточным количеством HBSS. Окрашенные популяции собирали на BD FACSCanto II и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo v10.1.

Пример 40. Противоопухолевая активность размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток *in vitro*

[00214] Цитотоксическую активность против различных линий опухолевых клеток и первичных опухолевых клеток тестировали при эффекторном соотношении мишень от 1: 1 до 40: 1. Лизис линий опухолевых клеток и первичных опухолевых клеток измеряли путем обнаружения высвобождения внутриклеточных ферментов лактатдегидрогеназы. Процентная доля $\gamma\delta$ Т-клеток, экспрессирующих модифицированные фрагменты распознавания опухолей в культуре, измеряли с помощью проточной цитометрии, ELISA и/или ELISPOT-анализов.

Пример 41. Противоопухолевая активность *in vivo*

[00215] Когорты иммунодефицитных мышей, привитых ксенотрансплантатами опухоли человека или мышам huPBMC-NOG (Taconic), или мышам с гуманизированной иммунной системой, как описано выше, подкожно или ортотопически инъецировали клетки, полученные из опухоли или опухолевые клетки, полученные от пациента, или опухолевые клеточные линии, включая рак толстой кишки, молочной железы, яичника, почек, головы и шеи, предстательной железы, мочевого пузыря, ротовой полости, поджелудочной железы и печени и позволил достичь среднего размера 100 мм³. Обогащенные или выделенные $\gamma\delta$ Т-клетки, либо наивные, либо модифицированные, вводятся внутривенно мышам или непосредственно в опухоль в диапазоне доз. Регрессия опухоли определяется как уменьшение объема опухоли после дозирования $\gamma\delta$ Т-клеток, и сравнивали с необработанными и стандартными методами лечения для конкретного показания. В некоторых экспериментах наивные или модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки

мечены GFP или люциферазой и вводятся опухолевым мышам, чтобы следить за их стойкостью и хомингом. В конце исследования опухоли собирали и GFP-положительные клетки анализировали с помощью проточной цитометрии и иммуногистохимии.

Пример 42. Кριοконсервация $\gamma\delta$ Т-клеток в среде для заморозки для создания банков-клеток для дальнейшей обработки

[00216] Немодифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки будут составлены в замороженных средах и помещаться в криогенные отсеки хранения, такие как морозильники с жидким азотом (-195°C) или морозильники с ультранизкой температурой (-65°C , -80°C или -120°C) для длительного хранения. Среда для заморозки будет содержать диметилсульфоксид (ДМСО), хлорид натрия (NaCl), декстрозу, декстрансульфат или гидроэтилкрахмал (ГЭК) с физиологическими буферными агентами pH в пределах от 6,5 до 7,5.

[00217] Кριοконсервированные $\gamma\delta$ Т-клетки будут размораживаться и далее обрабатываться путем стимуляции антителами, белками, пептидами и цитокинами. Кριοконсервированные $\gamma\delta$ Т-клетки будут разморожены и генетически модифицированы, как ранее описано в этой заявке. Модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки будут дополнительно кριοконсервированы для создания банков клеток в количествах 10, 100, 200 флаконов в количестве от 10^6 до 10^8 клеток на мл в замороженных средах.

Пример 43. Альтернативная кριοконсервация $\gamma\delta$ Т-клеток в среде для заморозки для создания банков-клеток для дальнейшей обработки

[00218] Другие криопротекторы добавляли к подложке для кριοконсервации, описанной в предыдущем примере, для обеспечения питательной поддержки и биофизической защиты клеток от лизиса во время процесса замораживания и размораживания. К ним относятся D-глюкоза, маннит, сахароза, аденин, гуанозин, рекомбинантный альбумин человека, цитрат, антикоагулянт, бензоназа, ДНКаза, пропиленгликоль, этиленгликоль, 2-метил-2,4-пентандиол. Дополнительные добавки, предназначенные для обеспечения буферной емкости для замороженного продукта с высокой плотностью клеток, включали неорганический фосфат, бикарбонат натрия и HEPES.

Пример 44. Кριοконсервация $\gamma\delta$ Т-клеток в среде для заморозки для создания банков-клеток для дальнейшей обработки

Первоначальное замораживание $\gamma\delta$ Т-клетки выполняются в рампе с регулируемой температурой, предназначенной для достижения скорости замерзания от $-0,1^{\circ}\text{C}$ до -5°C в минуту с использованием контролируемой скорости замораживания (например, CryoMed Controlled Rate Freezer) или механического -70°C -морозильника, чтобы обеспечить требуемую скорость замораживания. Замороженные клетки помещали в морозильники -70°C для кратковременного хранения до 30-60 дней. Замороженные клетки помещали в жидкие резервуары для хранения N_2 для более длительного хранения до 12, 24, 36 и 48 месяцев при сохранении числа $\gamma\delta$ Т-клеток и функции клеток без ухудшения, измеренные методами, описанными в предыдущих разделах.

