

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092588** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.06.15

(51) Int. Cl. **C07K 14/47** (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.05.03

(54) **КЛЕТКИ-ЕСТЕСТВЕННЫЕ КИЛЛЕРЫ, СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ДЛЯ
ЭКСПРЕССИИ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ С БЛОКАДОЙ
ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК**

(31) **62/666,665; 62/666,965**

(32) **2018.05.03; 2018.05.04**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/030721**

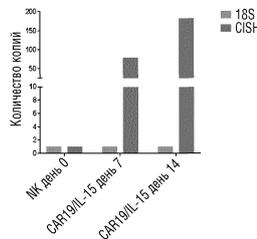
(87) **WO 2019/213610 2019.11.07**

(71) Заявитель:
**БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС
СИСТЕМ (US)**

(72) Изобретатель:
**Дахер Мэй, Базар Рафет, Шполл
Элизабет, Резвани Кэйти (US)**

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

(57) Изобретение относится к способам получения NK-клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы и не экспрессирующих CISH. Дополнительно, изобретение относится к способам лечения заболеваний путем введения CAR-NK-клеток.



A1

202092588

202092588

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565619EA/011

КЛЕТКИ-ЕСТЕСТВЕННЫЕ КИЛЛЕРЫ, СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ С БЛОКАДОЙ ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет временных заявок на выдачу патента США №№ 62/666665, поданной 3 мая 2018 года, и 62/666965, поданной 4 мая 2018 года, которые обе полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Включение Списка Последовательностей

Список последовательностей, который содержится в файле под названием «UTFC1366WO.txt», который составляет 2 Кб (при измерении в Microsoft Windows) и был создан 3 мая 2019 года, представлен в настоящем документе для электронной подачи и включен в настоящее описание посредством ссылки.

Уровень техники

1. Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в целом относится к области иммунологии и медицины. Более конкретно, оно относится к клеткам-естественным киллерам (NK), сконструированным для экспрессии химерного антигенного рецептора с нарушенной экспрессией гена иммунной контрольной точки.

2. Описание уровня техники

В последние годы было подтверждено, что adoptивная клеточная терапия с использованием аутологичных Т-клеток, трансдуцированных химерным антигенным рецептором (CAR), представляет собой очень мощный подход для лечения рака, который привел к одобрению Управлением по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) для В-клеточного лейкоза и лимфомы. Однако остаются проблемы, включая разделение цитотоксичности в отношении опухолевых клеток и системной токсичности, поиск решений для рецидивов, отрицательных по антигену-мишени, и разработку универсальных готовых продуктов клеточной терапии, чтобы избежать логистических препятствий для получения аутологичных продуктов, с одновременным решением проблем продуктов аллогенных Т-клеток, таких как реакция трансплантат против хозяина (GVHD) (Hartmann et al. 2017).

Клетки-естественные киллеры (NK) являются привлекательными кандидатами, поскольку они опосредуют эффективную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток и в отличие от Т-клеток у них отсутствует возможность вызывать GVHD в аллогенных условиях. Таким образом, NK-клетки могут быть доступны в качестве готового продукта клеточной терапии для немедленного клинического использования (Daher et al. 2018). Пуповинная кровь (CB) представляет собой легкодоступный источник аллогенных NK-клеток с возможностью широкого клинического масштабирования. Сильная активность трансдуцированных CAR-NK-клеток была доказана в доклинических условиях на различных моделях опухолей, и в настоящее время проводятся клинические испытания

аллогенных трансдуцированных CAR-NK-клеток (Mehta et al. 2018). В то время как молекулы иммунных контрольных точек, такие как PD-1, нацелены на усиление функции CAR-T-клеток, на сегодняшний день ни одна молекула иммунной контрольной точки не нацелена на CAR-NK-клетки (Gay et al. 2017).

Функциональные NK-клетки можно получать из нескольких источников. Аутологичные NK-клетки можно репродуктивно воспроизводить *in vitro*, но они обладают ограниченной активностью против аутологичных опухолей, которую невозможно преодолеть с помощью конструирования CAR. Пуповинная кровь (СВ) представляет собой легкодоступный источник аллогенных NK-клеток с очевидными преимуществами. СВ доступна в виде готового замороженного продукта, преимущество, которое было усилено методами создания большого количества высокофункциональных NK-клеток из замороженных единиц СВ *ex vivo*. Поколение трансдуцированных CAR-NK-клеток из замороженных единиц СВ, хранящихся в крупных глобальных реестрах банка СВ, является перспективным для широкого масштабирования, которое нельзя воспроизвести с отдельными взрослыми донорами, которым требуется скрининг и лейкаферез. Однако основным недостатком NK-клеток является отсутствие у них устойчивости после адоптивного переноса в отсутствие цитокиновой поддержки. Вследствие этого, конструирование CAR-NK-клеток для экспрессии цитокинов с целью повышения их устойчивости важно для их клинической активности. Таким образом, CAR-NK-клетки могут активировать молекулы контрольных точек, которые могут ограничивать их функциональность. Вследствие этого, существует необходимость в удалении молекул контрольных точек в NK-клетках, сконструированных с помощью CAR, чтобы повысить их эффективность и клиническую активность.

Сущность изобретения

В первом варианте осуществления в настоящем раскрытии представлены выделенные клетки-естественные киллеры (NK), сконструированные для экспрессии (1) химерного антигенного рецептора (CAR) и/или T-клеточного рецептора (TCR) и (2) человеческого IL-15 (hIL-15), и по существу не экспрессирующие CISH. В некоторых аспектах NK-клетку конструируют для экспрессии CAR. В определенных аспектах NK-клетку конструируют для экспрессии TCR. В конкретных аспектах NK-клетку конструируют для экспрессии CAR и TCR или 3 или 4 антигенных рецепторов. В некоторых аспектах NK-клетки совместимы с GMP. В определенных аспектах NK-клетки являются аллогенными или аутологичными.

В некоторых аспектах NK-клетку получают из клеток пуповинной крови, периферической крови, костного мозга, CD34⁺ или iPSC. В определенных аспектах NK-клетку получают из пуповинной крови. В конкретных аспектах пуповинная кровь была ранее заморожена.

В некоторых аспектах CAR и/или TCR обладают антигенной специфичностью в отношении CD19, CD319/CS1, ROR1, CD20, CD5, CD7, CD22, CD70, CD30, BCMA, CD25, лигандов NKG2D, MICA/MICB, карциноэмбрионального антигена, альфафетопротеина,

CA-125, MUC-1, эпителиального опухолевого антигена, ассоциированного с меланомой антигена, мутировавшего p53, мутировавшего ras, HER2/Neu, ERBB2, связывающего фолат белка, гликопротеина gp120 оболочки ВИЧ-1, гликопротеина gp41 оболочки ВИЧ-1, GD2, CD123, CD33, CD30, CD56, c-Met, мезотелина, GD3, HERV-K, IL-11Ralpha, цепи каппа, цепи лямбда, CSPG4, ERBB2, WT-1, EGFRvIII, TRAIL/DR4 и/или VEGFR2.

В дополнительных аспектах НК-клетка дополнительно экспрессирует второй или третий цитокин. В конкретных аспектах цитокином является IL-15, IL-21 или IL-12.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу получения НК-клеток согласно вариантам осуществления, включающему получение исходной популяции НК-клеток; культивирование исходной популяции НК-клеток в присутствии искусственных представляющих клеток (APC); введение в НК-клетки вектора экспрессии CAR и/или TCR; размножение НК-клеток в присутствии APC, тем самым получая размноженные НК-клетки; и нарушение экспрессии CISH в размноженных НК-клетках.

В некоторых аспектах нарушение экспрессии включает использование опосредованного CRISPR сайленсинга гена. В определенных аспектах опосредованное CRISPR подавление гена включает введение в контакт CAR-НК-клеток с одиночной гидовой РНК и Cas9. В конкретных аспектах одиночная гидовая РНК нацелена на экзон 4 CISH. В конкретных аспектах одиночная гидовая РНК содержит crRNA1, которая имеет последовательность AGGCCACATAGTGCTGCACA (SEQ ID NO:1), и crRNA2, которая имеет последовательность TGTACAGCAGTGGCTGGTGG (SEQ ID NO:2).

В некоторых аспектах исходную популяцию НК-клеток получают путем выделения мононуклеарных клеток с использованием градиента плотности фиколл-пак. В конкретных аспектах APC представляют собой гамма-облученные APC. В некоторых аспектах APC представляют собой универсальные APC (uAPC). В конкретных аспектах APC сконструированы для экспрессии 41BB и IL-21. В некоторых аспектах uAPC сконструированы для экспрессии (1) CD48 и/или CS1 (CD319), (2) мембраносвязанного интерлейкина-21 (mbIL-21) и (3) лиганда 41BB (41BBL). В конкретных аспектах НК-клетки и APC присутствуют в соотношении от 1:1 до 1:10, например, в соотношении 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10. В определенных аспектах НК-клетки и APC присутствуют в соотношении 1:2.

В определенных аспектах НК-клетки в культуре с APC дополнительно размножают в присутствии IL-2. В определенных аспектах IL-2 присутствует в концентрации 100-300 ед/мл, например, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 или 300 ед/мл. В некоторых аспектах IL-2 присутствует в концентрации 200 ед/мл.

В некоторых аспектах введение включает трансдукцию. В определенных аспектах экспрессионной конструкцией CAR и/или TCR является лентивирусный вектор или ретровирусный вектор.

В конкретных аспектах CAR и/или TCR обладают антигенной специфичностью в отношении CD19, CD319/CS1, ROR1, CD20, CD5, CD7, CD22, CD70, CD30, BCMA, CD25, лигандов NKG2D, MICA/MICB, карциноэмбрионального антигена, альфафетопротеина,

CA-125, MUC-1, эпителиального опухолевого антигена, ассоциированного с меланомой антигена, мутировавшего p53, мутировавшего ras, HER2/Neu, ERBB2, связывающего фолат белка, гликопротеина gp120 оболочки ВИЧ-1, гликопротеина gp41 оболочки ВИЧ-1, GD2, CD123, CD23, CD30, CD56, c-Met, мезотелина, GD3, HERV-K, IL-11Alpha, цепи каппа, цепи лямбда, CSPG4, ERBB2, WT-1, EGFRvIII, TRAIL/DR4 и/или VEGFR2.

В некоторых аспектах экспрессионная конструкция CAR и/или TCR дополнительно экспрессирует цитокин, например, 2 или 3 цитокина. В некоторых аспектах цитокином является IL-15, IL-21 или IL-12.

В некоторых аспектах NK-клетка активирует передачу сигналов мишени рапамицина у млекопитающих (mTOR) по сравнению с NK-клетками с экспрессией CISH. В определенных аспектах NK-клетка усиливает передачу сигналов JAK/STAT по сравнению с NK-клеткой с экспрессией CISH.

В дополнительных аспектах способ дополнительно включает криоконсервацию популяции размноженных NK-клеток.

Кроме того, в настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая популяцию NK-клеток согласно вариантам осуществления или NK-клеток, полученных способом согласно вариантам осуществления, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления представлена композиция, содержащая эффективное количество NK-клеток согласно вариантам осуществления или NK-клеток, полученных способом согласно вариантам осуществления, для использования при лечении заболевания или расстройства у субъекта.

В другом варианте осуществления представлено применение композиции, содержащей эффективное количество NK-клеток согласно вариантам осуществления или NK-клеток, полученных способом согласно вариантам осуществления, для лечения иммуноопосредованного расстройства у субъекта.

В дополнительном варианте осуществления представлен способ лечения иммуноопосредованного расстройства у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества NK-клеток согласно вариантам осуществления или NK-клеток, полученных способом согласно вариантам осуществления.

В некоторых аспектах описанных выше вариантов осуществления иммуноопосредованным расстройством является рак, аутоиммунное заболевание, заболевание трансплантат против хозяина, отторжение аллотрансплантата или воспалительное состояние. В определенных аспектах иммуноопосредованным расстройством является воспалительное состояние, а иммунные клетки по существу не обладают экспрессией глюкокортикоидного рецептора. В определенных аспектах субъект получал или получает стероидную терапию. В некоторых аспектах NK-клетки являются аутологичными или аллогенными. В определенных аспектах иммуноопосредованным расстройством является рак. В некоторых аспектах раком является солидный рак или гематологическое злокачественное новообразование.

В дополнительных аспектах описанных выше вариантов осуществления способ

дополнительно включает введение по меньшей мере второго терапевтического средства. В некоторых аспектах по меньшей мере второе терапевтическое средство включает в себя химиотерапию, иммунотерапию, хирургию, лучевую терапию или биотерапию. В некоторых аспектах NK-клетки и/или по меньшей мере второе терапевтическое средство вводят внутривенно, внутривнутрибрюшинно, интратрахеально, внутриопухолево, внутримышечно, эндоскопически, внутрь очага поражения, чрескожно, подкожно, местно или путем прямой инъекции или перфузии.

В некоторых аспектах NK-клетки по существу без экспрессии CISH обладают улучшенной функцией по сравнению с NK-клетками с экспрессией CISH. В определенных аспектах улучшенную функцию измеряют путем внутриклеточного окрашивания на IFN- γ и TNF- α , дегрануляции CD107a и уничтожения опухоли с помощью анализа высвобождения ^{51}Cr . В некоторых аспектах улучшенную функцию измеряют по повышенной экспрессии гранзима-b, перфорина, TRAIL, CD3z, Eomes, T-bet, DAP12, DNAM, CD25 и/или Ki67.

Другие цели, признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают на предпочтительные варианты осуществления изобретения, приведены только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема изобретения станут очевидны специалистам в данной области из этого подробного описания.

Краткое описание чертежей

Следующие чертежи составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Изобретение можно лучше понять со ссылкой на один или несколько из этих чертежей в сочетании с подробным описанием конкретных представленных в данном документе вариантов осуществления.

Фиг. 1A-1B: CIS активируется в NK CAR19/IL-15 и коррелирует со снижением функции зависимым от времени образом. (фиг. 1A) количественную ПЦР для мРНК CISH проводили в 0 день (исходные покоящиеся NK-клетки) и на 7 день и 14 день после трансдукции CAR. В качестве гена домашнего хозяйства использовали 18S. мРНК CISH активируется зависимым от времени образом после размножения NK CAR19/IL-15. (фиг. 1B) Для оценки цитотоксичности или NK CAR19/IL-15 на 7 день и 14 день после трансдукции CAR проводили анализ высвобождения хрома. Результаты показывают снижение цитотоксичности с течением времени, что коррелирует с активацией CISH.

Фиг. 2A-2C: Эффективный КО CISH с использованием CRISPR-Cas для нацеливания на экзон 4 CISH. CRISPR-Cas9 использовали для нацеливания на экзон 4 CISH с использованием 2 гРНК на 14 день после размножения NK. Эффективность нокаута оценивали с помощью (фиг. 2A) ПЦР для гена CISH на 3 день после КО, (фиг. 2B) вестерн-блоттинга для белка CIS на 7 день, (фиг. 2C) проточной цитометрии на 7 день.

Фиг. 3A-3D: КО CISH и трансдукция CAR19/IL-15 синергетически улучшают

функцию и цитотоксичность. На 14 день после трансдукции CAR (**фиг. 3А, В**) проводили функциональные исследования, показывающие повышенную выработку цитокина и дегрануляцию в NT KO CISH и KO CISH CAR19/IL-15 по сравнению с WT аналогами. (**фиг. 3С, D**) Анализ высвобождения хрома показывает улучшенную цитотоксичность в группах KO CISH.

Фиг. 4А-4D: КО CISH в NK-клетках NT и NKCAR19/IL-15 улучшает образование иммунных синапсов с клетками лимфомы Raji. На 14 день после трансдукции CAR проводили конфокальную микроскопию для сравнения образования иммунных синапсов против клеток Raji NT KO CISH и CAR19/IL-15 против контроля cas9. (**фиг. 4А**) Увеличивается накопление F-актина и CAR в синапсе. (**фиг. 4В**) Сокращается расстояние от МТОС до синапса. (**фиг. 4С**) Увеличивается совместная локализация CAR с F-актином в иммунном синапсе. (**фиг. 4D**) Тенденция увеличения CD19, совместной локализации F-актина и CAR в иммунном синапсе.

Фиг. 5А-5В: NK-клетки КО CISH CAR19/IL-15 улучшают подавление опухоли и выживаемость в мышинной модели лимфомы Raji. В 0 день мышам инъецировали клетки Raji (20 К/мышь) отдельно в группе 1 или в комбинации с различными препаратами NKCAR19/IL-15 (10^7 клеток/мышь WT, контроль Cas9 или КО CISH). (**фиг. 5А**) ВЛИ показала улучшенное подавление опухоли в группе, которая получала клетки КО CISH. (**фиг. 5В**) Кривая выживаемости, показывающая повышенную выживаемость в группе, которая получала клетки КО CISH.

Фиг. 6: во время умерщвления проводили анализ проточной цитометрии обработанной крови, селезенки, печени, ВМ для оценки наличия Raji и NK CAR. У мышей, которые получали клетки КО CISH CAR19/IL-15, не было признаков лимфомы Raji, а в РВ и органах обнаружили явную популяцию экспрессирующих CAR-NK-клеток.

Фиг. 7А-7Е: Эффективный КО CISH с использованием CRISPR-Cas9 для нацеливания на экзон 4 CISH. (**фиг. 7А**) Результаты RTqPCR, показывающие зависящее от времени увеличение транскрипции CISH на 14 и 21 день в NK-клетках, трансдуцированных как NT, так и iC9/CAR19/IL-15. (**фиг. 7В**) Схематичное представление опосредованных CRISPR КО CISH с использованием двух разных гидовых РНК (гРНК) (SEQ ID NO:1-2), нацеленных на экзон 4. (**фиг. 7С**) Результаты ПЦР, проведенной через 2 дня после электропорации RNP, показывающие эффективность КО CISH с инсерционно-делеционным полиморфизмом >90%. (**фиг. 7D**) Вестерн-блоттинг, проведенный через 7 дней после электропорации RNP, показывающий процент потери белка, в качестве референсного гена использовали β -актин. (**фиг. 7Е**) результаты секвенирования по Сенгеру, показывающие множество пиков в образцах NT KO CISH и CAR KO CISH, по сравнению с их соответствующим контролем с имитацией cas9, что соответствует опосредованным CRISPR явлениям NHEJ. Стрелки указывают положение пары оснований, где начинается редактирование гена.

Фиг. 8А-8F: КО CISH улучшает функцию и цитотоксичность в NT и трансдуцированных iC9/CAR19/IL-15 NK-клетках. Функциональные исследования

сравнивают активность разных состояний NK-клеток (NT, NT KO CISH, iC9/CAR19/IL-15, iC9/CAR19/IL-15 KO CISH) против лимфомы Raji. **(фиг. 8А)** Типовые диаграммы FACS экспрессии IFN γ , TNF α и CD107a. **(фиг. 8В)** Гистограммы процентной экспрессии IFN γ , TNF α и CD107a в NK-клетках, столбики со стрелками представляют SD (n=6). **(фиг. 8С)** Анализ высвобождения хрома в разных соотношениях Е:Т (5:1, 2:1, 1:1, 0,5:1) (n=3). **(фиг. 8D)** Конфокальная микроскопия, показывающая образование иммунных синапсов между NK-клетками и клетками лимфомы Raji (n=3). **(фиг. 8Е)** Диаграмма зависимости МТОС от расстояния в синапсе. **(фиг. 8F)** Эксперимент Incucyte, показывающий процентную гибель лимфомы Raji в течение 12 часов в разных соотношениях Е:Т 1:1, 1:2 и 1:4, сравнение iC9/CAR19/IL-15 и iC9/CAR19/IL-15 KO CISH.