Кριοконсервированные клетки, описанные в этом примере, будут разморожены и дополнительно стимулированы и размножены в подходящих закрытых сосудах, таких как мешки для клеточных культур и/или биореакторы для получения подходящего количества модифицированной $\gamma\delta$ Т-клетки для введения субъекту.

Пример 45. Приготовление $\gamma\delta$ Т-клеток для прямой инфузии пациентам

[00221] Модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки концентрировали центрифугированием и/или мембранной диафильтрацией до 5×10^6 клеток/мл и 10^8 клеток/мл в физиологическом буфере, содержащем криозащитные вспомогательные материалы, и помещали в

криогенные отсеки хранения, такие как жидкий азот, или ультра морозильные камеры с низкой температурой для длительного хранения.

Пример 46. Лечение человека, страдающего от рака

[00222] Свежие или замороженные модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки размораживали у постели больного и вводили внутривенно человеку. Около 1 клетки на килограмм до примерно 1×10^{10} клеток на килограмм модифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток вводили человеку в течение 30-60 минут. Модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки вводили с или без помощи ко-стимулирующего цитокина IL-2 или других цитокинов. Необязательно процедура повторялась. *In vivo* размножение $\gamma\delta$ Т-клеток у субъекта измеряли проточной цитометрией.

[00223] В то время как предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения были продемонстрированы и описаны в данном документе, для специалистов в данной области техники очевидно, что такие варианты реализации предоставляются только в качестве примера. Множество вариаций, изменений и замещений на данный момент могут прийти на ум специалистам в данной области техники, не отступая от изобретения. Следует понимать, что могут быть использованы различные альтернативы вариантам реализации изобретения, описанным в данном документе при практическом применении изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула определяет объем изобретения и что способы и структуры в пределах объема формулы изобретения и их эквивалентов должны быть охвачены этим.

(57) Формула изобретения

1. Способ получения *ex vivo* или *in vitro* размноженной $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции или $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции, где указанный способ включает:

- a. обеспечение комплексного образца, содержащего $\gamma\delta$ Т-клетки; и
 - b. размножение $\delta 1$ или $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеток путем культивирования клеток образца с по меньшей мере одним антителом, которое селективно размножает $\delta 1$ или $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клетки, где указанное по меньшей мере одно антитело, которое селективно размножает $\delta 1$ или $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клетки, выбрано, соответственно, из
 - i. антител, которые связываются с аминокислотной последовательностью в вариабельной области $\delta 1$ TCR, с селективным размножением $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клеток и получением размноженной $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции; или
 - ii. антител, которые связываются с аминокислотной последовательностью в вариабельной области $\delta 2$ TCR, с селективным размножением $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеток и получением размноженной $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции;
- где процент $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клеток в указанной размноженной $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции превышает 60%; или
- где процент $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеток в указанной размноженной $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции превышает 80%.

2. Способ по п. 1, где указанное антитело выбрано из группы, состоящей из антител TS8.2, 15D, B6, TS-1 и R9.12; более предпочтительно где указанное антитело иммобилизовано на поверхности.

3. Способ по п. 1, где указанное антитело, которое селективно размножает $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клетки, выбрано из антитела TS-1, антитела TS 8.2 или агента, который конкурирует с антителом TS-1 или TS8.2 за связывание с аминокислотной последовательностью в вариабельной области $\delta 1$ TCR, предпочтительно где указанное антитело, которое селективно размножает $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клетки, стимулирует более чем 10-кратный рост популяции $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клеток относительно другой популяции $\gamma\delta$ Т-клеток.

4. Способ по п. 1, где указанное антитело, которое селективно размножает $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клетки, выбрано из антитела В6, антитела 15D или агента, который конкурирует с антителом В6 или 15D за связывание с аминокислотной последовательностью цепи $\delta 2$ TCR, предпочтительно где указанное антитело, которое селективно размножает $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клетки, стимулирует более чем 10-кратный рост популяции $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеток относительно другой популяции $\gamma\delta$ Т-клеток.

5. Способ по п. 1, где указанная стадия размножения дополнительно включает культивирование указанных $\gamma\delta$ Т-клеток в присутствии цитокина, выбранного из группы, состоящей из IL-2, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 и IL-33.

6. Способ по п. 5, где указанный интерлейкин выбран из группы, состоящей из IL-2, IL-7, IL-15 и IL-17.

7. Способ по п. 6, где указанный интерлейкин выбран из группы, состоящей из IL-2, IL-7 и IL-15.

8. Способ по п. 1, где указанный способ не включает расширение указанной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток антигенпрезентирующей клеткой, аминокислотом или азотсодержащим бисфосфонатом.

9. Способ по п. 1, где указанные $\gamma\delta$ Т-клетки получают из $\gamma\delta$ Т-клетки, выделенной из комплексного образца субъекта, предпочтительно образца крови, образца пуповинной крови, опухоли, предшественника стволовых клеток, биопсии опухоли, ткани, лимфы или эпителиальных участков субъекта, непосредственно контактирующих с внешней средой.

10. Способ по п. 1, где размноженная популяция $\delta 1$ или $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеток представляет собой популяцию, которая сконструирована для экспрессии одного или более фрагментов распознавания опухоли.

11. Способ по п. 10, где указанная размноженная популяция $\delta 1$ или $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеток сконструирована для экспрессии двух или более фрагментов распознавания опухоли, предпочтительно где указанные два или более фрагментов распознавания опухоли являются различными, и где каждый различный фрагмент распознавания опухоли сконструирован для распознавания различных эпитопов одного и того же антигена или для распознавания различных эпитопов различных антигенов.

12. Способ по п. 11, где:

a. указанный фрагмент распознавания опухоли получен из опухоле-инфильтрирующего лимфоцита; или

b. указанный фрагмент распознавания опухоли клонирован из Т-клетки; или

c. указанный фрагмент распознавания опухоли представляет собой сконструированный Т-клеточный рецептор, предпочтительно где:

i. указанный сконструированный Т-клеточный рецептор получен из Т-клеточного рецептора человека или мыши; или

ii. указанный сконструированный Т-клеточный рецептор представляет собой сконструированный $\alpha\beta$ TCR; или

iii. указанный сконструированный Т-клеточный рецептор представляет собой сконструированный $\gamma\delta$ TCR; или

d. указанный фрагмент распознавания опухоли представляет собой антитело, однодоменное антитело, фрагмент антитела, Fab или их антигенсвязывающий фрагмент, которые распознают опухолевый антиген, предпочтительно где указанный фрагмент распознавания опухоли получен из В-клетки верблюда или В-клетки ламы;

e. указанный фрагмент распознавания опухоли связывает MICA, MICB, Her2neu, EGFR, мезотелин, CD38, CD20, CD19, PSA, RON, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33,

CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, альфафетопротейн, карциноэмбриональный антиген, CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, PLIF, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, гликолипид F77, белок, активирующий фибробласты, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, c-met, CSPG4, нектин-4, VEGFR2, PSCA, белок, связывающий фолат, рецептор фолата, SLC44A4, CTAG1B, AXL, IL-13R, SLTRK6, gp100, MART1, тирозиназу, SSX2, SSX4, NYESO-1, эпителиальный опухолевый антиген, белок семейства MAGEA, KKLC1, мутированный *ras*, *βraf* или p53;

f. указанный опухолевый антиген представляет собой комплекс пептид-МНС, и указанный фрагмент распознавания опухоли распознает указанный комплекс пептид-МНС; или

g. указанный фрагмент распознавания опухоли распознает экзогенный антиген, экспрессированный на поверхности опухолевой клетки, или полученные пептиды, представленные на клеточной поверхности в комплексе с молекулами класса МНС.

13. Способ по п. 1, где указанная размноженная популяция $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клеток или указанная размноженная популяция $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеток представляет собой популяцию, которая сконструирована для экспрессии фрагмента распознавания антигена, где указанный фрагмент распознавания антигена распознает антиген, ассоциированный с аутоиммунным заболеванием, или где указанный или где указанный фрагмент распознавания антигена распознает патогенный антиген.

14. Способ по п. 13, где:

a. указанные сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки сконструированы для экспрессии двух или более фрагментов распознавания антигена, где каждый фрагмент распознавания антигена распознает один и тот же аутоиммунный антиген или различные аутоиммунные антигены;

b. указанные сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки сконструированы для экспрессии двух или более фрагментов распознавания антигена, где каждый фрагмент распознавания антигена распознает отличный эпитоп на одних и тех же аутоиммунных антигенах или различных аутоиммунных антигенах;

c. указанная сконструированная $\gamma\delta$ Т-клетка сконструирована для экспрессии фрагмента распознавания антигена, где указанный фрагмент распознавания антигена распознает патогенный антиген, предпочтительно где указанный патогенный антиген представляет собой бактериальный антиген, или где указанный патогенный антиген представляет собой бактериальный антиген;

d. указанная сконструированная $\gamma\delta$ Т-клетка сконструирована для экспрессии двух или более фрагментов распознавания антигена, где каждый фрагмент распознавания антигена распознает различные эпитопы на одном и том же патогенном антигене; или

e. указанная сконструированная $\gamma\delta$ Т-клетка сконструирована для экспрессии двух или более фрагментов распознавания антигена, где каждый фрагмент распознавания антигена распознает различные патогенные антигены, предпочтительно

i. где указанный патогенный антиген представляет собой бактериальный белок; или

ii. где указанный патогенный антиген представляет собой вирусный белок.