Фиг. 9А-9Н: Фенотипический и молекулярный портрет NK-клеток KO CISH iC9/CAR19/IL-15. **(фиг. 9А)** Сравнительная тепловая карта данных массовой цитометрии, отображающая медианное значение экспрессии маркера в KO CISH iC9/CAR19/IL-15, по сравнению с Cas9 контролем iC9/CAR19/IL-15 (n=2), показывающая более низкую или более высокую экспрессию в образцах KO CISH. **(фиг. 9В)** Типовые диаграммы Visne выбранных маркеров, показывающие повышенную экспрессию в KO CISH iC9/CAR19/IL-15 по сравнению с контролем Cas9 iC9/CAR19/IL-15. Вставка tsne-1 по сравнению с tsne2. **(фиг. 9С)** Тепловая карта, показывающая по-разному экспрессируемые гены в CTRL NK-клетках iC9/CAR19/IL15 и KO CISH (n=2). **(фиг. 9D)** Диаграммы анализа представленности групп генов, показывающие представленность в передаче сигналов TNF α посредством ответа NF κ B и IFN γ в NK-клетках KO CISH iC9/CAR19/IL15, по сравнению с Cas9 контрольными NK-клетками iC9/CAR19/IL15. **(фиг. 9Е)** Диаграмма рассеяния, показывающая некоторые гены, которые активируются в NK-клетках KO CISH iC9/CAR19/IL15 по сравнению с Cas9 контрольными NK-клетками iC9/CAR19/IL15 (n=2). **(фиг. 9F)** Диаграммы анализа представленности групп генов, показывающие представленность в передаче сигналов IL-2/STAT5, передаче сигналов STAT3/IL-6 и воспалительном ответе в NK-клетках KO CISH iC9/CAR19/IL15 по сравнению с Cas9 контрольными NK-клетками iC9/CAR19/IL15. **(фиг. 9G)** Типовые гистограммы, показывающие повышенную активацию p-STAT5, p-STAT3 и p-PLCg1 в NK-клетках KO CISH iC9/CAR19/IL15 по сравнению с Cas9 контрольными NK-клетками iC9/CAR19/IL15 после совместного культивирования с клетками лимфомы Raji в течение 30 мин. **(фиг. 9H)** Гистограммы, показывающие MFI p-STAT5, p-STAT3 и p-PLCg1 в контроле Cas9 по сравнению с NK-клетками KO CISH iC9/CAR19/IL15.

Фиг. 10А-10L: KO CISH перепрограммирует метаболизм NK-клеток iC9/CAR19/IL-15. **(фиг. 10А)** Анализ GSEA, показывающий представленность групп генов МТОС1, гликолиза, гипоксии. **(фиг. 10В)** Тепловая карта, показывающая разную экспрессию генов, связанных с различными обогащенными метаболическими путями. **(фиг. 10С)** Сетевой анализ, показывающий активированные гены (кружки), связанные с обогащенными метаболическими путями (узлы): передача сигналов IL-2/STAT5 (коричневый), mTORC1, гликолиз и гипоксии, показаны границы между путем и

конкретными генами. **(фиг. 10D)** Схематичная диаграмма, отображающая гипотезу о том, как делеция CIS модулирует метаболический путь iC9/CAR19/IL-15 за счет активации MTORC1, HIF-1a и гликолиза. **КО CISH модулирует метаболическую приспособленность NK-клеток в ответ на опухолевые клетки Raji. (фиг. 10E-10F)** Анализ Seahorse, показывающий результаты ECAR для NT, NTKO, CAR, CARKO после совместного культивирования с Raji в течение 2 часов. **(фиг. 10G)** Результаты колориметрического теста на глюкозу, проведенного на супернатанте, собранном из лунок, где NK-клетки совместно культивировали с Raji в течение 4 часов в разных условиях. **(фиг. 10H)** Путь гликолиза, созданный посредством IPA, показывающий активацию ферментов гликолиза, представленных узлами, окрашенными в красный цвет. **(фиг. 10I)** Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) фосфо-S6 в CAR и CAR KO CISH. **(фиг. 10J)** анализ seahorse, показывающий результаты OCR для NT, NTKO, CAR, CARKO. **(фиг. 10K-10L)** Результаты конфокальной микроскопии с оценкой лизосом, митохондрий и ядер и статистическим сравнением их количеств и объемов между NTcas9 и NTKO, CAR cas9 и CAR KO.

Фиг. 11A-11I: NK-клетки КО CISH iC9/CAR19/IL-15 улучшают подавление опухоли и выживаемость в мышинной модели лимфомы Raji даже при низких инфузионных дозах. (фиг. 11A) Схематичная диаграмма, отображающая график экспериментов in-vivo. **(фиг. 11B)** Результаты биоломинесцентной визуализации (BLI) и **(фиг. 11C)** кривые выживаемости, сравнивающие группы мышей, которые получали только Raji (n=5) по сравнению с Raji+NT (n=5) по сравнению с Raji+NT cas9 CTRL (n=5) по сравнению с Raji+NT KO CISH (n=5). **(фиг. 11D)** Процент NK-клеток из CD45+ клеток, присутствующих в периферической крови мышей со сравнением контрольных cas9 NK-клеток iC9/CAR19/IL-15 с КО CISH в разные дни. **(фиг. 11E)** Результаты визуализации BLI **(фиг. 11F)** среднее свечение **(фиг. 11G)** кривые выживаемости и **(фиг. 11H)** кривые масса тела, сравнивающие следующие группы отдельно мышей Raji (n=5) по сравнению с Raji+iC9/CAR19/IL-15 3×10⁶ контроль cas9 (n=5) по сравнению с iC9/CAR19/IL-15 3×10⁶ КО CISH (n=5) по сравнению с iC9/CAR19/IL-15 10×10⁶ контроль cas9 (n=5) по сравнению с iC9/CAR19/IL-15 10×10⁶ КО CISH (n=3). h, репрезентативные изображения патологии печени (левые панели) и костного мозга (правые панели), показывающие окрашивание H&E на верхних панелях и иммуногистохимическое окрашивание CD20 на нижних панелях, сравнивающие отдельно Raji по сравнению с CAR19/IL-15 CTRL (10×10⁶) по сравнению с группами CAR19/IL-15 КО CISH (10×10⁶). **(фиг. 11I)** Диаграммы массы тела мышей с течением времени в разных группах.

Фиг. 12A-12D: Идентификация нецелевых участков Cas9 с помощью GUIDE-Seq и количественная оценка возможных нецелевых участков расщепления Cas9 с использованием технологии rhAmpSeq™. (фиг. 12A) Последовательности нецелевых участков, идентифицированные с помощью GUIDE-Seq для двух гидовых последовательностей, нацеленных на локус CISH. Гидовая последовательность указана вверху, а нецелевые участки представлены внизу. Целевой участок обозначен черным

квадратом. Несоответствия с гидовой последовательностью показаны и выделены выставками серым цветом. Количество считываний секвенирования GUIDE-Seq показано справа от каждого участка. 10 мкМ Alt-R crRNA XT в комплексе с Alt-R tracrRNA доставляли в клетки HEK293, которые конститутивно экспрессируют нуклеазу Cas9 посредством нуклеофекции. **(фиг. 12B)** Круговые диаграммы показывают дробную процентную долю от общего количества уникальных, специфичных для CRISPR-Cas9 считываний, которые являются целевыми и нецелевыми. Общее редактирование целевых и нецелевых участков, идентифицированных с помощью GUIDE-Seq, измеряли с использованием rhAmpSeq, подхода мультиплексированного целевого обогащения для NGS. Для каждого из двух CISH, нацеленных на гидовые последовательности, сконструировали ампликоны вокруг каждого участка расщепления Cas9 со считыванием >1% целевых считываний GUIDE-Seq. Комплексы RNP, образованные либо WT Cas9, либо Alt-R HiFi Cas9, доставляли посредством электропорации в размноженные НК-клетки. **(фиг. 12C)** Образование вставки/делеции в каждом локусе-мишени для гидовой последовательности 1 CISH (панель 1, 11-plex) и гидовой последовательности 2 CISH (панель 2, 70-plex) при доставке одного комплекса RNP. **(фиг. 12D)** образование вставки/делеции в каждом локусе-мишени при совместной доставке гидовой последовательности 1 CISH и гидовой последовательности 2 CISH. целевой локус показан звездочкой.

Фиг. 13A-13C: трансдукция iC9/CAR19/IL-15 и эффективность КО CISH являются стабильными с течением времени. **(фиг. 13A)** Анализ проточной цитометрии CD56 в трансдуцированных и контрольных клетках. **(фиг. 13B)** Жизнеспособность трансдуцированных клеток. **(фиг. 13C)** Вестерн-блоттинг в разные дни во время трансдукции.

Фиг. 14A-14D: Фенотипический и молекулярный портрет NT НК-клеток КО CISH. **(фиг. 14A-14B)** Тепловая карта геной сигнатуры. **(фиг. 14C-14D)** Анализ NT НК-клеток КО CISH.

Фиг. 15: Одна доза CAR19/IL-15 пролонгирует выживаемость в мышинной модели лимфомы Raji, но не приводит к излечению.

Фиг. 16A-16C: НК-клетки КО CISH iC9/CAR19/IL-15 можно удалить с использованием димеризатора. **(фиг. 16A-16B)** Анализ проточной цитометрии NT НК-клеток КО CISH. **(фиг. 16C)** Процентная доля CAR⁺ НК-клеток в крови, печени, селезенке или костном мозге.

Фиг. 17: Нет подтверждения лимфомы Raji у мышей, получающих высокую дозу НК-клеток КО CISH iC9/CAR19/IL-15.

Описание некоторых вариантов осуществления изобретения

Семейство белков супрессоров цитокиновых сигналов (SOCS) играет важную роль в биологии НК-клеток, ослабляя цитокиновые сигналы, функциональную активность и иммунитет НК-клеток к раку. Один из его членов, индуцируемый цитокином содержащий SH2 белок (CIS), кодируемый геном CISH, был идентифицирован как важная молекула

внутриклеточной контрольной точки в NK-клетках и индуцируется цитокинами, включая IL-15. Таким образом, авторы изобретения стремились определить, подвержены ли сконструированные NK-клетки тем же контррегуляторным схемам, которые физиологически подавляют цитокиновые сигналы в немодифицированных NK-клетках, путем оценки экспрессии CIS и последствий делеции CISH в трансдуцированных CAR19/IL-15 CB-NK-клетках.

В настоящих исследованиях продемонстрирован новый подход к объединению конструирования CAR с нокаутом CISH (KO), который приводит к лучшему подавлению опухоли по сравнению с любым подходом по-отдельности. KO CISH усиливал активность трансдуцированных iC9/CAR19/IL-15 CB-NK-клеток за счет усиления передачи сигналов JAK/STAT. Кроме того, было показано, что нацеливание на CISH модулирует метаболизм клеток CAR-NK и повышает их «приспособленность» за счет активации передачи сигналов мишени рапамицина у млекопитающих (mTOR) и индукции гликолитического переключателя в их метаболизме. Это первая демонстрация того, что редактирование генов молекулы иммунной контрольной точки увеличивает активность и приспособленность NK-клеток CAR за счет модулирования их метаболического пути.

Конкретно, в настоящих исследованиях показано, что CISH индуцируется в трансдуцированных CAR19/IL-15 CB-NK-клетках после 7 дней размножения, что определили с помощью qPCR мРНК (фиг. 1). Чтобы изучить функциональные последствия делеции CISH в трансдуцированных CAR.19/IL-15 NK-клетках был разработан протокол для комбинированного редактирования гена, опосредованного рибонуклеопротеином Cas9 (Cas9 RNP), для сайленсинга CISH и ретровирусной трансдукции с помощью конструкции iC9/CAR.CD19/IL-15. Через семь дней после трансдукции CB-NK-клеток с помощью конструкции iC9/CAR.19/IL-15 трансдуцированные NK-клетки подвергали нуклеофекции с помощью только Cas9 (контроль Cas9) или Cas9, предварительно загруженного химически синтезированным дуплексом crRNA:tracrRNA, нацеленным на экзон 4 CISH. Затем клетки культивировали с клоном 9.mbIL21 и IL-2 (100 МЕ/мл) в течение следующих 7 дней для усиления размножения. Эффективность редактирования генов количественно оценивали с помощью ПЦР (2 день), а снижение уровней экспрессии белка определяли с помощью проточной цитометрии (7 день) в клетках CAR-NK. Нокаут CISH приводил к значительному усилению функции трансдуцированных iC9/CAR19/IL-15 CB-NK-клеток против опухолевых клеток Raji, особенно при более низких соотношениях эффектор:мишень, при оценке с помощью внутриклеточного окрашивания на IFN- γ и TNF- α , дегрануляции CD107a и уничтожению опухолей с помощью анализа высвобождения ^{51}Cr . Учитывая многообещающие данные *in vitro*, сконструированные клетки CAR-NK, полученные из CB, тестировали *in vivo* на мышинной модели лимфомы Raji. Мышам вводили только одну инъекцию 3 миллионов или 10 миллионов NK-клеток, и было показано, что KO CISH в трансдуцированных iC9/CAR19/IL-15 CB-NK усиливал их устойчивость *in vivo* и повышал выживаемость мышей при обоих уровнях доз, но более впечатляющая долгосрочная выживаемость наблюдалась при уровне дозы 10 миллионов.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлены способы получения НК-клеток путем их конструирования для экспрессии CAR, например, путем ретровирусной трансдукции и нарушения экспрессии CISH, например, за счет использования опосредованного CRISPR-Cas9 нокдауна CISH. Конструкция CAR может экспрессировать цитокин, такой как IL-15.

Представленные в данном документе НК-клетки можно использовать для улучшения адоптивной терапии CAR-клетками путем повышения эффективности, обеспечивая таким образом возможность инфузии пациентам более низкого количества CAR-НК-клеток с пониженной токсичностью. Таким образом, в дополнительных вариантах осуществления представлены способы применения адоптивной клеточной терапии с CAR-НК-клетками для лечения онкологических пациент с гематологическим злокачественным новообразованием, солидным раком, инфекционным заболеванием или иммунными заболеваниями, включая, но без ограничения, заболевание трансплантат против хозяина.

I. Определения

В рамках настоящего изобретения «по существу не содержит» в отношении указанного компонента использован в данном документе для обозначения того, что ни один из указанных компонент не был целенаправленно включен состав композиции и/или присутствует только в виде примеси или в следовых количествах. Таким образом, общее количество указанного компонента в результате любого непреднамеренного загрязнения композиции значительно ниже 0,05%, предпочтительно ниже 0,01%. Наиболее предпочтительной является композиция, в которой количество указанного компонента не может быть обнаружено стандартными аналитическими методами.

В данном описании форма единственного числа может означать один или несколько. В рамках настоящего изобретения в формуле изобретения при использовании в сочетании со словом «содержащий» формы единственного числа могут означать один или более одного.

Применение термина «или» в формуле изобретения предназначено для обозначения «и/или», если явно не указано, что он относится только к альтернативам, или альтернативы являются взаимоисключающими, хотя раскрытие поддерживает определение, которое относится только к альтернативам и «и/или». В рамках настоящего изобретения «другой» может означать по меньшей мере второй или более. термины «примерно», «по существу» и «приблизительно» означают в общем указанное значение плюс или минус 5%.

«Иммунное расстройство», «связанное с иммунитетом расстройство» или «иммуноопосредованное расстройство» относится к расстройству, при котором иммунный ответ играет ключевую роль в развитии или прогрессировании заболевания. Иммуноопосредованные расстройства включают в себя аутоиммунные заболевания, отторжение аллотрансплантата, заболевание трансплантат против хозяина и воспалительные и аллергические состояния.

«Иммунный ответ» представляет собой ответ клетки иммунной системы, такой как В-клетка или Т-клетка или врожденная иммунная клетка, на стимул. В одном варианте

осуществления ответ является специфичным для конкретного антигена («антигенспецифический ответ»).

«Аутоиммунное заболевание» относится к заболеванию, при котором иммунная система создает иммунный ответ (например, В-клеточный или Т-клеточный ответ) против антигена, который является частью нормального хозяина (то есть, аутоантигена), с последующим повреждением тканей. аутоантиген может происходить из клетки-хозяина или может происходить из комменсального организма, такого как микроорганизмы (известные как комменсальные организмы), которые обычно колонизируют слизистые оболочки.

Лечение заболевания или состояния относится к выполнению протокола, который может включать в себя введение пациенту одного или нескольких лекарственных средств с целью облегчения признаков или симптомов заболевания. Желательные результаты лечения включают в себя снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или смягчение болезненного состояния и ремиссию или улучшение прогноза. Облегчение может произойти до появления признаков или симптомов заболевания или состояния, а также после их появления. Таким образом, «лечение» может включать «предотвращение» заболевания или нежелательного состояния. Кроме того, «лечение» не включает в себя полное облегчение признаков или симптомов, не включает в себя излечение, и в частности включает протоколы, которые оказывают на пациента лишь незначительное влияние.

Термин «терапевтическая польза» или «терапевтически эффективный» в рамках настоящего изобретения относится ко всему, что способствует или улучшает самочувствие субъекта в отношении медицинского лечения этого состояния. Он включает, но без ограничения, снижение частоты или тяжести признаков или симптомов заболевания. Например, лечение рака может включать, например, снижение размера опухоли, снижение инвазивности опухоли, снижение скорости роста рака или предотвращение метастазирования. Лечение рака также может относиться к продлению выживаемости субъекта с раком.

«Субъект» и «пациент» относятся либо к человеку, либо не к человеку, например, к приматам, млекопитающим и позвоночным. В конкретных вариантах осуществления субъектом является человек.

Фразы «фармацевтически или фармакологически приемлемые» относятся к молекулярным объектам и композициям, которые не вызывают неблагоприятных, аллергических или других нежелательных реакций при введении животному, например, человеку, в зависимости от ситуации. Получение фармацевтической композиции, содержащей антитело или дополнительный активный ингредиент, будет известно специалистам в данной области в свете настоящего описания. Кроме того, для введения животным (например, человеку) следует понимать, что препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, как того требует Управление биологических стандартов FDA.

В рамках настоящего изобретения термин «фармацевтически приемлемый

носитель» включает любые и все водные растворители (например, воду, спиртовые/водные растворы, солевые растворы, парентеральные носители, такие как хлорид натрия, декстроза Рингера и т.д.), неводные растворители (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат), дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные или противогрибковые средства, антиоксиданты, хелатирующие средства и инертные газы), изотонические средства, замедляющие абсорбцию средства, соли, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственных средств, гели, связующие вещества, вспомогательные вещества, разрыхляющие средства, смазывающие вещества, подслащивающие средства, ароматизирующие средства, красители, восполнители текучих сред и питательных веществ, такие как материалы и их комбинации, которые могут быть известны рядовому специалисту в данной области. PH и точную концентрацию различных компонентов в фармацевтической композиции регулируют в соответствии с хорошо известными параметрами.

Термин «гаплотипирование или тканевое типирование» относится к методу, используемому для идентификации гаплотипа или типов ткани субъекта, например, путем определения того, какой локус (или локусы) HLA экспрессируется на лимфоцитах конкретного субъекта. Гены HLA расположены в главном комплексе гистосовместимости (MHC), области на коротком плече хромосомы 6, и участвуют в межклеточном взаимодействии, иммунном ответе, трансплантации органов, развитии рака и восприимчивости к болезням. Существует шесть генетических локусов, важных для трансплантации, которые обозначены как HLA-A, HLA-B, HLA-C и HLA-DR, HLA-DP и HLA-DQ. В каждом локусе может быть несколько разных аллелей.

В широко используемом методе гаплотипирования используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для сравнения ДНК субъекта с известными сегментами генов, кодирующих антигены MHC. Вариабельность этих участков генов определяет тип ткани или гаплотип субъекта. Серологические методы также используются для обнаружения серологически определенных антигенов на поверхности клеток. Детерминанты HLA-A, -B и -C можно измерить известными серологическими методами. Вкратце, лимфоциты субъекта (выделенные из свежей периферической крови) инкубируют с антисывороткой, распознающей все известные антигены HLA. Клетки размещают в лотке с микроскопическими лунками, содержащими различные виды антисывороток. Клетки инкубируют в течение 30 минут, после чего следует дополнительная 60-минутная инкубация комплемента. Если лимфоциты имеют на своей поверхности антигены, распознаваемые антителами в антисыворотке, лимфоциты лизируются. Можно добавить краситель, чтобы показать изменения проницаемости клеточной мембраны и гибель клеток. Структура клеток, разрушенных лизисом, указывает на степень гистологической несовместимости. Если, например, лимфоциты человека, тестируемого на HLA-A3, разрушаются в лунке, содержащей антисыворотку для HLA-A3, тест на эту группу антигенов будет положительным.

Термин «антигенпредставляющие клетки (АРС)» относится к классу клеток, способных представлять один или несколько антигенов в форме комплекса пептид-МНС, распознаваемого специфическими эффекторными клетками иммунной системы, и тем самым индуцируя эффективный клеточный иммунный ответ против представленного антигена или антигенов. Термин «АРС» охватывает интактные целые клетки, такие как макрофаги, В-клетки, эндотелиальные клетки, активированные Т-клетки и дендритные клетки, или молекулы, встречающиеся в природе или синтетические, способные представлять антиген, такие как очищенные молекулы МНС I класса, соединенные с β 2-микроглобулином.

II. NK-клетки

В некоторых вариантах осуществления NK-клетки получают из мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC), нестимулированных продуктов лейкофереза (PBSC), эмбриональных стволовых клеток человека (hESC), индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), костного мозга или пуповинной крови методами, хорошо известными в данной области. В частности, NK-клетки можно выделить из пуповинной крови (CB), периферической крови (PB), костного мозга или стволовых клеток. В конкретных вариантах осуществления иммунные клетки выделяют из объединенной CB. CB можно объединить из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 или более единиц. Иммунные клетки могут быть аутологичными или аллогенными. Выделенные NK-клетки могут иметь гаплотип, соответствующий субъекту, которому проводят клеточную терапию. NK-клетки могут быть обнаружены с помощью специфических поверхностных маркеров, таких как CD16, CD56 и CD8, у людей с отсутствием экспрессии CD3.

В некоторых аспектах исходную популяцию NK-клеток получают путем выделения мононуклеарных клеток с использованием центрифугирования в градиенте плотности фикола. В культуре клеток можно истощить любые клетки, экспрессирующие клетки CD3, CD14 и/или CD19, и можно получить ее характеристику для определения процентного содержания клеток $CD56^+/CD3^-$ или NK-клеток.

клетки размножают в присутствии существующих APC, таких как UAPC. Расширение может продолжаться примерно 2-30 дней, например, 3-20 дней, в частности 12-16 дней, например, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 дней, конкретно примерно 14 дней. NK-клетки и APCS могут присутствовать в соотношении примерно 3:1-1:3, например, 2:1, 1:1, 1:2, конкретно, примерно 1:2. Культура для размножения может дополнительно содержать цитокины, способствующие размножению, такие как IL-2, IL-21 и/или IL-18. Цитокины могут присутствовать в концентрации примерно 10-500 Ед/мл, например, 100-300 Ед/мл, в частности, примерно 200 Ед/мл. Цитокины можно восполнять в культуре для размножения, например, каждые 2-3 дня. APC можно добавлять в культуру по меньшей мере второй раз, например, после трансдукции CAR.

После размножения иммунные клетки можно немедленно вводить или сохранять, например, путем криоконсервации. В некоторых аспектах клетки можно размножить в течение дней, недель или месяцев *ex vivo* в виде общей популяции в течение примерно 1, 2,

3, 4, 5 дней.

Размноженные NK-клетки могут секретировать цитокины I типа, такие как интерферон- γ , фактор некроза опухоли- α и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), которые активируют как врожденные, так и адаптивные иммунные клетки, а также другие цитокины и хемокины. Измерение этих цитокинов можно использовать для определения статуса активации NK-клеток. Кроме того, другие способы, известные в данной области для определения активации NK-клеток, можно использовать для получения характеристики NK-клеток согласно настоящему раскрытию.

A. CISH

Цитокин-индуцируемый SH2-содержащий белок (CIS) кодируется геном CISH. Он является членом семейства SOCS и представляет собой молекулу внутриклеточной контрольной точки в NK-клетках. CISH быстро индуцируется в ответ на IL-15, а делеция CISH делает NK-клетки гиперчувствительными к IL-15. NK-клетки с нокаутом CISH обладают повышенной пролиферацией, повышенной продукцией IFN γ и повышенной цитотоксической активностью. Удаление CIS ослабляет активность NK-клеток.

В настоящих NK-клетках CISH можно разрушать любым способом, известным в данной области, например, с помощью специфичных для последовательности или целевых нуклеаз, включая связывающие ДНК целевые нуклеазы, такие как нуклеазы цинковых пальцев (ZFN) и подобные активатору транскрипции эффекторные нуклеазы (TALEN) и нуклеазы, управляемые РНК, такие как CRISPR-ассоциированная нуклеаза (Cas), специально разработанные для нацеливания на последовательность гена или его часть. В конкретных аспектах экспрессия CISH нарушается из-за нарушения, опосредованного CRISPR.

B. IL-15

Интерлейкин-15 (IL-15) ограничен тканью, и только в патологических условиях он наблюдается на любом уровне в сыворотке или системно. IL-15 обладает несколькими свойствами, нужными для адоптивной терапии. IL-15 представляет собой гомеостатический цитокин, который индуцирует развитие и клеточную пролиферацию клеток-естественных киллеров, способствует уничтожению сформировавшихся опухолей посредством облегчения функционального подавления резидентных клеток опухоли и ингибирует AICD.

В одном из вариантов осуществления настоящее раскрытие относится к совместной модификации иммунных клеток CAR и/или TCR с IL-15. В дополнение к IL-15 предполагаются другие цитокины. К ним относятся, но без ограничения, цитокины, хемокины и другие молекулы, которые способствуют активации и пролиферации клеток, используемых для применения человеком. NK- или Т-клетки, экспрессирующие IL-15, способны продолжать поддерживающую передачу сигналов цитокинов, что имеет решающее значение для их выживания после инфузии.

В некоторых вариантах осуществления были разработаны K562 aAPC, экспрессирующие нужный антиген (например, CD19) вместе с костимулирующими

молекулами, такими как CD28, IL-15 и CD3 ζ , для отбора иммунных клеток (например, NK-клеток) *in vitro*, которые способны к устойчивому опосредованному CAR размножению. Эта мощная технология позволяет производить клинически значимое количество (до 10^{10}) CAR⁺ NK-клеток, пригодных для использования человеком. При необходимости могут быть предприняты дополнительные циклы стимуляции для создания большего количества генетически модифицированных NK-клеток. Обычно по меньшей мере 90% размноженных NK-клеток экспрессируют CAR и могут быть криоконсервированы для инфузии. Кроме того, этот подход может быть использован для создания NK-клеток для различных типов опухолей путем сочетания специфичности введенного CAR с экспрессией опухолеассоциированного антигена (ТАА), распознаваемого CAR на аAPC.

После генетической модификации клетки можно немедленно инфузировать или сохранить. В некоторых аспектах после генетической модификации клетки можно размножать в течение дней, недель или месяцев *ex vivo* в виде общей популяции в течение примерно 1, 2, 3, 4, 5 дней или более после переноса гена в клетки. В дополнительном аспекте трансфектанты клонируют, а клон демонстрирующий наличие единственной интегрированной или эписомально сохраненной экспрессионной кассеты или плазмиды и экспрессию химерного рецептора, размножают *ex vivo*. Клон, выбранный для размножения, демонстрирует способность специфически распознавать и лизировать клетки-мишени, экспрессирующие CD19. Рекомбинантные иммунные клетки можно размножать путем стимуляции IL-2 или другими цитокинами, которые связывают общую гамма-цепь (например, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 и другие). Рекомбинантные иммунные клетки можно размножать путем стимуляции искусственными антигенпредставляющими клетками. В дополнительном аспекте генетически модифицированные клетки можно криоконсервировать.

А. Генетически сконструированные Антигенные Рецепторы

NK-клетки согласно настоящему раскрытию можно генетически сконструировать для экспрессии антигенных рецепторов, таких как сконструированные TCR и/или CAR. Например, NK-клетки модифицируют для экспрессии TCR, обладающего антигенной специфичностью в отношении ракового антигена. NK-клеткам можно добавить несколько CAR и/или TCR, например, к различным антигенам.

В данной области известны подходящие методы модификации. См., например, Sambrook and Ausubel, выше. Например, клетки можно трансдуцировать для экспрессии TCR, обладающего антигенной специфичностью в отношении ракового антигена, с использованием методов трансдукции, описанных в Heemskerk et al., 2008 и Johnson et al., 2009.

Электропорацию РНК, кодирующей полноразмерные α - и β (или γ и δ) цепи TCR, можно использовать в качестве альтернативы для преодоления долгосрочных проблем с аутореактивностью, вызванных конъюгацией ретровирусно трансдуцированных и эндогенных цепей TCR. Даже если такая альтернативная конъюгация имеет место в стратегии временной трансфекции, возможно, полученные аутореактивные Т-клетки через

некоторое время потеряют эту аутореактивность, потому что введенные α - и β -цепи TCR экспрессируются только временно. Когда экспрессия введенных α - и β -цепей TCR снижается, остаются только нормальные аутологичные Т-клетки. Это не тот случай, когда полноразмерные цепи TCR вводят посредством стабильной ретровирусной трансдукции, которая никогда не теряет введенные цепи TCR, вызывая постоянно присутствующую аутореактивность у пациента.

В некоторых вариантах осуществления клетки содержат одну или несколько нуклеиновых кислот, введенных с помощью генной инженерии, которые кодируют один или несколько рецепторов антигена, и продукты таких нуклеиновых кислот, полученные с помощью генной инженерии. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, то есть обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, в клетке или образце, полученном из другого организма или клетки, которые, например, обычно не находятся в конструируемой клетке и/или организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты не существуют в природе, например, нуклеиновая кислота не встречается в природе (например, химерная).

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой белок, экспрессируемый на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой TCR-подобный CAR, и антиген представляет собой процессированный пептидный антиген, такой как пептидный антиген внутриклеточного белка, который, как и TCR, распознается на поверхности клетки в контексте молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС).

Иллюстративные антигенные рецепторы, включая CAR и рекомбинантные TCR, а также способы конструирования и введения рецепторов в клетки, включают те, которые описаны, например, в публикациях международных патентных заявок №№ WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, публикациях патентных заявок США №№ US2002131960, US2013287748, US20130149337, патентах США №№: 6451995, 7446190, 8252592, 8339645, 8398282, 7446179, 6410319, 7070995, 7265209, 7354762, 7446191, 8324353 и 8479118, и европейской патентной заявке № EP2537416 и/или те, которые описаны в Sadelain et al. 2013; Davila et al. 2013; Turtle et al. 2012; Wu et al. 2012. В некоторых аспектах генетически сконструированные антигенные рецепторы включают CAR, который описан в патенте США №: 7446190, и те, которые описаны в публикации международной патентной заявки №: WO/2014055668 A1.

2. Химерные антигенные рецепторы

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит: а) внутриклеточный сигнальный домен, б) трансмембранный домен и с) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающую область.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные антигенные рецепторы включают CAR, включая активирующие или стимулирующие CAR, костимулирующие CAR (см. WO2014/055668) и/или ингибирующие CAR (iCAR, см. Fedorov et al. 2013). CAR обычно содержат внеклеточный связывающий антиген (или лиганд) домен, связанный с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными компонентами, в некоторых аспектах через линкеры и/или трансмембранный домен (домены). Такие молекулы обычно имитируют или приближают сигнал посредством натурального антигенного рецептора, сигнал посредством такого рецептора в комбинации с костимулирующим рецептором и/или сигнал только посредством костимулирующего рецептора.

Некоторые варианты осуществления настоящего раскрытия относятся к использованию нуклеиновых кислот, включая нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенспецифический полипептид CAR, включая CAR, который был гуманизирован для снижения иммуногенности (hCAR), содержащий внутриклеточный сигнальный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен, содержащий один или несколько сигнальных мотивов. В некоторых вариантах осуществления CAR может распознавать эпитоп, содержащий общее пространство между одним или несколькими антигенами. В некоторых вариантах осуществления связывающая область может содержать комплементарные определяющие области моноклонального антитела, переменные области моноклонального антитела и/или их антигенсвязывающие фрагменты. В другом варианте осуществления эта специфичность обусловлена пептидом (например, цитокином), который связывается с рецептором.

Предполагается, что нуклеиновые кислоты CAR человека могут быть человеческими генами, используемыми для усиления клеточной иммунотерапии пациентов-людей. В конкретном варианте осуществления изобретение включает полноразмерную кДНК или кодирующую область CAR. Антигенсвязывающие области или домен могут содержать фрагмент цепей V_H и V_L одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), полученного из конкретного человеческого моноклонального антитела, такого как антитела, описанные в патенте США 7109304, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Фрагмент также может представлять собой любое количество различных антигенсвязывающих доменов человеческого антигенспецифического антитела. В более конкретном варианте осуществления фрагмент представляет собой антиген-специфический scFv, кодируемый последовательностью, оптимизированной для использования человеческих кодонов для экспрессии в человеческих клетках.

Композиция может быть мультимерной, такой как диатело или мультимеры. Мультимеры, наиболее вероятно образуются за счет перекрестной конъюгации переменной части легкой и тяжелой цепей в диатело. Шарнирная часть конструкции может иметь несколько альтернатив: от полного удаления до сохранения первого цистеина, до замены пролина, а не серина, до усечения до первого цистеина. Часть Fc можно удалить. Этой цели может служить любой белок, который является стабильным и/или димеризуется.

Можно использовать только один из доменов Fc, например, домен CH2 или CH3 из иммуноглобулина человека. также можно использовать шарнир, область CH2 и CH3 иммуноглобулина человека, который был модифицирован для улучшения димеризации. также можно использовать только шарнирную часть иммуноглобулина. также можно использовать части CD8alpha.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота CAR содержит последовательность, кодирующую другие костимулирующие рецепторы, такие как трансмембранный домен и модифицированный внутриклеточный сигнальный домен CD28. Другие костимулирующие рецепторы включают, но без ограничения, один или несколько из CD28, CD27, OX-40 (CD134), DAP10, DAP12 и 4-1BB (CD137). В дополнение к первичному сигналу, инициированному CD3 ζ , дополнительный сигнал, обеспечиваемый костимулирующим рецептором человека, вставленным в CAR человека, важен для полной активации NK-клеток и может помочь улучшить устойчивость *in vivo* и терапевтический успех адоптивной иммунотерапии.

В некоторых вариантах осуществления CAR сконструирован со специфичностью к конкретному антигену (или маркеру, или лиганду), например, антигену, экспрессирующемуся в конкретном типе клеток, на который нацелена адоптивная терапия, например, маркер рака и/или антиген, предназначенный для индукции подавляющего ответа, такой как антиген, экспрессируемый на нормальных или здоровых клетках. Таким образом, CAR обычно содержит в своей внеклеточной части одну или несколько антигенсвязывающих молекул, таких как один или несколько антигенсвязывающих фрагментов, доменов или частей, или один или несколько вариабельных доменов антитела и/или молекул антитела. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающую часть или части молекулы антитела, такие как одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), полученный из вариабельной тяжелой (VH) и вариабельной легкой (VL) цепей моноклонального антитела (mAb).

В некоторых вариантах осуществления химерного антигенного рецептора антигенспецифическая часть рецептора (которая может называться внеклеточным доменом, содержащим антигенсвязывающую область) содержит опухолеассоциированный антиген или специфический к патогену антигенсвязывающий домен. Антигены включают углеводные антигены, распознаваемые рецепторами распознавания образов, такими как Dectin-1. опухолеассоциированный антиген может быть любого вида, если он экспрессируется на клеточной поверхности опухолевых клеток. Иллюстративные варианты осуществления опухолеассоциированных антигенов включают CD19, CD20, CD5, CD7, CD22, CD70, CD30, BCMA, CD25, лиганды NKG2D, MICA/MICB, карциноэмбриональный антиген, альфафетопротеин, CA-125, MUC-1, CD56, EGFR, c-Met, AKT, Her2, Her3, эпителиальный опухолевый антиген, меланома-ассоциированный антиген, мутировавший p53, мутировавший gas и так далее. В некоторых вариантах осуществления CAR может совместно экспрессироваться с цитокином для улучшения устойчивости при низком количестве опухолеассоциированного антигена. Например, CAR может совместно

экспрессироваться с PL-15.

Последовательность открытой рамки считывания, кодирующая химерный рецептор, можно получить из источника геномной ДНК, источника кДНК или можно синтезировать (например, посредством ПЦР) или их комбинаций. В зависимости от размера геномной ДНК и количества интронов может быть желательно использовать кДНК или их комбинацию, поскольку обнаружено, что интроны стабилизируют мРНК. Кроме того, для стабилизации мРНК может быть дополнительным преимуществом использование эндогенных или экзогенных некодирующих областей.

Предполагается, что химерную конструкцию можно вводить в иммунные клетки в виде голей ДНК или в подходящем векторе. В данной области известны способы стабильной трансфекции клеток с помощью электропорации с использованием голей ДНК. См., например, патент США № 6410319. Голая ДНК обычно относится к ДНК, кодирующей химерный рецептор, содержащийся в плазмидном векторе экспрессии в правильной ориентации для экспрессии.

Альтернативно, для введения химерной конструкции в иммунные клетки можно использовать вирусный вектор (например, ретровирусный вектор, аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор или лентивирусный вектор). Подходящие векторы для использования в соответствии со способом согласно настоящему раскрытию не реплицируются в иммунных клетках. Известно большое количество векторов, основанных на вирусах, где количество копий вируса, содержащегося в клетке, достаточно низкое для поддержания жизнеспособности клетки, таких как, например, векторы на основе ВИЧ, SV40, EBV, HSV или BPV.

В некоторых аспектах антигенспецифический компонент связывания или распознавания связан с одним или несколькими трансмембранными и внутриклеточными сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит трансмембранный домен, слитый с внеклеточным доменом CAR. В одном варианте осуществления использован трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен выбирают или модифицируют путем аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами того же или разных поверхностных мембранных белков, чтобы минимизировать взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен происходит либо из натурального, либо из синтетического источника. Если источник является натуральным, домен в некоторых аспектах происходит из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают те, которые происходят из (то есть содержат по меньшей мере трансмембранную область (области)) альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, молекул CD28, CD3-дзета, CD3-эпсилон, CD3-гамма, CD3-дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD154, ICOS/CD278, GITR/CD357, NKG2D и DAP. Альтернативно, в

некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен является синтетическим. В некоторых аспектах синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах триплет фенилаланина, триптофана и валина будет находиться на каждом конце синтетического трансмембранного домена.