15. Способ по п. 1, где указанный комплексный образец содержит общую популяцию РВМС без предварительного уменьшения количества моноцитов, $\alpha\beta$ Т-клеток, В-клеток и NK-клеток.

16. Способ по п. 1, где процент $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клеток в указанной размноженной $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции превышает 80% или 90%.

17. Способ по п. 1, где процент $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеток в указанной размноженной $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции превышает 90%.

18. Способ по п. 1, дополнительно включающий:
обогащение указанных $\gamma\delta$ Т-клеток перед селективным размножением $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клеток или $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеток.

19. Способ по п. 18, где указанное обогащение включает удаление одного или более
из красных кровяных клеток, НК-клеток, $\alpha\beta$ -клеток, В-клеток, моноцитов и макрофагов.

20. Размноженная популяция $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клеток или размноженная популяция $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеток, полученная способом по любому из пп. 1-14, содержащая по меньшей мере 1×10^8 $\delta 1$ Т-клеток или $\delta 2$ Т-клеток, соответственно.

21. Размноженная популяция $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клеток или размноженная популяция $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеток по п. 20 для применения в лечении рака у субъекта, нуждающегося в этом, где указанная $\gamma\delta$ Т-клетка сконструирована для экспрессии фрагмента распознавания опухоли, и указанный фрагмент распознавания опухоли распознает опухолевый антиген.

22. Размноженная популяция $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клеток или размноженная популяция $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеток по п. 21, где:

а. сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки не имеют человеческого локуса HLA;

б. сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой универсальные донорные клетки;

в. сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой опухолеспецифичные аллогенные $\gamma\delta$ Т-клетки;

г. указанные сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки сконструированы для экспрессии двух или более фрагментов распознавания опухоли, предпочтительно где указанные два или более фрагментов распознавания опухоли являются различными, где каждый отличный фрагмент распознавания опухоли сконструирован для распознавания различных эпитопов одного и того же антигена или различных эпитопов различных антигенов.

23. Размноженная популяция $\delta 1$ $\gamma\delta$ Т-клеток или размноженная популяция $\delta 2$ $\gamma\delta$ Т-клеток по п. 22, где:

а. указанный фрагмент распознавания опухоли получен из опухоль-инфильтрирующего лимфоцита;

б. указанный фрагмент распознавания опухоли клонирован из Т-клетки;

в. указанный фрагмент распознавания опухоли представляет собой сконструированный Т-клеточный рецептор, необязательно где

и. указанный сконструированный Т-клеточный рецептор получен из Т-клеточного рецептора человека или мыши;

ii. указанный сконструированный Т-клеточный рецептор представляет собой сконструированный $\alpha\beta$ TCR; или

iii. указанный сконструированный Т-клеточный рецептор представляет собой сконструированный $\gamma\delta$ TCR;

г. указанный фрагмент распознавания опухоли представляет собой антитело, однодоменное антитело, фрагмент антитела, Fab или их антигенсвязывающий фрагмент, которые распознают опухолевый антиген, необязательно где указанный фрагмент распознавания опухоли получен из В-клетки верблюда или В-клетки ламы;

е. указанный фрагмент распознавания опухоли связывает MICA, MICB, Her2neu, EGFR, мезотелин, CD38, CD20, CD19, PSA, RON, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, альфафетопротейн, карциноэмбриональный антиген, CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, PLIF, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, гликолипид F77, белок, активирующий фибробласты, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, c-met, CSPG4, нектин-4, VEGFR2, PSCA, белок, связывающий

фолат, рецептор фолата, SLC44A4, CTAG1B, AXL, IL-13R, SLTRK6, gp100, MART1, тирозиназу, SSX2, SSX4, NYESO-1, эпителиальный опухолевый антиген, белок семейства MAGEA, KKLC1, мутированный *ras*, *βraf* или *p53*;

5 f. указанный опухолевый антиген представляет собой комплекс пептид-МНС, и указанный фрагмент распознавания опухоли распознает указанный комплекс пептид-МНС; или

g. указанный фрагмент распознавания опухоли распознает экзогенный антиген, экспрессированный на поверхности опухолевой клетки, или полученные пептиды, представленные на клеточной поверхности в комплексе с молекулами класса МНС.