В некоторых вариантах осуществления платформенные технологии, раскрытые в настоящем изобретении для генетической модификации иммунных клеток, таких как НК-клетки, включают (i) перенос невирусного гена с использованием устройства электропорации (например, нуклеофектора), (ii) CAR, которые передают сигнал через эндодомены (например, CD28/CD3- ζ , CD137/CD3- ζ или другие комбинации), (iii) CAR с внеклеточными доменами переменной длины, соединяющими домен распознавания антигена с поверхностью клетки, и в некоторых случаях (iv) искусственные антигенпредставляющие клетки (aAPC), полученные из K562, чтобы иметь возможность надежного и количественного размножения CAR⁺ иммунных клеток (Singh et al., 2008; Singh et al., 2011).

3. Т-Клеточный Рецептор (TCR)

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные антигенные рецепторы содержат рекомбинантные TCR и/или TCR, клонированные из природных Т-клеток. «Т-клеточный рецептор» или «TCR» относится к молекуле, которая содержит переменные α и β цепи (также известные как TCR α и TCR β , соответственно) или переменные γ и δ цепи (также известные как TCR γ и TCR δ , соответственно) и которая способна специфически связываться с антигенным пептидом, связанным с рецептором МНС. В некоторых вариантах осуществления TCR находится в $\alpha\beta$ форме.

Обычно TCR, которые существуют в формах $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$, в целом структурно похожи, но экспрессирующие их Т-клетки могут иметь различные анатомические местоположения или функции. TCR можно найти на поверхности клетки или в растворимой форме. Как правило, TCR находится на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов), где он обычно отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). В некоторых вариантах осуществления TCR также может содержать константный домен, трансмембранный домен и/или короткий цитоплазматический концевой сегмент (см., например, Janeway et al, 1997). Например, в некоторых аспектах каждая цепь TCR может иметь один N-концевой переменный домен иммуноглобулина, один константный домен иммуноглобулина, трансмембранную область и короткий цитоплазматический концевой сегмент на С-конце. В некоторых вариантах осуществления TCR связан с инвариантными белками комплекса CD3, участвующими в опосредовании передачи сигнала. Если не указано иное, термин «TCR» следует понимать как охватывающий их функциональные фрагменты TCR. Термин также включает интактные или полноразмерные TCR, включая TCR в форме $\alpha\beta$ или форме $\gamma\delta$.

Таким образом, для целей данного документа ссылка на TCR включает любой TCR или функциональный фрагмент, такой как антигенсвязывающая часть TCR, которая

связывается со специфическим антигенным пептидом, связанным в молекуле МНС, то есть комплексом МНС-пептид. «Антигенсвязывающая часть» или антигенсвязывающий фрагмент» TCR, которые можно использовать взаимозаменяемо, относится к молекуле, которая содержит часть структурных доменов TCR, но которая связывает антиген (например, комплекс МНС-пептид), с которым связывается полный TCR. В некоторых случаях антигенсвязывающая часть содержит переменные домены TCR, такие как переменная цепь и переменная β -цепь TCR, достаточные для образования сайта связывания для связывания с конкретным комплексом МНС-пептид, в котором, как правило, каждая цепь содержит три определяющие комплементарности области.

В некоторых вариантах осуществления переменные домены цепей TCR связываются с образованием петель или определяющих комплементарности областей (CDR), аналогичных иммуноглобулинам, которые обеспечивают распознавание антигена и определяют специфичность пептида путем формирования сайта связывания молекулы TCR и определения специфичности пептида. Обычно, как и иммуноглобулины, CDR разделены каркасными областями (FR) (см., например, Jores et al., 1990; Chothia et al., 1988; Lefranc et al., 2003). В некоторых вариантах осуществления CDR3 является основным CDR, ответственным за распознавание процессированного антигена, хотя также было показано, что CDR1 альфа-цепи взаимодействует с N-концевой частью антигенного пептида, тогда как CDR1 бета-цепи взаимодействует с C-концевой частью пептида. Считается, что CDR2 распознает молекулу МНС. В некоторых вариантах осуществления переменная область β -цепи может содержать дополнительную область гипервариабельности (HV4).

В некоторых вариантах осуществления цепи TCR содержат константный домен. Например, как и иммуноглобулины, внеклеточная часть цепей TCR (например, α -цепь, β -цепь) может содержать два иммуноглобулиновых домена, переменный домен (например, $V\alpha$ или $V\beta$; обычно аминокислоты 1-116 на основе нумерации Кабата Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.) на N-конце и один константный домен (например, константный домен α -цепи или $C\alpha$, обычно аминокислоты 117-259 по Kabat, константный домен β -цепи или $C\beta$, обычно аминокислоты 117-295 по Kabat), прилегающие к клеточной мембране. Например, в некоторых случаях внеклеточная часть TCR, образованная двумя цепями, содержит два константных домена, близких к мембране, и два переменных домена, удаленных от мембраны, содержащих CDR. Константный домен домена TCR содержит короткие соединительные последовательности, в которых остаток цистеина образует дисульфидную связь, создающую связь между двумя цепями. В некоторых вариантах осуществления TCR может иметь дополнительный остаток цистеина в каждой из α - и β -цепей, так что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

В некоторых вариантах осуществления цепи TCR могут содержать трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен заряжен положительно. В некоторых случаях цепи TCR содержат цитоплазматический

концевой сегмент. В некоторых случаях структура позволяет TCR связываться с другими молекулами, такими как CD3. Например, TCR, содержащий константные домены с трансмембранной областью, может закрепить белок в клеточной мембране и связываться с инвариантными субъединицами сигнального аппарата или комплекса CD3.

Обычно CD3 представляет собой мультибелковый комплекс, который может иметь три отдельные цепи (γ , δ и ϵ) у млекопитающих и ζ -цепь. Например, у млекопитающих комплекс может содержать цепь CD3 γ , цепь CD3 δ , две цепи CD3 ϵ и гомодимер цепей CD3 ζ . Цепи CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ представляют собой тесно связанные белки клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, содержащие единственный домен иммуноглобулина. Трансмембранные области цепей CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ заряжены отрицательно, что является характеристикой, которая позволяет этим цепям связываться с положительно заряженными цепями рецепторов Т-клеток. Каждый из внутриклеточных концевых сегментов цепей CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ содержит один консервативный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM, тогда как каждая цепь CD3 ζ имеет три. Обычно ITAM участвуют в сигнальной способности комплекса TCR. Эти вспомогательные молекулы имеют отрицательно заряженные трансмембранные области и участвуют в распространении сигнала от TCR в клетку. CD3- и ζ -цепи вместе с TCR образуют так называемый Т-клеточный рецепторный комплекс.

В некоторых вариантах осуществления TCR может быть гетеродимером из двух цепей α и β (или необязательно γ и δ), или это может быть одноцепочечная конструкция TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой гетеродимер, содержащий две отдельные цепи (цепи α и β или цепи γ и δ), которые связаны, например, дисульфидной связью или дисульфидными связями. В некоторых вариантах осуществления TCR для антигена-мишени (например, ракового антигена) идентифицируют и вводят в клетки. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая TCR, может быть получена из множества источников, таких как амплификация общедоступных последовательностей ДНК TCR с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). В некоторых вариантах осуществления TCR получают из биологического источника, например, из клеток, таких как Т-клетка (например, цитотоксическая Т-клетка), гибридомы Т-клеток или другого общедоступного источника. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены из клеток, выделенных *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления клон высокоаффинных Т-клеток можно выделить у пациента и выделить TCR. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут представлять собой культивируемую Т-клеточную гибридому или клон. В некоторых вариантах осуществления клон TCR для антигена-мишени был получен у трансгенных мышей, сконструированных с использованием генов иммунной системы человека (например, антигенной системы лейкоцитов человека или HLA). См., например, опухолевые антигены (см., например, Parkhurst et al., 2009 и Cohen et al., 2005). В некоторых вариантах осуществления изобретения для выделения TCR против целевого антигена используют фаговый дисплей (см., например, Varela-Rohena et al., 2008 и Li, 2005). В некоторых вариантах осуществления

TCR или его антигенсвязывающая часть может быть получена синтетически на основе знания последовательности TCR.

В. Антигенпредставляющие клетки

Антигенпредставляющие клетки, которые включают макрофаги, В-лимфоциты и дендритные клетки, различаются по экспрессии конкретной молекулы МНС. APC интернализуют антиген и повторно экспрессируют часть этого антигена вместе с молекулой МНС на своей внешней клеточной мембране. МНС представляет собой это большой генетический комплекс с множеством локусов. Локусы МНС кодируют два основных класса мембранных молекул МНС, называемых МНС I класса и II класса. Т-хелперные лимфоциты обычно распознают антиген, связанный с молекулами МНС II класса, а Т-цитотоксические лимфоциты распознают антиген, связанный с молекулами МНС I класса. У людей МНС называют комплексом HLA, а у мышей - комплексом H-2.

В некоторых случаях aAPC полезны при получении терапевтических композиций и продуктов клеточной терапии согласно вариантам осуществления. Общие рекомендации относительно получения и использования антигенпредставляющих систем см., например, в патентах США №№ 6225042, 6355479, 6362001 и 6790662; публикациях патентных заявок США №№ 2009/0017000 и 2009/0004142; и международной публикации № WO2007/103009.

Системы aAPC могут содержать по меньшей мере одну экзогенную вспомогательную молекулу. Можно использовать любое подходящее количество и комбинацию вспомогательных молекул. Вспомогательную молекулу можно выбрать из таких вспомогательных молекул, как костимулирующие молекулы и молекулы адгезии. Иллюстративные костимулирующие молекулы включают CD86, CD64 (FcγRI), лиганд 41BB и IL-21. Молекулы адгезии могут включать углеводсвязывающие гликопротеины, такие как селектины, трансмембранные связывающие гликопротеины, такие как интегрины, кальцийзависимые белки, такие как кадгеринины, и белки суперсемейства однопроходных трансмембранных иммуноглобулинов (Ig), такие как молекулы межклеточной адгезии (ICAM), которые способствуют, например, межклеточному контакту или контакту между клеткой и матриксом. Иллюстративные адгезионные молекулы включают LFA-3 и ICAM, такие как ICAM-1. Методы, способы и реагенты, полезные для отбора, клонирования, получения и экспрессии иллюстративных вспомогательных молекул, включая костимуляторные молекулы и молекулы адгезии, проиллюстрированы, например, в патентах США №№ 6225042, 6355479 и 6362001.

С. Антигены

Среди антигенов, на которые нацелены генетически сконструированные антигенные рецепторы, находятся антигены, экспрессируемые в контексте заболевания, состояния или типа клеток, на которые нацелена адоптивная клеточная терапия. К заболеваниям и состояниям относятся пролиферативные, неопластические и злокачественные заболевания и расстройства, включая рак и опухоли, в том числе гематологический рак, рак иммунной системы, такой как лимфомы, лейкемии и/или миеломы, такие как В, Т и миелоидные

лейкозы, лимфомы и множественные миеломы. В некоторых вариантах осуществления антиген избирательно экспрессируется или сверхэкспрессируется на связанных с заболеванием или состоянием клетках, например, опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других вариантах осуществления антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на сконструированных клетках.

В настоящем способе может найти применение любой подходящий антиген. Иллюстративные антигены включают, но без ограничения, антигенные молекулы возбудителей инфекции, ауто/эндоантигены, ассоциированные с опухолью/раком антигены и неоантигены опухоли (Linnemann et al., 2015). В конкретных аспектах антигены включают NY-ESO, EGFRvIII, Muc-1, Her2, CA-125, WT-1, Mage-A3, Mage-A4, Mage-A10, TRAIL/DR4 и CEA. В конкретных аспектах антигены для двух или более антигенных рецепторов включают, но без ограничения, CD19, EBNA, WT1, CD123, NY-ESO, EGFRvIII, MUC1, HER2, CA-125, WT1, Mage-A3, Mage-A4, Mage-A10, TRAIL/DR4 и/или CEA. В данной области известны последовательности этих антигенов, например, CD19 (учетный номер NG_007275.1), EBNA (учетный номер NG_002392.2), WT1 (учетный номер NG_009272.1), CD123 (учетный номер NG_009272.1), NC_000023.11), NY-ESO (учетный номер NC_000023.11), EGFRvIII (учетный номер NG_007726.3), MUC1 (учетный номер NG_029383.1), HER2 (учетный номер NG_007503.1), CA-125 (учетный номер NG_055257.1), WT1 (учетный номер NG_009272.1), Mage-A3 (учетный номер NG_013244.1), Mage-A4 (учетный номер NG_013245.1), Mage-A10 (учетный номер NC_000023.11), TRAIL/DR4 (учетный номер NC_000003.12) и/или CEA (учетный номер NC_000019.10).

Опухولةассоциированные антигены могут происходить из рака предстательной железы, молочной железы, толстой кишки, легких, поджелудочной железы, почек, мезотелиомы, яичников или меланомы. Иллюстративные опухолеассоциированные антигены или антигены, происходящие из опухолевых клеток, включают MAGE 1, 3 и MAGE 4 (или другие антигены MAGE, такие как те, что раскрыты в международной патентной публикации № WO99/40188); PRAME; BAGE; RAGE, Lage (также известный как NY ESO 1); SAGE; и HAGE или GAGE. Эти неограничивающие иллюстративные опухолевые антигены экспрессируются в широком диапазоне типов опухолей, таких как меланома, карцинома легкого, саркома и карцинома мочевого пузыря. См., например, патент США № 6544518. Опухولةассоциированные антигены рака предстательной железы включают, например, простатоспецифический мембранный антиген (PSMA), простатоспецифический антиген (PSA), кислые фосфаты предстательной железы, NKX3.1 и шеститрансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы (STEAP).

Другие опухолеассоциированные антигены включают Plu-1, HASH-1, HasH-2, Cripto и Criptin. Кроме того, опухолевым антигеном может быть аутопептидный гормон, такой как полноразмерный гонадотропин-рилизинг-гормон (GnRH), короткий пептид длиной 10 аминокислот, полезный при лечении многих видов рака.

Опухолевые антигены включают опухолевые антигены, полученные при раковых заболеваниях, которые характеризуются экспрессией опухолеассоциированного антигена, такой как экспрессия HER-2/neu. Представляющие интерес опухолеассоциированные антигены включают линиеспецифические опухолевые антигены, такие как антигены линии меланоцитов-меланомы MART-1/Melan-A, gp100, gp75, mda-7, тирозиназа и связанный с тирозиназой белок. Иллюстративные опухолеассоциированные антигены, включают, но без ограничения, опухолевые антигены, происходящие из любого одного или нескольких из p53, Ras, c-Myc, цитоплазматических серин/треонин киназ (например, A-Raf, B-Raf и C-Raf, циклин-зависимых киназ), MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, тирозиназы, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Сур-В, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, фосфоинозитид-3-киназ (PI3K), рецепторов TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, антигена опухоли Вильмса (WT1), AFP, -катенина/m, каспазы-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, миозина/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, аннексина II, CDC27/m, TPI/mbc-1, BCR-ABL, регуляторного фактора интерферона 4 (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR, опухолеассоциированного трансдуктора кальциевого сигнала 1 (TACSTD1), TACSTD2, рецепторных тирозинкиназ (например, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (в частности, EGFRvIII), рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR)), цитоплазматических тирозинкиназ (например, семейства src, семейства syk-ZAP70), интегрин-связанной киназы (ILK), переносчиков и активаторов сигналов транскрипции STAT3, STAT5 и STAT6, индуцируемых гипоксией факторов (например, HIF-1 и HIF-2), ядерного фактора-каппа В (NF- κ B), рецепторов Notch (например, Notch1-4), c-Met, мишеней рапамицина у млекопитающих (mTOR), WNT, регулируемых внеклеточными сигналами киназ (ERK) и их регуляторных субъединиц, PMSA, PR-3, MDM2, мезотелина, почечно-клеточной карциномы-5T4, SM22-альфа, карбоангидразы I (CAI) и IX (CAIX) (также известных как G250), STEAD, TEL/AML1, GD2, протеиназы 3, hTERT, точек разрыва транслокации саркомы, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (гибридного гена TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, андрогенного рецептора, циклина B1, полисиаловой кислоты, MYCN, RhoC, GD3, фукозила GM1, мезотелия, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLobоH, NY-BR-1, RGsS, SART3, STn, PAX5, OY-TE51, белка спермы 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, легумаина, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, Fos-родственного антигена 1, CBX2, CLDN6, SPANX, TPTE, ACTL8, ANKRD30A, CDKN2A, MAD2L1, STAG1B, SUNC1, LRRN1 и идиотипа.

Антигены могут представлять собой эпитопные области или эпитопные пептиды, происходящие из генов, мутировавших в опухолевых клетках, или из генов, транскрибируемых на разных уровнях в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками, такие как фермент теломераза, сурвивин, мезотелин, мутированный gas, перестройка bcr/abl, Her2/neu, мутированный p53 или p53 дикого типа, цитохром P450 1B1

и аномально экспрессируемые интронные последовательности, такие как N-ацетилглюкозаминилтрансфераза-V; клональные перестройки генов иммуноглобулинов, порождающие уникальные идиотипы миеломы и В-клеточных лимфом; опухолевые антигены, которые содержат эпитопные области или эпитопные пептиды, полученные в результате онковирусных процессов, такие как белки Е6 и Е7 вируса папилломы человека; белок LMP2 вируса Эпштейна-Барр; немутантные онкофетальные белки с опухоль-селективной экспрессией, например, карциноэмбриональный антиген и альфа-фетопротеин.

В других вариантах осуществления антиген получен или происходит из патогенного микроорганизма или из условно-патогенного микроорганизма (также называемого в данном документе инфекционным болезнетворным микроорганизмом), такого как вирус, грибок, паразит и бактерия. В некоторых вариантах осуществления антигены, полученные из такого микроорганизма, содержат полноразмерные белки.

Иллюстративные патогенные организмы, антигены которых предполагается использовать в описанном в данном документе способе, включают вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус простого герпеса (HSV), респираторно-синцитиальный вирус (RSV), цитомегаловирус (CMV), вирус Эпштейна-Барр (EBV), вирус гриппа А, В и С, вирус везикулярного стоматита (VSV), полиомавирус (*например*, вирус ВК и вирус JC), аденовирус, виды *Staphylococcus*, включая устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus* (MRSA), и виды *Streptococcus*, включая *Streptococcus pneumoniae*. Как будет понятно специалисту, белки, полученные из этих и других патогенных микроорганизмов, для использования в качестве антигена, как описано в данном документе, и нуклеотидные последовательности, кодирующие белки, могут быть указаны в публикациях и в общедоступных базах данных, таких как GENBANK®, SWISS-PROT®, и TREMBL®.

Антигены, происходящие от вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), включают любые структурные белки вириона ВИЧ (*например*, gp120, gp41, p17, p24), протеазу, обратную транскриптазу или белки ВИЧ, кодируемые *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* and *vpu*.

Антигены, происходящие из вируса простого герпеса (*например*, HSV 1 и HSV2), включают, но без ограничения, белки, экспрессируемые поздними генами HSV. Поздняя группа генов преимущественно кодирует белки, образующие частицу вириона. Такие белки включают пять белков из (UL), которые образуют вирусный капсид: UL6, UL18, UL35, UL38 и основной белок капсида UL19, UL45 и UL27, каждый из которых можно использовать в качестве антигена, как описано в данном документе. Другие иллюстративные белки HSV, рассматриваемые в настоящем изобретении для использования в качестве антигенов, включают белки ICP27 (H1, H2), гликопротеин В (gB) и гликопротеин D (gD). Геном HSV содержит по меньшей мере 74 гена, каждый из которых кодирует белок, который потенциально может быть использован в качестве антигена.