10

15

20

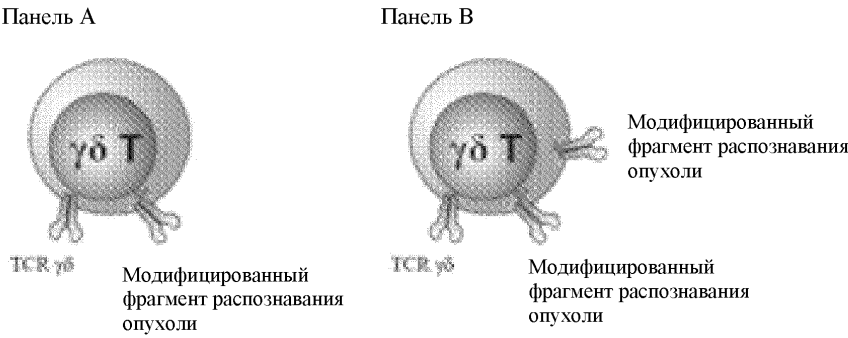
25

30

35

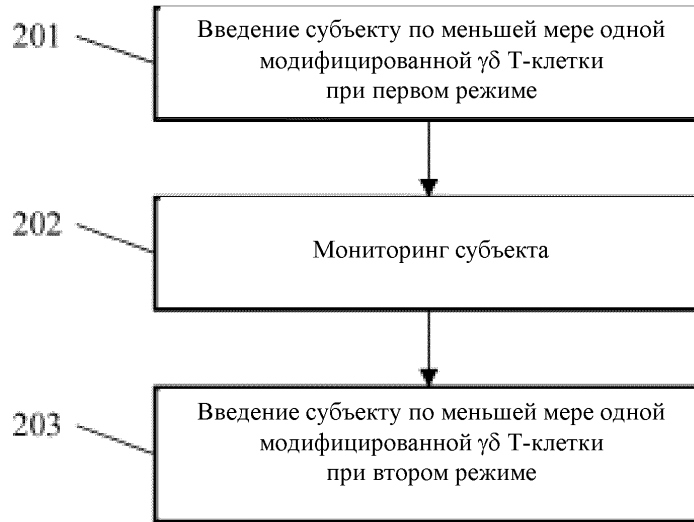
40

45



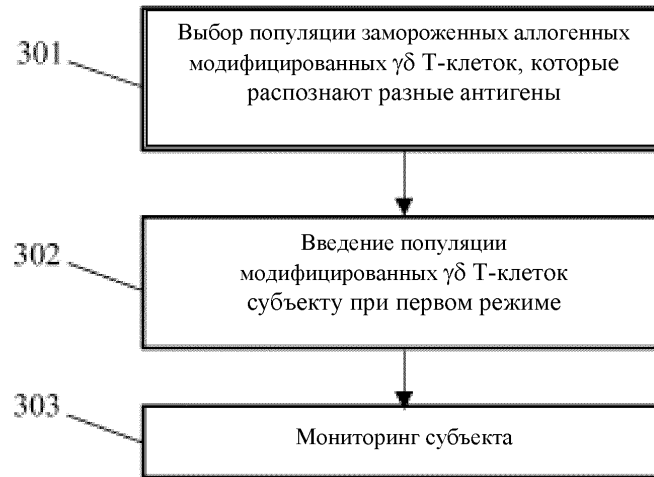
Фиг. 1

2/13