Антигены, происходящие из цитомегаловируса (CMV), включают структурные белки CMV, вирусные антигены, экспрессируемые во время непосредственной ранней и ранней фаз репликации вируса, гликопротеины I и III, капсидный белок, белок оболочки,

белок pp65 (ppUL83), p52 (ppUL44), IE1 и IE2 (UL123 и UL122), белковые продукты из кластера генов из UL128-UL150 (Rykman, et al., 2006), гликопротеин В оболочки (gB), gH, gN и pp150. Как будет понятно специалисту, белки CMV для использования в качестве антигенов, описанных в данном документе, могут быть указаны в общедоступных базах данных, таких как GENBANK®, SWISS-PROT® и TREMBL® (см., например, Bennekov et al., 2004; Loewendorf et al., 2010 ; Marschall et al., 2009).

Антигены, полученные из вируса Эпштейна-Барр (EBV), которые предполагается использовать в некоторых вариантах осуществления, включают литические белки EBV gp350 и gp110, белки EBV, продуцируемые во время латентного цикла инфекции, включая ядерный антиген Эпштейна-Барр (EBNA)-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-лидерный белок (EBNA-LP) и латентные мембранные белки (LMP)-1, LMP-2A и LMP-2B (см., например, Lockey et al., 2008).

Антигены, происходящие от респираторно-синцитиального вируса (RSV), которые предполагается использовать в данном документе, включают любой из одиннадцати белков, кодируемых геномом RSV, или их антигенные фрагменты: NS1, NS2, N (нуклеокапсидный белок), М (белок матрикса) SH, G и F (белки вирусной оболочки), M2 (второй белок матрикса), M2-1 (фактор элонгации), M2-2 (регуляция транскрипции), РНК-полимераза и фосфопротеин Р.

Антигены, происходящие от вируса везикулярного стоматита (VSV), которые предполагается использовать, включают любой один из пяти основных белков, кодируемых геномом VSV, и их антигенные фрагменты: большой белок (L), гликопротеин (G), нуклеопротеин (N), фосфопротеин (P) и белок матрикса (M) (см., например, Rieder et al., 1999).

Антигены, полученные из вируса гриппа, которые предполагается использовать в некоторых вариантах осуществления, включают гемагглютинин (HA), нейраминидазу (NA), нуклеопротеин (NP), белки матрикса М1 и М2, NS1, NS2 (NEP), PA, PB1, PB1-F2 и PB2.

Иллюстративные вирусные антигены также включают, но без ограничения, аденовирусные полипептиды, альфавирусные полипептиды, калицивирусные полипептиды (например, капсидный антиген кальцивируса), коронавирусные полипептиды, полипептиды вируса собачьей чумы, полипептиды вируса Эбола, энтеровирусные полипептиды, флавивирусные полипептиды, полипептиды вируса гепатита (AE) (коровый или поверхностный антиген гепатита В, гликопротеины E1 или E2 вируса гепатита С, коровые или неструктурные белки), полипептиды вируса герпеса (включая гликопротеин вируса простого герпеса или гликопротеин вируса ветряной оспы), вирусные полипептиды инфекционного перитонита, полипептиды вирусов лейкемии, полипептиды вируса Марбург, ортомиксовирусные полипептиды, полипептиды вируса папилломы, полипептиды вируса парагриппа (например, полипептиды гемагглютинина и нейраминидазы), парамиксовирусные полипептиды, парвовирусные полипептиды, пестивирусные полипептиды, пикорнавирусные полипептиды (например, полипептид

капсида полиовируса), полипептиды вируса оспы (например, полипептид вируса вакцины, полипептиды вируса бешенства (например, гликопротеин G вируса бешенства), полипептиды реовируса, полипептиды ретровируса и полипептиды ротавируса.

В некоторых вариантах осуществления антигеном могут быть бактериальные антигены. В некоторых вариантах осуществления интересующий бактериальный антиген может представлять собой секретируемый полипептид. В других определенных вариантах осуществления бактериальные антигены включают антигены, часть или части полипептида которых находятся на внешней клеточной поверхности бактерий.

Антигены, полученные из видов *Staphylococcus*, включая устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus* (MRSA), которые предполагается использовать, включают регуляторы вирулентности, такие как система Agr, Sar и Sae, система Arl, гомологи Sar (Rot, MgrA, SarS, SarR, SarT, SarU, SarV, SarX, SarZ и TcaR), система Srg и TRAP. Другие белки *Staphylococcus*, которые могут выступать в качестве антигенов, включают белки Clp, HtrA, MsrR, аконитазу, CspA, SvfA, Msa, CfvA и CfvB (см., например, *Staphylococcus: Molecular Genetics*, 2008 Caister Academic Press, Ed. Jodi Lindsay). Геномы для двух видов *Staphylococcus aureus* (N315 и Mu50) были секвенированы и общедоступны, например, на Patric (PATRIC: The VBI PathoSystems Resource Integration Center, Snyder *et al.*, 2007)). Как должно быть понятно специалисту в данной области, белки *Staphylococcus* для использования в качестве антигенов могут также быть указаны в других публичных базах данных, таких как GenBank®, Swiss-Prot® и TrEMBL®.

Антигены, полученные из *Streptococcus pneumoniae*, которые предполагается использовать в некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем изобретении, включают пневмолизин, PspA, связывающий холин белок A (CbpA), NanA, NanB, SpnHL, PavA, LytA, Pht и белки пилина (RrgA; RrgB; RrgC). Антигенные белки *Streptococcus pneumoniae* также известны в данной области и могут использоваться в качестве антигена в некоторых вариантах осуществления (см., например, Zysk *et al.*, 2000). Полная последовательность генома вирулентного штамма *Streptococcus pneumoniae* была секвенирована, и, как будет понятно специалисту, белки *S. pneumoniae* для использования в настоящем изобретении также могут быть идентифицированы в других общедоступных базах данных, таких как GENBANK®, SWISS-PROT® и TREMBL®. Белки, представляющие особый интерес для антигенов в соответствии с настоящим раскрытием, включают факторы вирулентности и белки, которые, как предполагается, будут находиться на поверхности пневмококков (см., например, Frolet *et al.*, 2010).

Примеры бактериальных антигенов, которые можно использовать в качестве антигенов, включают в себя, но без ограничения, полипептиды *Actinomyces*, полипептиды *Bacillus*, полипептиды *Bacteroides*, полипептиды *Bordetella*, полипептиды *Bartonella*, полипептиды *Borrelia* (например, *B. burgdorferi* OspA), полипептиды *Brucella*, полипептиды *Campylobacter*, полипептиды *Carnocytophaga*, полипептиды *Chlamydia*, полипептиды *Corynebacterium*, полипептиды *Coxiella*, полипептиды *Dermatophilus*, полипептиды *Enterococcus*, полипептиды *Ehrlichia*, полипептиды *Escherichia*, полипептиды *Francisella*,

полипептиды *Fusobacterium*, полипептиды *Haemobartonella*, полипептиды *Haemophilus* (например, внешний мембранный белок *H. influenzae* типа В), полипептиды *Helicobacter*, полипептиды *Klebsiella*, бактериальные полипептиды L-формы, полипептиды *Leptospira*, полипептиды *Listeria*, полипептиды *Mycobacteria*, полипептиды *Mycoplasma*, полипептиды *Neisseria*, полипептиды *Neorickettsia*, полипептиды *Nocardia*, полипептиды *Pasteurella*, полипептиды *Peptococcus*, полипептиды *Peptostreptococcus*, полипептиды *Pneumococcus* (то есть полипептиды *S. pneumoniae*) (см. описание в настоящем изобретении), полипептиды *Proteus*, полипептиды *Pseudomonas*, полипептиды *Rickettsia*, полипептиды *Rochalimaea*, полипептиды *Salmonella*, полипептиды *Shigella*, полипептиды *Staphylococcus*, полипептиды *streptococcus* группы А (например, белки *S. pyogenes* М), полипептиды *streptococcus* группы В (*S. agalactiae*), полипептиды *Treponema* и полипептиды *Yersinia* (например, антигены F1 и V *Y. pestis*).

Примеры грибковых антигенов включают в себя, но без ограничения, полипептиды *Absidia*, полипептиды *Acremonium*, полипептиды *Alternaria*, полипептиды *Aspergillus*, полипептиды *Basidiobolus*, полипептиды *Bipolaris*, полипептиды *Blastomyces*, полипептиды *Candida*, полипептиды *Coccidioides*, полипептиды *Conidiobolus*, полипептиды *Cryptococcus*, полипептиды *Curvalaria*, полипептиды *Epidermophyton*, полипептиды *Exophiala*, полипептиды *Geotrichum*, полипептиды *Histoplasma*, полипептиды *Madurella*, полипептиды *Malassezia*, полипептиды *Microsporum*, полипептиды *Moniliella*, полипептиды *Mortierella*, полипептиды *Mucor*, полипептиды *Paecilomyces*, полипептиды *Penicillium*, полипептиды *Phialemonium*, полипептиды *Phialophora*, полипептиды *Prototheca*, полипептиды *Pseudallescheria*, полипептиды *Pseudomicrodochium*, полипептиды *Pythium*, полипептиды *Rhinosporidium*, полипептиды *Rhizopus*, полипептиды *Scolecobasidium*, полипептиды *Sporothrix*, полипептиды *Stemphylium*, полипептиды *Trichophyton*, полипептиды *Trichosporon* полипептиды и полипептиды *Xylohypha*.

Примеры антигенов простейших паразитов включают в себя, но без ограничения, полипептиды *Babesia*, полипептиды *Balantidium*, полипептиды *Besnoitia*, полипептиды *Cryptosporidium*, полипептиды *Eimeria*, полипептиды *Encephalitozoon*, полипептиды *Entamoeba*, полипептиды *Giardia*, полипептиды *Hammondia*, полипептиды *Hepatozoon*, полипептиды *Isospora*, полипептиды *Leishmania*, полипептиды *Microsporidia*, полипептиды *Neospora*, полипептиды *Nosema*, полипептиды *Pentatrichomonas*, полипептиды *Plasmodium*.
Примеры антигенов паразитических червей включают в себя, но без ограничения, полипептиды *Acanthocheilonema*, полипептиды *Aelurostrongylus*, полипептиды *Ancylostoma*, полипептиды *Angiostrongylus*, полипептиды *Ascaris*, полипептиды *Brugia*, полипептиды *Bunostomum*, полипептиды *Capillaria*, полипептиды *Chabertia*, полипептиды *Cooperia*, полипептиды *Crenosoma*, полипептиды *Dictyocaulus*, полипептиды *Dioctophyme*, полипептиды *Dipetalonema*, полипептиды *Diphyllobothrium*, полипептиды *Diplydium*, полипептиды *Dirofilaria*, полипептиды *Dracunculus*, полипептиды *Enterobius*, полипептиды *Filaroides*, полипептиды *Haemonchus*, полипептиды *Lagochilascaris*, полипептиды *Loa*, полипептиды *Mansonella*, полипептиды *Muellerius*, полипептиды *Nanophyetus*,

полипептиды *Necator*, полипептиды *Nematodirus*, полипептиды *Oesophagostomum*, полипептиды *Onchocerca*, полипептиды *Opisthorchis*, полипептиды *Ostertagia*, полипептиды *Parafilaria*, полипептиды *Paragonimus*, полипептиды *Parascaris*, полипептиды *Physaloptera*, полипептиды *Protostrongylus*, полипептиды *Setaria*, полипептиды *Spirocerca*, полипептидов *Spirometra*, полипептиды *Stephanofilaria*, полипептиды *Strongyloides*, полипептиды *Strongylus*, полипептиды *Thelazia*, полипептиды *Toxascaris*, полипептиды *Toxocara*, полипептиды *Trichinella*, полипептиды *Trichostrongylus*, полипептиды *Trichuris*, полипептиды *Uncinaria* и полипептиды *Wuchereria* (например, циркумспорозит *P. falciparum* (PfCSP)), поверхностный белок 2 спорозит (PfSSP2), карбоксильный конец антигена печеночной стадии 1 (PfLSA1 c-term) и секретируемый белок 1 (PfExp-1), полипептиды *Pneumocystis*, полипептиды *Sarcocystis*, полипептиды *Schistosoma*, полипептиды *Theileria*, полипептиды *Toxoplasma* и полипептиды *Trypanosoma*.

Примеры антигенов эктопаразитов включают, но без ограничения, полипептиды (в том числе антигены, а также аллергены) блох; клещей, в том числе клещей с твердым покровом и клещей с мягким покровом; мух, таких как звонцы, комары, москиты, мошки, черные тли, слепни, жигалки, оленьи мухи, мухи цеце, домовые мухи, вызывающие миаз мухи и кусающие мошки; муравьи; пауки, вши; клещи; и настоящие клопы, такие как постельные клопы и поцелуйные клопы.

D. Суицидальные гены

CAR иммунных клеток согласно настоящему раскрытию может содержать один или несколько суицидальных генов. В рамках настоящего изобретения термин «суицидальный ген» определяется как ген, который при введении пролекарства вызывает переход продукта гена в соединение, которое убивает его клетку-хозяина. Примерами комбинаций суицидального гена/пролекарства, которые можно использовать, являются тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSV-tk) и ганцикловир, ацикловир или FIAU; оксидоредуктаза и циклогексимид; цитозиндезаминаза и 5-фторцитозин; тимидинкиназа тимидилаткиназа (Tdk :: Tmk) и AZT; и дезоксицитидинкиназа и цитозинарабинозид.

Пури́н-нуклеозидфосфори́лаза *E. coli*, так называемый суицидальный ген, который преобразует пролекарство 6-метилпури́н дезоксирибозид в токсичный пури́н 6-метилпури́н. Другими примерами суицидальных генов, используемых с пролекарственной терапией, являются ген цитозиндезаминазы *E. coli* и ген тимидинкиназы HSV.

Иллюстративные суицидальные гены включают в себя CD20, CD52, EGFRv3 или индуцируемые каспазы 9. В одном варианте осуществления усеченный вариант EGFR варианта III (EGFRv3) можно использовать в качестве суицидального антигена, который можно удалить с помощью цетуксимаба. Другие суицидальные гены, известные в данной области, которые можно использовать в настоящем раскрытии, включают пуриновую нуклеозидфосфорилазу (PNP), ферменты цитохрома p450 (CYP), карбоксипептидазы (CP), карбоксилэстеразу (CE), нитроредуктазу (NTR), гуанин-рибозилтрансферазу (XGRTP), ферменты гликозидазы, метионин- α , γ -лиазу (MET) и тимидинфосфорилазу (TP).

E. Способы доставки

Специалист в данной области имеет все необходимое для конструирования вектора с помощью стандартных рекомбинантных методик (см., например, Sambrook et al., 2001 и Ausubel et al., 1996, оба включены в настоящее описание посредством ссылки) для экспрессии антигенных рецепторов согласно настоящему раскрытию. Векторы включают, но без ограничения, плазмиды, космиды, вирусы (бактериофаги, вирусы животных и вирусы растений) и искусственные хромосомы (например, YAC), например, ретровирусные векторы (например, полученные из векторов вируса мышинного лейкоза Молони (MoMLV), MSCV, SFFV, MPSV, SNV и т.д.), лентивирусные векторы (например, полученные из ВИЧ-1, ВИЧ-2, SIV, BIV, FIV и т.д.), аденовирусные (Ad) векторы, включая их репликационно-компетентные, репликационно-дефицитные и выпотрошенные формы, векторы аденоассоциированного вируса (AAV), векторы вируса обезьяны 40 (SV-40), векторы вируса папилломы крупного рогатого скота, векторы вируса Эпштейна-Барр, векторы вируса герпеса, векторы вируса осповакцины, векторы вируса саркомы мыши Харви, векторы вируса опухоли молочной железы мышей, векторы вируса саркомы Рауса, векторы парвовируса, векторы полиовируса, векторы вируса везикулярного стоматита, векторы вируса Maraba и векторы аденовируса enadenotucirev группы В.

а. Вирусные векторы

В некоторых аспектах настоящего раскрытия могут быть предоставлены вирусные векторы, кодирующие антигенный рецептор. При создании рекомбинантных вирусных векторов несущественные гены обычно заменяют геном или кодирующей последовательностью для гетерологичного (или ненативного) белка. Вирусный вектор - это своего рода экспрессионная конструкция, в которой использованы вирусные последовательности для введения в клетку нуклеиновой кислоты и, возможно, белков. Способность некоторых вирусов инфицировать клетки или проникать в клетки с помощью опосредованного рецептором эндоцитоза, а также встраиваться в геномы клеток-хозяев и стабильно и эффективно экспрессировать вирусные гены, делая их привлекательными кандидатами для переноса чужеродных нуклеиновых кислот в клетки (например, клетки млекопитающих). Ниже описаны неограничивающие примеры вирусных векторов, которые можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты согласно некоторым аспектам настоящего изобретения.

Лентивирусы представляют собой сложные ретровирусы, которые, помимо обычных ретровирусных генов *gag*, *pol* и *env*, содержат другие гены с регуляторной или структурной функцией. Лентивирусные векторы хорошо известны в данной области (см., например, патенты США 6013516 и 5994136).

Рекомбинантные лентивирусные векторы способны инфицировать неделящиеся клетки, и их можно использовать для переноса и экспрессии генов и последовательностей нуклеиновых кислот как *in vivo*, так и *ex vivo*. Например, в патенте США 5994136, включенном в настоящее описание посредством ссылки, описан рекомбинантный лентивирус, способный инфицировать неделящуюся клетку, причем подходящая клетка-хозяин трансфицирована двумя или более векторами, имеющими функции упаковки, а

именно gag, pol и env, а также rev и tat.

b. Регуляторные элементы

Экспрессионные кассеты, включенные в векторы, используемые в настоящем раскрытии, в частности, содержат (в направлении от 5'-к-3') эукариотический промотор транскрипции, функционально связанный с кодирующей белок последовательностью, сигналы сплайсинга, включая промежуточные последовательности, и последовательность терминации транскрипции/полиаденилирования. Промоторы и энхансеры, контролирующие транскрипцию генов, кодирующих белок в эукариотических клетках, состоят из множества генетических элементов. Клеточный аппарат способен собирать и интегрировать регуляторную информацию, передаваемую каждым элементом, позволяя различным генам развивать различные, часто сложные схемы регуляции транскрипции. Промотор, используемый в контексте настоящего раскрытия, включает конститутивные, индуцибельные и тканеспецифичные промоторы.

(i) Промоторы/Энхансеры

Экспрессионные конструкции, представленные в данном документе, содержат промотор для запуска экспрессии антигенного рецептора. Промотор обычно содержит последовательность, которая функционирует, позиционируя стартовый сайт для синтеза РНК. Ее наиболее известным примером является ТАТА-бокс, но в некоторых промоторах, лишенных ТАТА-бокса, таких как, например, промотор гена терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы млекопитающих и промотор поздних генов SV40, дискретный элемент, расположенный перед сайтом начала помогает зафиксировать место инициирования. Дополнительные элементы промотора регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в районе 30110 п.н. Перед сайтом инициации, хотя ряд промоторов, как было показано, также содержат функциональные элементы после сайта инициации. Для того, чтобы поместить кодирующую последовательность «под контроль» промотора, нужно расположить 5'-конец сайта инициации транскрипции транскрипционной рамки считывания «после» (то есть 3') от выбранного промотора. «Расположенный выше» промотор стимулирует транскрипцию ДНК и способствует экспрессии кодируемой РНК.

Расстояние между промоторными элементами часто является гибким, так что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертируют или перемещают друг относительно друга. В промоторе tk расстояние между промоторными элементами можно увеличить до 50 п.н., прежде чем активность начнет снижаться. В зависимости от промотора оказывается, что, чтобы активировать транскрипцию, отдельные элементы могут действовать совместно или независимо. Промотор можно использовать или не использовать в сочетании с «энхансером», который относится к цис-действующей регуляторной последовательности, участвующей в активации транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты.

Промотором может быть промотор, естественным образом связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая может быть получена путем

выделения 5' некодирующих последовательностей, расположенных перед кодирующим сегментом и/или экзоном. Такой промотор можно назвать «эндогенным». Точно так же энхансер может быть естественным образом связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, расположенной либо после, либо перед этой последовательностью. Альтернативно, определенные преимущества будут получены за счет размещения кодирующего сегмента нуклеиновой кислоты под управлением рекомбинантного или гетерологичного промотора, который относится к промотору, который обычно не связан с последовательностью нуклеиновой кислоты в ее естественном окружении. Рекомбинантный или гетерологичный энхансер также относится к энхансеру, обычно не связанному с последовательностью нуклеиновой кислоты в ее естественном окружении. Такие промоторы или энхансеры могут включать промоторы или энхансеры других генов, и промоторы или энхансеры, выделенные из любого другого вируса или прокариотической или эукариотической клетки, и промоторы или энхансеры, не «встречающиеся в природе», то есть содержащие разные элементы разных регуляторных областей транскрипции, и/или мутации, изменяющие экспрессию. Например, промоторы, которые наиболее широко используют при получении рекомбинантной ДНК, включают промоторные системы β -лактамазы (пенициллиназы), лактозы и триптофана (*trp*-). Помимо получения последовательностей нуклеиновых кислот промоторов и энхансеров синтетическим путем, последовательности можно получать с использованием технологии рекомбинантного клонирования и/или амплификации нуклеиновых кислот, включая ПЦР™, в сочетании с композициями, раскрытыми в данном документе. Кроме того, предполагается, что также можно использовать контрольные последовательности, которые управляют транскрипцией и/или экспрессией последовательностей в неядерных органеллах, таких как митохондрии, хлоропласты и т.п.

Естественно, будет важно использовать промотор и/или энхансер, который эффективно направляет экспрессию сегмента ДНК в органелле, типе клеток, ткани, органе или организме, выбранных для экспрессии. Специалистам в области молекулярной биологии, как правило, известно использование комбинаций промоторов, энхансеров и типов клеток для экспрессии белка (см., например, Sambrook et al. 1989, включенный в настоящее описание посредством ссылки). Используемые промоторы могут быть конститутивными, тканеспецифическими, индуцибельными и/или полезными в соответствующих условиях для управления высоким уровнем экспрессии введенного сегмента ДНК, например, что является преимуществом при крупномасштабном производстве рекомбинантных белков и/или пептидов. Промотор может быть гетерологичным или эндогенным.

Кроме того, любая комбинация промотор/энхансер (согласно, например, базе данных эукариотических промоторов EPDB на epd.isb-sib.ch/ в глобальной сети) также можно использовать для управления экспрессией. Другим возможным вариантом осуществления является использование системы цитоплазматической экспрессии T3, T7 или SP6. Эукариотические клетки могут поддерживать цитоплазматическую транскрипцию

с определенных бактериальных промоторов, если имеется соответствующая бактериальная полимеразы, либо как часть комплекса доставки, либо как дополнительная конструкция генетической экспрессии.

Неограничивающие примеры промоторов включают ранние или поздние вирусные промоторы, такие как ранние или поздние промоторы SV40, немедленные ранние промоторы цитомегаловируса (CMV), ранние промоторы вируса саркомы Рауса (RSV); промоторы эукариотических клеток, такие как, например, промотор бета-актина, промотор GADPH, промотор металлотioneина; и конкатенированные промоторы элемента ответа, такие как промоторы элемента ответа циклического АМФ (cre), промотор элемента ответа сыворотки (sre), промотор сложного эфира форбола (TPA) и промоторы элемента ответа (tre) рядом с минимальным ТАТА-боксом. Кроме того, можно использовать промоторные последовательности гормона роста человека (например, минимальный промотор гормона роста человека, описанный в Genbank, учетный номер X05244, нуклеотид 283-341) или промотор опухоли молочной железы мышей (доступный из ATCC, учетный номер ATCC 45007). В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой CMV IE, дектин-1, дектин-2, человеческий CD11c, F4/80, SM22, RSV, SV40, Ad MLP, бета-актин, промотор МНС I класса или МНС II класса, однако в практике настоящего раскрытия применим любой другой промотор, который полезен для управления экспрессией терапевтического гена.

В некоторых аспектах способы настоящего раскрытия также касаются энхансерных последовательностей, то есть последовательностей нуклеиновых кислот, которые увеличивают активность промотора и которые обладают потенциалом действовать в cis-системе, независимо от их ориентации, даже на относительно больших расстояниях (до несколько т.п.н. от целевого промотора). Однако энхансерная функция не обязательно ограничена такими большими расстояниями, поскольку они также могут функционировать в непосредственной близости от данного промотора.

(ii) Сигналы инициации и связанная экспрессия

В конструкциях экспрессии, предусмотренных в настоящем раскрытии, также можно использовать конкретный сигнал инициации для эффективной трансляции кодирующих последовательностей. Эти сигналы включают кодон инициации ATG или соседние последовательности. Может потребоваться предоставление экзогенных контрольных сигналов трансляции, включая иницирующий кодон ATG. Рядовой специалист в данной области легко может определить это и обеспечить необходимые сигналы. Хорошо известно, что иницирующий кодон должен находиться «внутри» рамки считывания нужной кодирующей последовательности, чтобы гарантировать трансляцию всей вставки. Экзогенные сигналы управления трансляцией и кодоны инициации могут быть природными или синтетическими. Эффективность экспрессии можно повысить за счет включения соответствующих энхансерных элементов транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления для создания мультигенных или полицистронных сообщений используют элементы внутренних участков посадки

рибосомы (IRES). Элементы IRES способны обходить модель сканирования рибосом 5' метилированной Cap-зависимой трансляции и начинать трансляцию на внутренних участках. Были описаны элементы IRES из двух членов семейства пикорнавирусов (полио и энцефаломиокардит), а также IRES из относящегося к млекопитающим сообщения. Элементы IRES могут быть связаны с гетерологичными открытыми рамками считывания. можно вместе транскрибировать несколько открытых рамок считывания, каждая из которых разделена IRES, создавая полицистронные сообщения. Благодаря элементу IRES каждая открытая рамка считывания доступна рибосомам для эффективной трансляции. можно эффективно экспрессировать множество генов с использованием одного промотора/энхансера для транскрипции одного сообщения.

Кроме того, для создания сцепленной или совместной экспрессии генов в конструкциях, представленных в настоящем раскрытии, можно использовать некоторые элементы последовательности 2A. Например, для совместной экспрессии генов путем связывания открытых рамок считывания с образованием единого цистрона можно использовать последовательности расщепления. Иллюстративной последовательностью расщепления является F2A (вирус ящура 2A) или «2A-подобная» последовательность (например, вирус *Thosea asigna* 2A; T2A).

(iii) Точки начала репликации

Для размножения вектора в клетке-хозяине может иметься одна или несколько точек начала сайтов репликации (часто называемых «ori»), например, последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующая oriP EBV, как описано выше, или генетически сконструированной oriP с аналогичной или усиленной функцией программирования, которая представляет собой конкретную последовательность нуклеиновой кислоты, в которой начинается репликация. В качестве альтернативы можно использовать точку начала репликации другого внехромосомно реплицирующегося вируса, как описано выше, или автономно реплицирующуюся последовательность (ARS).

с. Селективные и скринируемые маркеры

В некоторых вариантах осуществления клетки, содержащие конструкцию согласно настоящему раскрытию, можно идентифицировать *in vitro* или *in vivo* путем включения маркера в вектор экспрессии. Такие маркеры могли бы придать идентифицируемое изменение клетке, позволяя легко идентифицировать клетки, содержащие вектор экспрессии. Как правило, селективный маркер - это маркер, который придает свойство, обеспечивающее выбор. Положительный селективный маркер - это маркер, при котором присутствие маркера обеспечивает его селекцию, а отрицательный селективный маркер - это маркер, при котором его присутствие препятствует его селекции. Примером положительного селективного маркера является маркер лекарственной устойчивости.

Как правило, включение селективного маркера лекарственного средства помогает клонированию и идентификации трансформантов, например, гены, которые придают устойчивость к неомицину, пурамицину, гигромицину, DHFR, GPT, зеоцину и гистидинолу являются полезными селективными маркерами. Помимо маркеров, придающих фенотип,

который позволяет различать трансформанты на основе создания условий, также рассматриваются другие типы маркеров, включая скринируемые маркеры, такие как GFP, которые основаны на колориметрическом анализе. Альтернативно в качестве отрицательных селективных маркеров можно использовать скринируемые ферменты, такие как тимидинкиназа вируса простого герпеса (tk) или хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT). Специалист в данной области также знает, как использовать иммунологические маркеры, возможно, в сочетании с анализом FACS. Считается не важно, какой маркер использовать, если он способен экспрессироваться одновременно с нуклеиновой кислотой, кодирующей продукт гена. Специалисту в данной области хорошо известны дополнительные примеры селективных и скринируемых маркеров.

d. Другие способы доставки нуклеиновых кислот

В дополнение к вирусной доставке нуклеиновых кислот, кодирующих антигенный рецептор, далее представлены и, таким образом, в настоящем раскрытии рассмотрены дополнительные методы рекомбинантной доставки генов в данную клетку-хозяин.

Для введения нуклеиновой кислоты, такой как ДНК или РНК, в иммунные клетки согласно настоящему раскрытию можно использовать любые подходящие методы доставки нуклеиновых кислот для трансформации клетки, которые описаны в данном документе или которые должны быть известны рядовому специалисту в данной области. Такие методы включают, но без ограничения, прямую доставку ДНК, например, трансфекцию *ex vivo*, инъекцию, в том числе микроинъекцию; электропорацию; осаждение фосфатом кальция; использование DEAE-декстрана, а затем полиэтиленгликоля; прямую ультразвуковую загрузку; опосредованную липосомами трансфекцию, и опосредованную рецепторами трансфекцию; бомбардировку микрочастицами; перемешивание с волокнами карбида кремния; опосредованную *Agrobacterium* трансформацию; опосредованное высушиванием/ингибированием поглощение ДНК и любую комбинацию таких методов. Посредством применения таких методов органелла (органеллы), клетка (клетки), ткань (ткани) или организм (организмы) можно трансформировать стабильно или временно.

F. Модификация экспрессии генов

В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки согласно настоящему раскрытию модифицированы, чтобы иметь измененную экспрессию CISH. В дополнительных вариантах осуществления клетки можно дополнительно модифицировать для нарушения экспрессии рецептора глюкокортикоидов и/или рецептора TGF β (например, TGF β -RII). В одном варианте осуществления иммунные клетки можно модифицировать для экспрессии доминантно-отрицательного рецептора II TGF β (TGF β RIIDN), который может функционировать в качестве приемника цитокинов для истощения эндогенного TGF β .

В некоторых вариантах осуществления измененная экспрессия гена осуществляется за счет нарушения работы гена, такого как нокаут, вставка, бессмысленная мутация или мутация со сдвигом рамки считывания, например, мутация с двуаллельным сдвигом рамки считывания, делеция всего или части гена и, вследствие этого, например, одного или нескольких экзонов или их частей, и/или нокин. Например, измененная экспрессия гена

может осуществляться с помощью специфических для последовательности нуклеаз или нуклеаз-мишеней, включая ДНК-связывающие нуклеазы-мишени, такие как нуклеазы цинковых пальцев (ZFN) и эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), и нуклеазы, управляемые РНК, например, CRISPR-ассоциированные нуклеазы (Cas), специально сконструированные для нацеливания на последовательность гена или его часть.

В некоторых вариантах осуществления изменение экспрессии, активности и/или функции гена осуществляют путем разрушения гена. В некоторых аспектах ген модифицируют таким образом, чтобы снизить его экспрессию по меньшей мере или приблизительно на 20, 30 или 40%, обычно по меньшей мере или приблизительно на 50, 60, 70, 80, 90 или 95% по сравнению с экспрессией в отсутствие модификации гена или в отсутствие компонентов, введенных для осуществления модификации.

В некоторых вариантах осуществления изменение является временным или обратимым, чтобы экспрессия гена восстановилась в более позднее время. В других вариантах осуществления изменение не является обратимым или временным, например, постоянным.

В некоторых вариантах осуществления изменение гена осуществляют путем индукции одного или нескольких двухцепочечных разрывов и/или одного или нескольких одноцепочечных разрывов в гене, как правило, целенаправленно. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечные или одноцепочечные разрывы производят с помощью нуклеазы, например, эндонуклеазы, такой как нуклеаза, нацеленная на ген. В некоторых аспектах индуцируют разрывы в кодирующей области гена, например, в экзоне. Например, в некоторых вариантах осуществления индукция происходит около N-концевой части кодирующей области, например, в первом экзоне, во втором экзоне или в последующем экзоне.

В некоторых аспектах двухцепочечные или одноцепочечные разрывы подвергают репарации посредством процесса клеточной репарации, такого как негомологичное соединение концов (NHEJ) или гомологически-направленная репарация (HDR). В некоторых аспектах процесс репарации подвержен ошибкам и приводит к нарушению гена, например, к мутации сдвига рамки считывания, например, двуаллельной мутации сдвига рамки считывания, что может привести к полному нокауту гена. Например, в некоторых аспектах нарушение включает вызов делеции, мутации и/или вставки. В некоторых вариантах осуществления нарушение приводит к наличию раннего стоп-кодона. В некоторых аспектах наличие вставки, делеции, транслокации, мутации сдвига рамки считывания и/или преждевременного стоп-кодона приводит к нарушению экспрессии, активности и/или функции гена.

В некоторых вариантах осуществления изменение гена достигается с использованием антисмысловых методов, таких как РНК-интерференция (RNAi), короткая интерферирующая РНК (siRNA), короткая шпилька (shRNA), и/или используют рибозимы для избирательного подавления или репрессии экспрессии гена. Технология siRNA

представляет собой RNAi, в которой использована двухцепочечная молекула РНК, имеющая последовательность, гомологичную нуклеотидной последовательности мРНК, которая транскрибируется с гена, и последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности. siRNA обычно гомологична/комплементарна одной области мРНК, которая транскрибируется из гена, или может быть siRNA, содержащей множество молекул РНК, которые гомологичны/комплементарны различным областям. В некоторых аспектах siRNA содержится в полицистронной конструкции.

1. ZFP и ZFN

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на ДНК молекула представляет собой связывающий ДНК белок, такой как один или несколько белков цинковых пальцев (ZFP) или белок, подобный активатору транскрипции (TAL), слитый с эффекторным белком, таким как эндонуклеаза. Примеры включают ZFN, TALE и TALEN.

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на ДНК молекула содержит один или несколько белков цинковых пальцев (ZFP) или их доменов, которые связываются с ДНК специфическим для последовательности образом. ZFP или его домен представляет собой белок или домен в более крупной белке, который связывает ДНК специфическим для последовательности образом через один или несколько цинковых пальцев, участков аминокислотной последовательности в связывающем домене, структура которого стабилизируется за счет координации иона цинка. Термин связывающий ДНК белок цинкового пальца часто сокращают как белок цинкового пальца или ZFP. Среди ZFP есть искусственные домены ZFP, нацеленные на конкретные последовательности ДНК, обычно длиной 9-18 нуклеотидов, созданные путем сборки отдельных пальцев.

ZFP включают те, в которых домен с одним пальцем имеет длину иллюстративно 30 аминокислот и содержит альфа-спираль, содержащую два инвариантных остатка гистидина, скоординированных через цинк с двумя цистеинами одного бета-витка и имеющими два, три, четыре, пять, или шесть пальцев. Как правило, специфичность последовательности ZFP можно изменить путем произведения аминокислотных замен в четырех положениях спирали (-1, 2, 3 и 6) на спирали распознавания цинковых пальцев. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления молекула, содержащая ZFP или ZFP, не встречается в природе, например, сконструирована для связывания с выбранным сайтом-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на ДНК молекула представляет собой или содержит связывающий ДНК домен цинкового пальца, слитый с доменом расщепления ДНК с образованием нуклеазы цинкового пальца (ZFN). В некоторых вариантах осуществления белки слияния содержат домен расщепления (или полудомен расщепления) из по меньшей мере одного рестрикционного фермента типа IIS и один или несколько связывающих доменов цинковых пальцев, которые могут быть сконструированы или не сконструированы. В некоторых вариантах осуществления домен расщепления происходит из рестрикционного типа IIS Fok I. Fok I обычно катализирует двухцепочечное расщепление ДНК на 9 нуклеотидах от его сайта узнавания на одной цепи и 13 нуклеотидах

от его сайта узнавания на другой.

Многие геноспецифические сконструированные цинковые пальцы коммерчески доступны. Например, Sangamo Biosciences (Richmond, CA, USA) разработала платформу (CompoZr) для конструкции цинкового пальца в партнерстве с Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), что позволяет исследователям обойти конструкцию цинкового пальца и в целом проверить правильность и обеспечивает специально нацеленные цинковые пальцы для тысяч белков (Gaj et al., *Trends in Biotechnology*, 2013, 31 (7), 397-405). В некоторых вариантах осуществления используют коммерчески доступные цинковые пальцы, или их разрабатывают по индивидуальному заказу. (См., например, каталожные номера Sigma-Aldrich CSTZFND, CSTZFN, CTil-IKT и PZD0020).

2. TAL, TALE и TALEN

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на ДНК молекула содержит связывающий ДНК домен природного или сконструированного (не встречающегося в природе) белка, подобного активатору транскрипции (TAL), например, в эффекторном белке, похожем на активатор транскрипции (TALE), см, например, публикацию патента США № 2011/0301073, полностью включенную в настоящее описание посредством ссылки.

связывающий ДНК домен TALE или TALE представляет собой полипептид, содержащий один или несколько повторяющихся доменов/единиц TALE. Повторяющиеся домены участвуют в связывании TALE с его родственной последовательностью ДНК-мишени. Одиночная «повторяющаяся единица» (также называемая «повтором») обычно имеет длину 33-35 аминокислот и проявляет по меньшей мере некоторую гомологию последовательностей с другими повторяющимися последовательностями TALE в пределах встречающегося в природе белка TALE. Каждая единица повтора TALE содержит 1 или 2 связывающих ДНК остатка, составляющих пару повторяющихся переменных остатков (RVD), обычно в положениях 12 и/или 13 повтора. Естественный (канонический) код распознавания ДНК этих TALE был определен таким образом, что последовательность HD в положениях 12 и 13 приводит к связыванию с цитозином (C), NG связывается с T, NI с A, NN связывается с G или A, а NO связывается с T, также известны неканонические (атипичные) RVD. В некоторых вариантах осуществления TALE могут быть нацелены на любой ген путем создания массивов TAL со специфичностью к последовательности-мишени ДНК. Последовательность-мишень обычно начинается с тимидина.