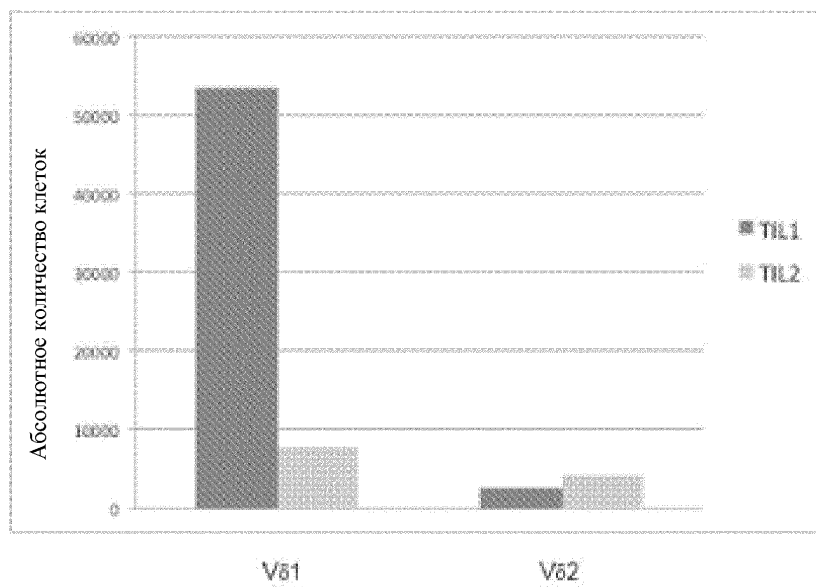
Фиг. 2

3/13



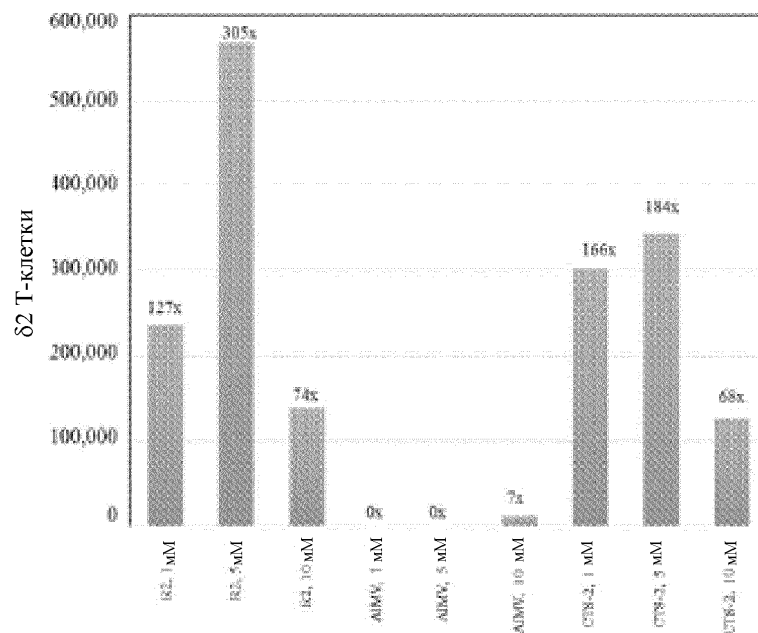
Фиг. 3

4/13



Фиг. 4

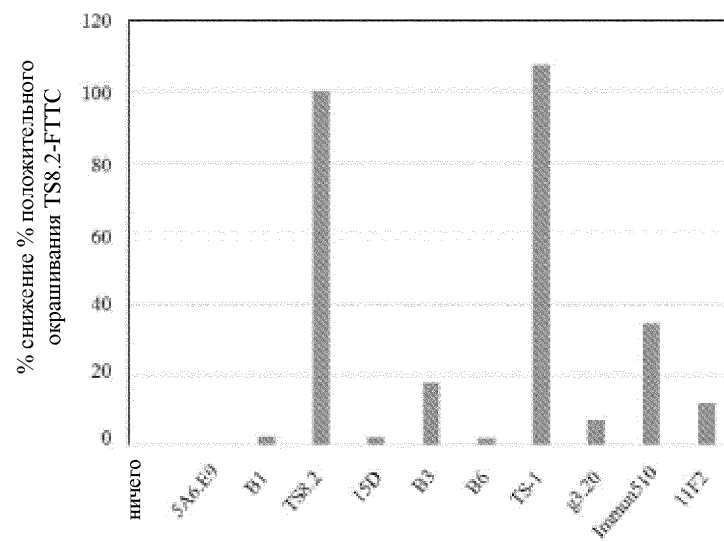
5/13



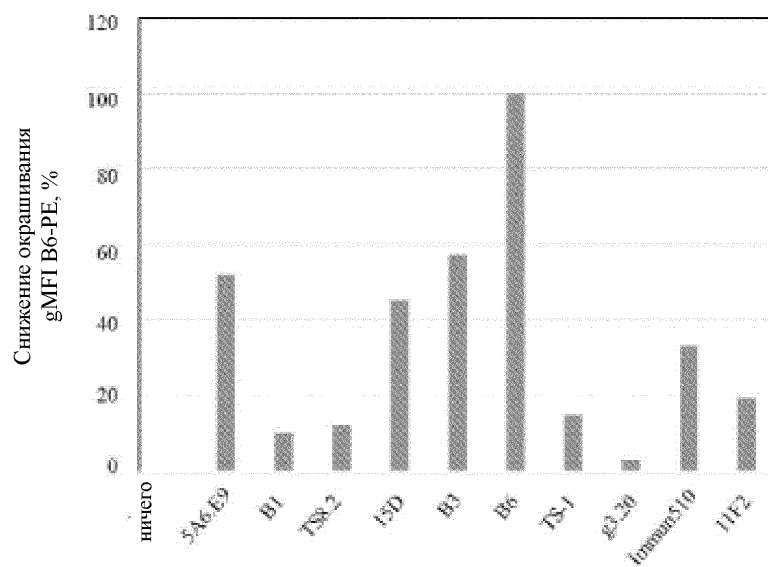