В некоторых вариантах осуществления молекула представляет собой связывающую ДНК эндонуклеазу, такую как нуклеаза TALE (TALEN). В некоторых аспектах TALEN представляет собой белок слияния, содержащий связывающий ДНК домен, полученный из TALE, и каталитический домен нуклеазы для расщепления последовательности-мишени нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления TALEN распознает и расщепляет последовательность-мишень в гене. В некоторых аспектах расщепление ДНК приводит к двухцепочечным разрывам. В некоторых аспектах разрывы стимулируют скорость гомологичной рекомбинации или негомологичного соединения концов (NHEJ). Как

правило, NHEJ представляет собой несовершенный процесс репарации, который часто приводит к изменениям последовательности ДНК в месте расщепления. В некоторых аспектах механизмы репарации включают воссоединение того, что осталось от двух концов ДНК посредством прямого повторного лигирования или посредством так называемого микрогомологического соединения концов. В некоторых вариантах осуществления репарация посредством NHEJ приводит к небольшим вставкам или делециям и может использоваться для разрушения и тем самым репрессии гена. В некоторых вариантах осуществления модификация может представлять собой замену, делецию или добавление по меньшей мере одного нуклеотида. В некоторых аспектах клетка, в которой произошло событие индуцированного расщеплением мутагенеза, то есть событие мутагенеза, следующее за событием NHEJ, может быть идентифицировано и/или выбрано с помощью хорошо известных в данной области способов.

В некоторых вариантах осуществления повторы TALE собирают для специфического нацеливания на ген. (Gaj et al., 2013). Создана библиотека TALEN, нацеленных на 18740 генов, кодирующих человеческие белки (Kim et al., 2013). Специально разработанные массивы TALE коммерчески доступны через компании Cellectis BioResearch (Paris, France), Transposagen Biopharmaceuticals (Lexington, KY, USA) и Life Technologies (Grand Island, NY, USA). В частности, TALEN, нацеленные на CD38, являются коммерчески доступными (см. Gencoroeia, каталожные номера HTN222870-1, HTN222870-2 и HTN222870-3). Иллюстративные молекулы описаны, например, в опубликованных патентах США № US 2014/0120622 и 2013/0315884.

В некоторых вариантах осуществления TALEN вводят как трансгены, кодируемые одним или несколькими плазмидными векторами. В некоторых аспектах плазмидный вектор может содержать селективный маркер, который обеспечивает идентификацию и/или селекцию клеток, которые получили указанный вектор.

3. RGEN (системы CRISPR/Cas)

В некоторых вариантах осуществления изменение осуществляется с использованием одной или нескольких связывающих ДНК нуклеиновых кислот, например, изменение с помощью управляемой РНК эндонуклеазы (RGEN). Например, изменение может быть выполнено с помощью коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), и связанных с CRISPR белков (Cas). В общем, «система CRISPR» в совокупности относится к транскриптам и другим элементам, участвующим в экспрессии или направляющих активность ассоциированных с CRISPR («Cas») генов, включая последовательности, кодирующие ген Cas, последовательность *tracr* (транскриптивную CRISPR), (например, *tracrRNA* или активную частичную *tracrRNA*), последовательность *tracr-mate* (включая «прямой повтор» и частичный прямой повтор, обработанный *tracrRNA*, в контексте эндогенной системы CRISPR), гидовую последовательность (также называемую «спейсер» в контексте эндогенной системы CRISPR) и/или другие последовательности и транскрипты из локуса CRISPR.

Система нуклеазы CRISPR/Cas или нуклеазы CRISPR/Cas может содержать

некодирующую молекулу РНК (гидовую) РНК, которая специфично связывается с ДНК, и белок Cas (например, Cas9) с нуклеазной функциональностью (например, два нуклеазных домена). Один или несколько элементов системы CRISPR можно получать из системы CRISPR I типа, II типа или III типа, например, полученной из конкретного организма, содержащего эндогенную систему CRISPR, таких как *Streptococcus pyogenes*.

В некоторых аспектах нуклеазу Cas и гРНК (в том числе слияние crRNA, специфичной к последовательности-мишени, и фиксированной tracrRNA) вводят в клетку. В общем, сайты-мишени на 5'-конце гРНК нацеливают нуклеазу Cas на сайт-мишень, например, ген, с использованием комплементарного спаривания оснований. Сайт-мишень можно выбрать на основании его расположения непосредственно 5' к последовательности прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), такого как обычно NGG или NAG. В этом отношении гРНК нацелена на нужную последовательность путем модификации первых 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 14, 12, 11 или 10 нуклеотидов гидовой РНК, чтобы они соответствовали последовательности ДНК-мишени. В общем, система CRISPR характеризуется элементами, которые способствуют образованию комплекса CRISPR на участке последовательности-мишени. Обычно «последовательность-мишень» в общем относится к последовательности, для которой предназначена гидовая последовательность, чтобы иметь комплементарность, причем гибридизация между последовательностью-мишенью и гидовой последовательностью способствует образованию комплекса CRISPR. Не обязательно требуется полная комплементарность при условии, что комплементарности достаточно, чтобы вызвать гибридизацию и способствовать образованию комплекса CRISPR.

Система CRISPR может индуцировать двухцепочечные разрывы (DSB) на сайте-мишени, за которыми следуют сбои или изменения, которые обсуждались в данном документе. В других вариантах осуществления варианты cas9, считающиеся «никазами», используют, чтобы вызвать разрыв одной цепи на сайте-мишени. Например, для улучшения специфичности можно использовать спаренные никазы, каждая из которых направляется парой последовательностей, нацеленных на разные гРНК, таким образом, что при введении разрывов одновременно вводят 5' липкий конец. В других вариантах осуществления каталитически неактивный Cas9 сливают с гетерологичным эффекторным доменом, таким как репрессор или активатор транскрипции, чтобы влиять на экспрессию гена.

Последовательность-мишень может содержать любой полинуклеотид, например, полинуклеотиды ДНК или РНК. Последовательность-мишень может быть расположена в ядре или цитоплазме клетки, например, внутри органеллы клетки. Обычно последовательность или матрицу, которую можно использовать для рекомбинации в целевой локус, содержащий последовательности-мишени, называют «матрицей редактирования», или «редактирующим полинуклеотидом», или «редактирующей последовательностью». В некоторых аспектах экзогенный матричный полинуклеотид может называться матрицей редактирования. В некоторых аспектах рекомбинация представляет собой гомологичную рекомбинацию.

Обычно, в контексте эндогенной системы CRISPR образование комплекса CRISPR

(содержащего гидовую последовательность, гибридизированную с последовательностью-мишенью и образующую комплекс с одним или несколькими белками Cas) приводит к расщеплению одной или обеих цепей в последовательности-мишени (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 или более пар оснований) или около нее. Последовательность tracr, которая может содержать или состоять из всей или части последовательности tracr дикого типа (например, приблизительно или более чем приблизительно 20, 26, 32, 45, 48, 54, 63, 67, 85 или более нуклеотидов последовательности tracr дикого типа), также может образовывать часть комплекса CRISPR, например, путем гибридизации вдоль по меньшей мере части последовательности tracr со всей или частью сопряженной последовательности tracr, которая функционально связана с гидовой последовательностью. Последовательность tracr имеет достаточную комплементарность с сопряженной последовательностью tracr для гибридизации и участия в образовании комплекса CRISPR, например, по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% комплементарность последовательности по длине сопряженной последовательности tracr при оптимальном выравнивании.

Один или несколько векторов, запускающих экспрессию одного или нескольких элементов системы CRISPR, можно вводить в клетку таким образом, чтобы экспрессия элементов системы CRISPR направляла образование комплекса CRISPR в одном или нескольких сайтах-мишенях. Компоненты также можно доставить в клетки в виде белков и/или РНК. Например, фермент Cas, гидовая последовательность, связанная с сопряженной последовательностью tracr, и последовательность tracr, каждая может быть функционально связана с отдельными регуляторными элементами в отдельных векторах. Альтернативно, два или более элементов, экспрессируемых из одного и того же или разных регуляторных элементов, могут быть объединены в одном векторе с одним или несколькими дополнительными векторами, обеспечивающими любые компоненты системы CRISPR, не включенные в первый вектор. Вектор может содержать один или несколько сайтов встраивания, таких как последовательность распознавания рестрикционной эндонуклеазой (также называемая «сайтом клонирования»). В некоторых вариантах осуществления один или несколько сайтов встраивания расположены до и/или после одного или нескольких элементов последовательности одного или нескольких векторов. Когда используются несколько различных гидовых последовательностей, можно использовать одну конструкцию экспрессии для нацеливания активности CRISPR на несколько различных соответствующих последовательностей-мишеней в клетке.

Вектор может содержать регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей фермент CRISPR, такой как белок Cas. Неограничивающие примеры белков Cas включают Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известные как Csn1 и Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, их гомологи или их модифицированные варианты. Эти ферменты известны; например, аминокислотную последовательность белка Cas9 *S. pyogenes* можно

найти в базе данных SwissProt под учетным номером Q99ZW2.

Ферментом CRISPR может быть *cas9* (например, из *S. pyogenes* или *S. pneumoniae*). Фермент CRISPR может направлять расщепление одной или обеих цепей в месте расположения последовательности-мишени, например, в пределах последовательности-мишени и/или в пределах комплемента последовательности-мишени. Вектор может кодировать фермент CRISPR, который имеет мутацию по сравнению с соответствующим ферментом дикого типа, так что у мутантного фермента CRISPR отсутствует способность расщепления одной или обеих цепей полинуклеотида-мишени, содержащего последовательность-мишень. Например, замена аспартата на аланин (D10A) в каталитическом домене RuvCI Cas9 из *S. pyogenes* превращает Cas9 из нуклеазы, которая расщепляет обе цепи, в никазу (расщепляет одну цепь). В некоторых вариантах осуществления никазу Cas9 можно использовать в комбинации с гидовой последовательностью (последовательностями), например, двумя гидовыми последовательностями, которые нацелены, соответственно, на смысловую и антисмысловую цепи ДНК-мишени. Эта комбинация позволяет разрезать обе цепи и использовать их для индукции NHEJ или HDR.

В некоторых вариантах осуществления кодирующая фермент последовательность, кодирующая фермент CRISPR, кодон оптимизирована для экспрессии в конкретных клетках, таких как эукариотические клетки. Эукариотические клетки могут быть клетками конкретного организма, такого как млекопитающее, или происходить из него, включая, но без ограничения, человека, мышь, крысу, кролика, собаку или приматов, не являющихся человеком. В общем, оптимизация кодонов относится к процессу модификации последовательности нуклеиновой кислоты для усиления экспрессии в интересующих клетках-хозяевах путем замены по меньшей мере одного кодона нативной последовательности кодонами, которые более часто или чаще всего используются в генах этой клетки-хозяина при сохранении нативной аминокислотной последовательности. Различные виды проявляют особую склонность к определенным кодонам определенной аминокислоты. Склонность к кодонам (различия в использовании кодонов между организмами) часто коррелирует с эффективностью трансляции информационной РНК (мРНК), которая, в свою очередь, как полагают, зависит, среди прочего, от свойств транслируемых кодонов и доступности конкретных молекул транспортной РНК (тРНК). Преобладание выбранных тРНК в клетке обычно является отражением кодонов, наиболее часто используемых в синтезе пептидов. Соответственно, гены могут быть адаптированы для оптимальной экспрессии генов в данном организме на основе оптимизации кодонов.

В общем, гидовая последовательность представляет собой любую полинуклеотидную последовательность, имеющую достаточную комплементарность с полинуклеотидной последовательностью-мишенью для гибридизации с последовательностью-мишенью и прямого специфичного к последовательности связывания комплекса CRISPR с последовательностью-мишенью. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между гидовой последовательностью и

соответствующей ей последовательностью-мишенью при оптимальном выравнивании с использованием подходящего алгоритма выравнивания составляет приблизительно или более чем приблизительно 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или более.

Иллюстративные последовательности гРНК для NR3CS (глюкокортикоидного рецептора) включают Ex3 NR3C1 sG1 5-TGC TGT TGA GGA GCT GGA-3 (SEQ ID NO:1) и Ex3 NR3C1 sG2 5-AGC ACA CCA GGC AGA GTT-3 (SEQ ID NO:2). Иллюстративные последовательности гРНК для рецептора 2 TGF-бета включают EX3 TGFBR2 sG1 5-CGG CTG AGG AGC GGA AGA-3 (SEQ ID NO:3) и EX3 TGFBR2 sG2 5-TGG-AGG-TGA-GCA-ATC-CCC-3 (SEQ ID NO:4). Промотор T7, последовательность-мишень и перекрывающаяся последовательность могут иметь последовательность TTAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO:5) + последовательность-мишень+gttttagagctagaatagc (SEQ ID NO: 6).

Оптимальное выравнивание может быть определено с использованием любого подходящего алгоритма для выравнивания последовательностей, неограничивающий пример которого включает алгоритм Смита-Уотермана, алгоритм Нидлмана-Вунша, алгоритмы, основанные на преобразовании Барроуза-Уиллера (например, Burrows Wheeler Aligner), Clustal W, Clustal X, BLAT, Novoalign (Novocraft Technologies, ELAND (Illumina, San Diego, Calif.), SOAP (доступно на soap.genomics.org.cn) и Maq (доступно на maq.sourceforge.net).

Фермент CRISPR может быть частью белка слияния, содержащего один или несколько гетерологичных белковых доменов. Белок слияния фермента CRISPR может содержать любую дополнительную последовательность белка и необязательно линкерную последовательность между любыми двумя доменами. Примеры белковых доменов, которые могут быть слиты с ферментом CRISPR, включают без ограничения, метки питопа, последовательности репортерных генов и белковые домены, обладающие одной или несколькими из следующих активностей: активностью метилазы, активностью деметилазы, активностью активации транскрипции, активностью репрессии транскрипции, активностью транскрипционного фактора освобождения, активностью модификации гистонов, активностью расщепления РНК и активностью связывания нуклеиновых кислот. Неограничивающие примеры меток эпитопа включают метки гистидина (His), метки V5, метки FLAG, метки гемагглютиниона гриппа (HA), метки Мус, метки VSV-G и метки тиоредоксина (Ttx). Примеры репортерных генов включают, но без ограничения, глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-глюкуронидазу, люциферазу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), HcRed, DsRed, голубой флуоресцентный белок (CFP), желтый флуоресцентный белок (YFP) и аутофлуоресцентные белки, включая синий флуоресцентный белок (BFP). Фермент CRISPR может быть слит с последовательностью гена, кодирующего белок или фрагмент белка, которые связывают молекулы ДНК или связывают другие клеточные молекулы, включая, но без ограничения, белок, связывающий мальтозу (MBP), S-tag, слитые молекулы связывающего ДНК домена

Lex A (DBD), слитые молекулы связывающего ДНК домена GAL4A и слитые молекулы белка VP16 вируса простого герпеса (HSV). Дополнительные домены, которые могут образовывать часть белка слияния, содержащего фермент CRISPR, описаны в US 20110059502, включенном в настоящий документ посредством ссылки.

III. Методы лечения

В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлены способы иммунотерапии, включающие введение эффективного количества НК-клеток согласно настоящему раскрытию. В одном варианте осуществления изобретения медицинское заболевание или расстройство лечат путем переноса популяции НК-клеток, который вызывает иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления настоящего раскрытия рак или инфекции лечат путем переноса популяции НК-клеток, который вызывает иммунный ответ. В настоящем изобретении представлены способы лечения или замедления прогрессирования рака у индивидуума, включающие введение индивиду эффективного количества антиген-специфической клеточной терапии. Настоящие способы можно применять для лечения иммунных нарушений, солидных злокачественных опухолей, гематологических злокачественных опухолей и вирусных инфекций.

Опухоли, для которых применимы настоящие способы лечения, включают любой тип злокачественных клеток, например, те, которые обнаруживаются в солидной опухоли или гематологической опухоли. Иллюстративные солидные опухоли могут включать, но без ограничения, опухоль органа, выбранного из группы, состоящей из поджелудочной железы, толстой кишки, слепой кишки, желудка, головного мозга, головы, шеи, яичника, почки, гортани, саркомы, легкого, мочевого пузыря, меланомы, предстательной железы и молочной железы. Иллюстративные гематологические опухоли включают опухоли костного мозга, Т- или В-клеточные злокачественные новообразования, лейкемии, лимфомы, бластомы, миеломы и тому подобное. Дополнительные примеры рака, которые можно лечить с использованием представленных в данном документе способов, включают, но без ограничения, рак легких (включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточный рак легкого), рак брюшины, рак желудка (включая рак желудочно-кишечного тракта и рак стромы желудочно-кишечного тракта), рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почек, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, различные типы рака головы и шеи и меланомой.

Рак может относиться конкретно к следующему гистологическому типу, без ограничения: новообразование, злокачественное; карцинома; карцинома недифференцированная; гигантоклеточная и веретено-клеточная карцинома; мелкоклеточная карцинома; папиллярный рак; плоскоклеточная карцинома; лимфоэпителиальная карцинома; базальноклеточная карцинома; пиломатриксная карцинома; переходно-клеточная карцинома; папиллярная переходно-клеточная карцинома; аденокарцинома; гастринома злокачественная; холангиокарцинома;

гепатоцеллюлярная карцинома; комбинированная гепатоцеллюлярная карцинома и холангиокарцинома; трабекулярная аденокарцинома; аденоидно-кистозная карцинома; аденокарцинома при аденоматозном полипе; аденокарцинома, семейный полипоз толстой кишки; солидная карцинома; карциноидная опухоль злокачественная; бронхиолоальвеолярная аденокарцинома; папиллярная аденокарцинома; хромофобная карцинома; ацидофильная карцинома; оксифильная аденокарцинома; базофильная карцинома; светлоклеточная аденокарцинома; гранулярно-клеточная карцинома; фолликулярная аденокарцинома; папиллярная и фолликулярная аденокарцинома; неинкапсулированная склерозирующая карцинома; карцинома коры надпочечников; карцинома эндометриода; карцинома придатков кожи; апокринная аденокарцинома; аденокарцинома сальных желез; церуминозная аденокарцинома; мукоэпидермоидная карцинома; цистаденокарцинома; папиллярная цистаденокарцинома; папиллярная серозная цистаденокарцинома; муцинозная цистаденокарцинома; муцинозная аденокарцинома; карцинома из перстневидных клеток; инфильтративно-протоковая карцинома; медуллярная карцинома; лобулярная карцинома; воспалительная карцинома; болезнь Педжета, молочные железы; ацинарно-клеточная карцинома; аденосквамозная карцинома; аденокарцинома с плоскоклеточной метаплазией; тимома злокачественная; опухоль стромы яичника злокачественная; текома, злокачественная; гранулезно-клеточная опухоль, злокачественная; андробластома, злокачественная; карцинома из клеток Сертоли; опухоль из клеток Лейдига, злокачественная; липидноклеточная опухоль, злокачественная; параганглиома, злокачественная; экстрамаммарная параганглиома, злокачественная; феохромоцитомы; гломангиосаркома; злокачественная меланома; амеланотическая меланома; меланома поверхностного распространения; злокачественная меланома лентиго; акральные лентигозные меланомы; узловые меланомы; злокачественная меланома в гигантском пигментном невусе; меланома из эпителиоидных клеток; синий невус, злокачественный; саркома; фибросаркома; фиброзная гистиоцитомы, злокачественная; миксосаркома; липосаркома; лейомиосаркома; рабдомиосаркома; эмбриональная рабдомиосаркома; альвеолярная рабдомиосаркома; стромальная саркома; смешанная опухоль, злокачественная; смешанная мюллерова опухоль; нефробластома; гепатобластома; карциносаркома; мезенхимомы, злокачественная; опухоль Бреннера, злокачественная; филлоидная опухоль, злокачественная; синовиальная саркома; мезотелиома злокачественная; дисгерминома; эмбриональная карцинома; тератома, злокачественная; струма яичников, злокачественная; хориокарцинома; мезонефрома, злокачественная; гемангиосаркома; гемангиоэндотелиома, злокачественная; саркома Капоши; гемангиоперицитомы, злокачественная; лимфангиосаркома; остеосаркома; юкстакортикальная остеосаркома; хондросаркома; хондробластома, злокачественная; мезенхимальная хондрозаркома; гигантоклеточная опухоль кости; саркома Юинга; опухоль одонтогенная, злокачественная; амелобластная одонтогенная саркома; амелобластома, злокачественная; амелобластная фибросаркома; пинеалома, злокачественная; хордома; глиома, злокачественная; эпендимомы; астроцитомы; протоплазматическая астроцитомы;

фибрилярная астроцитомы; астробластома; глиобластома; олигодендроглиома; олигодендробластома; примитивная нейроэктодермальная опухоль; саркома мозжечка; ганглионейробластома; нейробластома; ретинобластома; обонятельная нейрогенная опухоль; менингиома, злокачественная; неврофибросаркома; неврилеммома, злокачественная; зернисто-клеточная опухоль, злокачественная; злокачественная лимфома; болезнь Ходжкина; Ходжкина; парагранулема; злокачественная лимфома, лимфоцитарная; злокачественная лимфома, крупноклеточная, диффузная; злокачественная лимфома, фолликулярная; грибовидный микоз; другие уточненные неходжкинские лимфомы; В-клеточная лимфома; неходжкинская лимфома низкой степени злокачественности/фолликулярная (NHL); мелкоклеточная лимфоцитарная (SL) NHL; средней степени злокачественности/фолликулярная NHL; диффузная NHL средней степени злокачественности; иммунобластная NHL высокой степени злокачественности; лимфобластная NHL высокой степени злокачественности; мелкоклеточная NHL с нерасщепленными ядрами высокой степени злокачественности; NHL с массивным поражением; лимфома из клеток мантии; СПИД-ассоциированная лимфома; Макроглобулинемия Вальденстрема; злокачественный гистиоцитоз; множественная миелома; саркома тучных клеток; иммунопролиферативная болезнь тонкого кишечника; лейкемия; лимфолейкоз; лейкоз плазматических клеток; эритролейкоз; лимфосаркома клеточный лейкоз; миелоидный лейкоз; базофильный лейкоз; эозинофильный лейкоз; моноцитарный лейкоз; лейкоз тучных клеток; мегакариобластный лейкоз; миелоидная саркома; волосатоклеточный лейкоз; хронический лимфолейкоз (CLL); острый лимфобластный лейкоз (ALL); острый миелолейкоз (AML); и хронический миелобластный лейкоз.