Фиг. 5

6/13

Фиг. 6

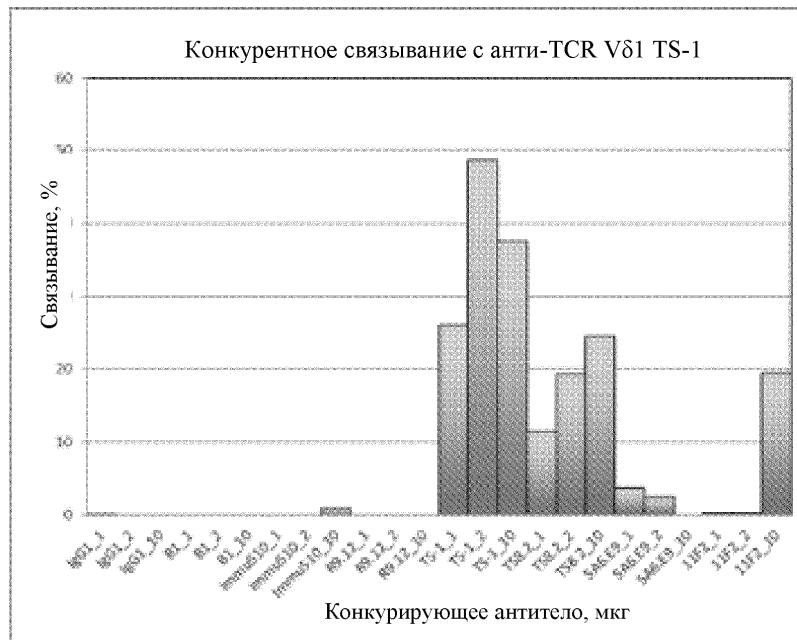


7/13



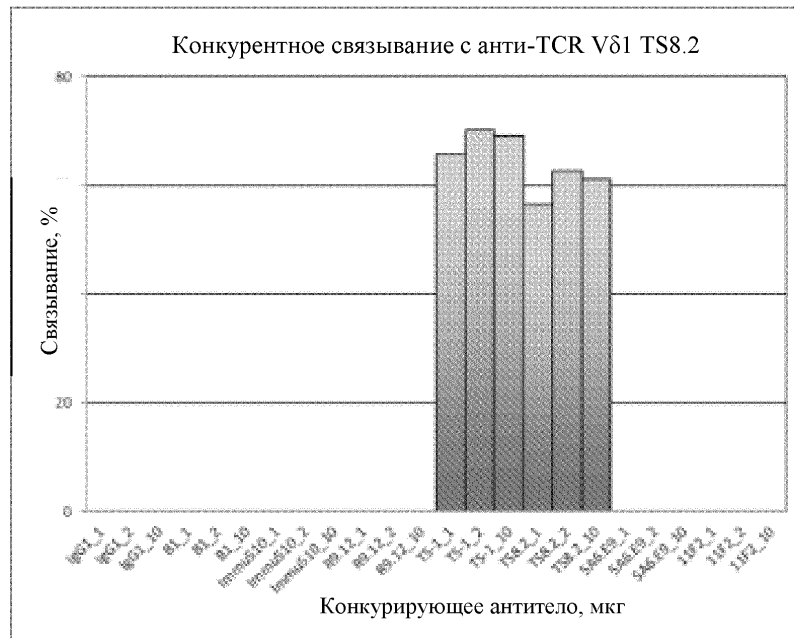
Фиг. 7

8/13



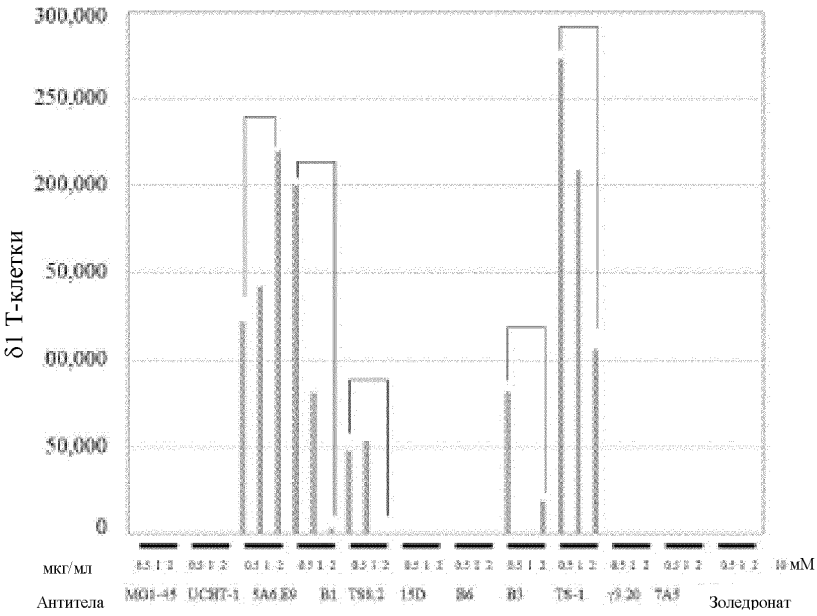
Фиг. 8

9/13



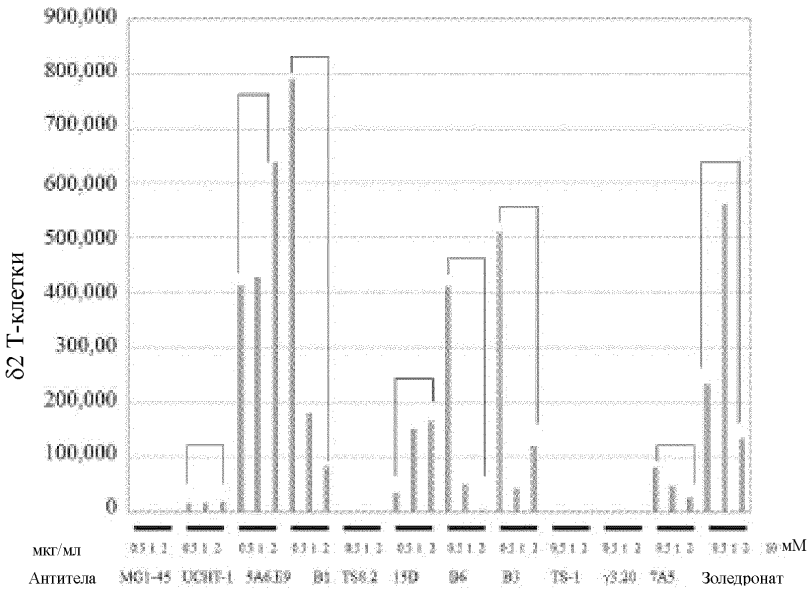
Фиг. 9

10/13



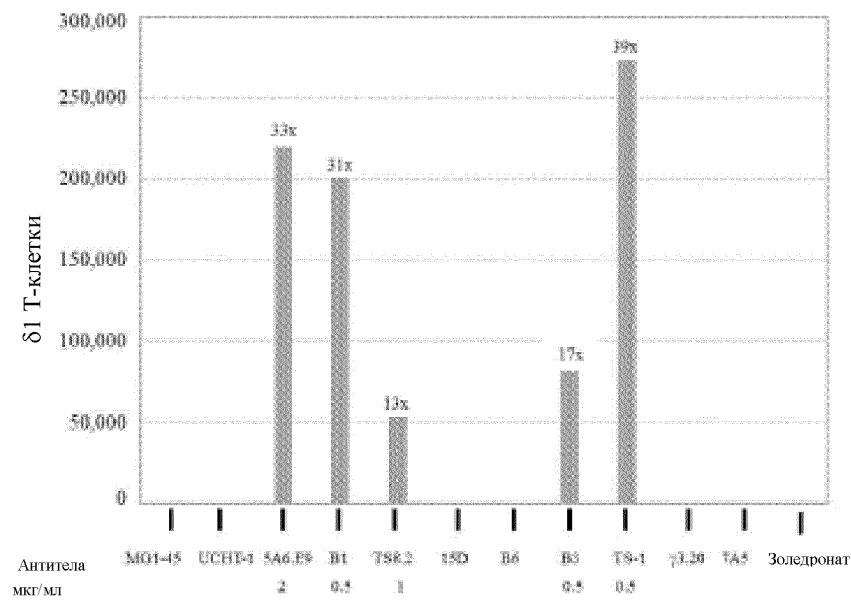
Фиг. 10

11/13



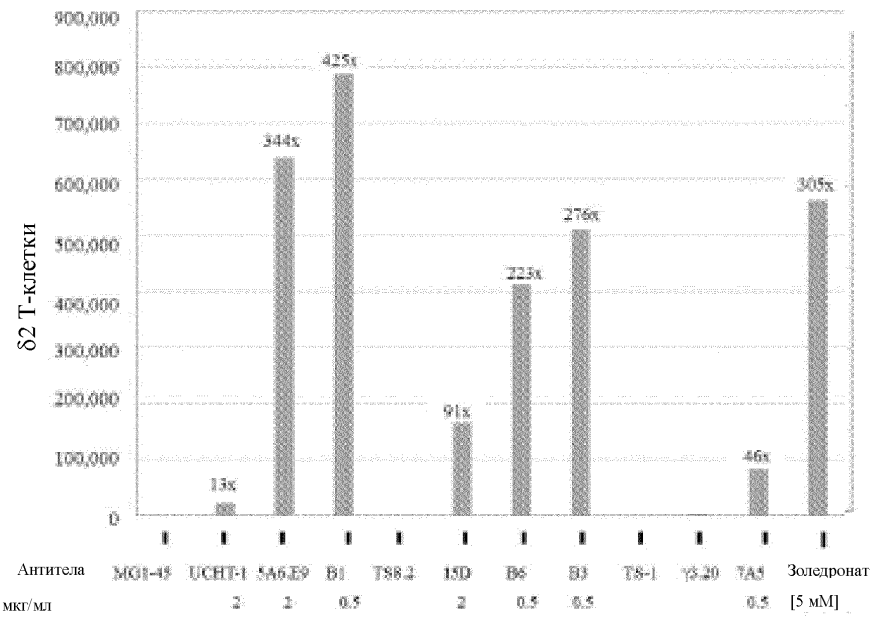
Фиг. 11

12/13



Фиг. 12

13/13



Фиг. 13