Конкретные варианты осуществления относятся к способам лечения лейкемии. Лейкоз - это рак крови или костного мозга, который характеризуется аномальной пролиферацией (производством путем размножения) клеток крови, обычно белых кровяных телец (лейкоцитов). Это часть обширной группы заболеваний, называемых гематологическими новообразованиями. Лейкоз - это широкий термин, охватывающий спектр заболеваний. Клинически и патологически лейкоз подразделяется на острую и хроническую формы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего раскрытия иммунные клетки доставляют нуждающемуся в этом индивидууму, например, индивидууму, больному раком или инфекционным заболеванием. Затем клетки усиливают иммунную систему индивидуума, чтобы атаковать соответствующие раковые или патогенные клетки. В некоторых случаях индивидууму вводят одну или несколько доз иммунных клеток. В случаях, когда человеку вводят две или более доз иммунных клеток, продолжительность между введениями должна быть достаточной, чтобы дать время для размножения у индивидуума, в конкретных вариантах осуществления продолжительность между дозами составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и более дней.

В некоторых вариантах осуществления настоящего раскрытия представлены

способы лечения или профилактики иммуноопосредованного расстройства. В одном варианте осуществления субъект страдает аутоиммунным заболеванием. Неограничивающие примеры аутоиммунных заболеваний включают: очаговую алопецию, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную болезнь Аддисона, аутоиммунные заболевания надпочечников, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный оофорит и орхит, аутоиммунную тромбоцитопению, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, глютенный дерматит, синдром хронической усталости и иммунной дисфункции (CFIDS), хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия, синдром Чарджа-Стросса, рубцовый пемфигоид, CREST-синдром, болезнь холодовых агглютининов, болезнь Крона, дискоидная волчанка, первичная криоглобулинемия смешанного типа, фибромиалгия-фибромиозит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, болезнь Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, идиопатический фиброз легких, идиопатическая тромбоцитопения пурпура (ITP), нейропатия IgA, ювенильный артрит, красный плоский лишай, эритематозная волчанка, болезнь Меньера, смешанное заболевание соединительной ткани, рассеянный склероз, иммуноопосредованный сахарный диабет или 1 типа, миастения, нефротический синдром (например, болезнь минимальных изменений, фокальный гломерулосклероз или мембранозная нефропатия), вульгарная пузырчатка, пернициозная анемия, узелковый полиартериит, полихондрит, полигландулярные синдромы, ревматическая полимиалгия, полимиозит и дерматомиозит, первичная агаммаглобулинемия, первичный билиарный цирроз, псориаз, псориатический артрит, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермия, синдром Шегрена, синдром тугоподвижности, системная красная волчанка, красная волчанка, язвенный колит, увеит, васкулит (например, нодозный полиартериит, болезнь Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит или герпетиформный васкулит), витилиго и гранулематоз Вегенера. Таким образом, некоторые примеры аутоиммунного заболевания, которое можно лечить с использованием раскрытых в данном документе способов, включают, но без ограничения, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, системную красную волчанку, сахарный диабет I типа, болезнь Крона; язвенный колит, миастению, гломерулонефрит, анкилозирующий спондилит, васкулит или псориаз. Субъект также может иметь аллергическое заболевание, такое как астма.

В еще одном варианте осуществления субъект является реципиентом трансплантированного органа или стволовых клеток, а иммунные клетки используют для предотвращения и/или лечения отторжения. В конкретных вариантах осуществления субъект имеет или находится в группе риска развития болезни «трансплантат против хозяина». GVHD представляет собой возможное осложнение любого трансплантата, который использует или содержит стволовые клетки от родственного или неродственного донора. Существует два вида GVHD: острая и хроническая. Острая GVHD появляется в течение первых трех месяцев после трансплантации. Признаки острой GVHD включают красноватую кожную сыпь на руках и ногах, которая может распространяться и

становиться более серьезной, с шелушением или образованием пузырей на коже. Острая GVHD может также повлиять на желудок и кишечник, и в этом случае присутствуют спазмы, тошнота и диарея. Пожелтение кожи и глаз (желтуха) указывает на то, что острая GVHD затронула печень. Хроническая GVHD классифицируется по степени тяжести: 1 стадия/степень - легкая; 4 стадия/степень - тяжелая. Хронический GVHD развивается через три месяца или позже после трансплантации. Симптомы хронической GVHD аналогичны симптомам острой GVHD, но, кроме того, хроническая GVHD может также влиять на слизистые железы глаз, слюнные железы во рту и железы, которые смазывают слизистую оболочку желудка и кишечник. Можно использовать любые популяции иммунных клеток, описанных в данном документе. Примеры трансплантированного органа включают трансплантат солидного органа, такого как почка, печень, кожа, поджелудочная железа, легкое и/или сердце, или клеточный трансплантат, такой как островки, гепатоциты, миобласты, костный мозг или гематопоэтические или другие стволовые клетки. Трансплантат может представлять собой составной трансплантат, например, ткани лица. Иммунные клетки можно вводить до трансплантации, одновременно с трансплантацией или после трансплантации. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки вводят до трансплантации, например, по меньшей мере за 1 час, по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере 1 день, по меньшей мере 2 дня, по меньшей мере 3 дня, по меньшей мере 4 дня, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 1 неделю, по меньшей мере 2 недели, по меньшей мере 3 недели, по меньшей мере 4 недели или по меньшей мере 1 месяц до трансплантации. В одном конкретном неограничивающем примере введение терапевтически эффективного количества иммунных клеток происходит за 3-5 дней до трансплантации.

В некоторых вариантах осуществления перед иммуноклеточной терапией субъекту можно проводить немиелоаблативную противолимфомную химиотерапию. Немиелоаблативная противолимфомная химиотерапия может быть любой подходящей такой терапией, которую можно проводить любым подходящим способом. Немиелоаблативная противолимфомная химиотерапия может включать, например, введение циклофосфида и флударабина, особенно, если рак представляет собой меланому, которая может быть метастатической. иллюстративным способом введения циклофосфида и флударабина является внутривенный. Таким же образом можно вводить любую подходящую дозу циклофосфида и флударабина. В конкретных аспектах приблизительно 60 мг/кг циклофосфида вводят в течение двух дней, после чего в течение пяти дней вводят приблизительно 25 мг/м² флударабина.

В некоторых вариантах осуществления фактор роста, который способствует росту и активации иммунных клеток, вводят субъекту либо одновременно с иммунными клетками, либо после иммунных клеток. Фактором роста иммунных клеток может быть любой подходящий фактор роста, который способствует росту и активации иммунных клеток. Примеры подходящих факторов роста иммунных клеток включают интерлейкин (IL)-2, IL-7, IL-15 и IL-12, которые можно использовать по отдельности или в различных

комбинациях, таких как П-2 и П-7, П-2 и П-15, П-7 и П-15, П-2, П-7 и П-15, П-12 и П-7, П-12 и П-15 или П-12 и П-2.

Терапевтически эффективные количества иммунных клеток можно вводить несколькими путями, включая парентеральное введение, например, внутривенную, внутривентрикулярную, внутримышечную, внутригрудную или внутрисуставную инъекцию или инфузию.

Терапевтически эффективным количеством иммунных клеток для использования в адоптивной клеточной терапии является такое количество, которое достигает нужного эффекта у подлежащего лечению субъекта. Например, это может быть количество иммунных клеток, необходимое для подавления развития или для регресса аутоиммунного или аллоиммунного заболевания, или которое способно облегчить симптомы, вызванные аутоиммунным заболеванием, такие как боль и воспаление. Это может быть количество, необходимое для облегчения симптомов, связанных с воспалением, таких как боль, отек и повышенная температура. Это также может быть количество, необходимое для уменьшения или предотвращения отторжения пересаженного органа.

Популяцию иммунных клеток можно вводить в схемах лечения, соответствующих этому заболеванию, например, одну или несколько доз в течение от одного до нескольких дней, чтобы улучшить болезненное состояние, или периодические дозы в течение длительного времени для подавления прогрессирования заболевания и предотвращения повторения заболевания. Точная доза, используемая в составе, также будет зависеть от пути введения и серьезности заболевания или расстройства, и ее следует определять в соответствии с мнением практикующего врача и обстоятельствами каждого пациента. Терапевтически эффективное количество иммунных клеток будет зависеть от субъекта, подвергаемого лечению, тяжести и типа заболевания, а также способа введения. В некоторых вариантах осуществления дозы, которые можно использовать для лечения людей, колеблются от по меньшей мере $3,8 \times 10^4$, по меньшей мере $3,8 \times 10^5$, по меньшей мере $3,8 \times 10^6$, по меньшей мере $3,8 \times 10^7$, по меньшей мере $3,8 \times 10^8$, по меньшей мере $3,8 \times 10^9$ или по меньшей мере $3,8 \times 10^{10}$ иммунных клеток/м². В определенном варианте осуществления доза, используемая для лечения субъектов-людей, колеблется от приблизительно $3,8 \times 10^9$ до приблизительно $3,8 \times 10^{10}$ иммунных клеток/м². В дополнительных вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективное количество иммунных клеток может изменяться от приблизительно 5×10^6 клеток на кг массы тела до приблизительно $7,5 \times 10^8$ клеток на кг массы тела, например, от приблизительно 2×10^7 клеток до приблизительно 5×10^8 клеток на кг массы тела, или от приблизительно 5×10^7 клеток до приблизительно 2×10^8 клеток на кг массы тела. Точное количество иммунных клеток специалистом в данной области легко определяется на основании возраста, веса, пола и физиологического состояния субъекта. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых доза-ответ, полученных из тест-систем *in vitro* или на моделях животных.

Иммунные клетки можно вводить в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами для лечения иммуноопосредованного нарушения.

Комбинированная терапия может включать, помимо прочего, одно или несколько antimicrobных средств (например, антибиотики, противовирусные средства и противогрибковые средства), противоопухолевые средства (например, фторурацил, метотрексат, паклитаксел, флударабин, этопозид, доксорубин или винкристин), истощающие иммунитет средства (например, флударабин, этопозид, доксорубин или винкристин), иммунодепрессанты (например, азатиоприн или глюкокортикоиды, такие как дексаметазон или преднизон), противовоспалительные средства (например, глюкокортикоиды, такие как гидрокортизон, дексаметазон или преднизон, или нестероидные противовоспалительные средства, такие как ацетилсалициловая кислота, ибупрофен или напроксен натрия), цитокины (например, интерлейкин-10 или трансформирующий фактор роста бета), гормоны (например, эстроген) или вакцину. Кроме того, иммуносупрессивные или толерогенные средства, включая, но без ограничения, ингибиторы кальциневрина (например, циклоспорин и такролимус); ингибиторы mTOR (например, рапамицин); микофенолятмофетил, антитела (например, распознающие CD3, CD4, CD40, CD154, CD45, IVIG или В-клетки); химиотерапевтические средства (например, метотрексат, треосульфан, бусульфан); облучение; или хемокины, интерлейкины или их ингибиторы (например, BAFF, IL-2, ингибиторы киназы против IL-2R, IL-4, JAK). Такие дополнительные фармацевтические средства можно вводить до, во время или после введения иммунных клеток в зависимости от нужного эффекта. Это введение клеток и средства можно осуществлять одним и тем же путем или разными путями и либо в одном месте, либо в другом месте.

В. Фармацевтические композиции

Также в данном документе представлены фармацевтические композиции и составы, содержащие иммунные клетки (например, Т-клетки или НК-клетки) и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтические композиции и составы, которые описаны в данном документе, можно получать путем смешивания активных ингредиентов (таких как антитело или полипептид), имеющих нужную степень чистоты, с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd edition, 2012), в виде лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают, но без ограничения: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (менее приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин,

аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG). Иллюстративные фармацевтически приемлемые носители в данном описании дополнительно включают средства диспергирования лекарственных средств в межклеточном пространстве, такие как растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20 человека, такие как gHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc). Некоторые иллюстративные sHASEGP и способы их использования, включая gHuPH20, описаны в публикациях патентов США №№ 2005/0260186 и 2006/0104968. В одном аспекте sHASEGP комбинируют с одной или несколькими дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

С. Комбинированная терапия

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно настоящим вариантам осуществления включают популяцию иммунных клеток в комбинации по меньшей мере с одной дополнительной терапией. Дополнительной терапией может быть лучевая терапия, хирургическое вмешательство (например, лампэктомия и мастэктомия), химиотерапия, генная терапия, ДНК-терапия, вирусная терапия, РНК-терапия, иммунотерапия, трансплантация костного мозга, нанотерапия, терапия моноклональными антителами или комбинация этих методов. Вышеизложенное. Дополнительная терапия может быть в форме адьювантной или неоадьювантной терапии.

В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой введение низкомолекулярного ферментативного ингибитора или антиметастатического средства. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой введение средств, ограничивающих побочные эффекты (например, средств, предназначенных для уменьшения возникновения и/или тяжести побочных эффектов лечения, таких как средства против тошноты и т.д.). В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой лучевую терапию. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой хирургическое вмешательство. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой комбинацию лучевой терапии и хирургического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой гамма-облучение. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой терапию, нацеленную на путь РВК/АКТ/mTOR, ингибитор HSP90, ингибитор тубулина, ингибитор апоптоза и/или химиопрофилактическое средство. Дополнительная терапия может представлять собой одно или несколько химиотерапевтических средств, известных в данной области.

Иммунноклеточную терапию можно проводить до, во время, после или в различных комбинациях относительно дополнительной терапии рака, такой как терапия иммунных

контрольных точек. Интервалы введения могут колебаться от одновременно до минут, дней и недель. В вариантах осуществления, где иммунную клеточную терапию предоставляют пациенту отдельно от дополнительного терапевтического средства, обычно можно гарантировать, что между временем каждой доставки не пройдет значительный период времени, чтобы два соединения все еще были способны оказывать благоприятное комбинированное воздействие на пациента. В таких случаях предполагается, что можно обеспечить пациенту терапию антителами и противораковую терапию в пределах приблизительно от 12 до 24 или 72 часов друг от друга и, более конкретно, в пределах приблизительно 6-12 часов друг от друга. В некоторых ситуациях может быть желательно значительно продлить период лечения с перерывом между соответствующими введениями от нескольких дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Можно использовать различные комбинации. Например, ниже приведен пример иммуноклеточной терапии - «А» и противораковой терапии - «В»:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

Введение пациенту любого соединения или терапии в соответствии с настоящими вариантами осуществления будет следовать общим протоколам введения таких соединений, принимая во внимание токсичность средств, если таковая имеется. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления существует этап мониторинга токсичности, которая связана с комбинированной терапией.

1. Химиотерапия

В соответствии с настоящими вариантами осуществления можно использовать широкий спектр химиотерапевтических средств. Термин «химиотерапия» относится к применению лекарств для лечения рака. «Химиотерапевтическое средство» используют для обозначения соединения или композиции, которые вводят для лечения рака. Эти средства или лекарственные средства классифицируют по их режиму активности в клетке, например, влияют ли они на клеточный цикл и на какой стадии. Альтернативно, средство можно охарактеризовать на основе его способности напрямую сшивать ДНК, интеркалировать в ДНК или вызывать хромосомные и митотические аберрации, влияя на синтез нуклеиновых кислот.

Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбохон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамины, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (особенно криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и

СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрхлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид и урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как эндииновые антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин γ и калихеамицин ω); динемидин, включая динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также хромофор неокарзиностатина и родственные хромофоры хромопротеиновых эндиинового антибиотиков, аклациномизины, актиномицин, аутрамидин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицин, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаларницин, оливомицины, пепломицин, портфирамицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностаин и зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, птероптерин и триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн и тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан и тестостерон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как митотан и трилостан; восполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоклевулиновая кислота; этилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как маитанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK полисахаридный комплекс; разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; таксоиды, например, паклитаксел и доцетаксел гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; координационные комплексы платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселола; ибандронат; иринотекан (например, СРТ-11); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин;

карбоплатин, прокарбазин, пликомицин, гемцитабин, навельбин, ингибиторы фарнезил-протеинтрансферазы, трансплатин и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных.

2. Лучевая терапия

Другие факторы, которые вызывают повреждение ДНК и широко используются, включают так называемые гамма-лучи, рентгеновские лучи и/или направленную доставку радиоизотопов в опухолевые клетки. Также предусмотрены другие формы повреждающих факторов ДНК, такие как микроволны, облучение протонным пучком (патенты США 5760395 и 4870287) и УФ-облучение. Наиболее вероятно, что все эти факторы влияют на широкий спектр повреждений ДНК, предшественников ДНК, репликации и восстановления ДНК, также сборку и сохранение хромосом. Диапазоны доз рентгеновских лучей находятся в диапазоне от суточных доз 50-200 рентген в течение продолжительных периодов времени (3-4 недели) до разовых доз 2000-6000 рентген. Диапазоны дозировки радиоизотопов широко варьируются и зависят от периода полураспада изотопа, интенсивности и типа испускаемого излучения, а также от поглощения неопластическими клетками.

3. Иммунотерапия

Специалисту будет понятно, что дополнительную иммунотерапию можно использовать в комбинации или в сочетании со способами согласно вариантам осуществления. В контексте лечения рака иммунотерапия, как правило, основана на использовании иммунных эффекторных клеток и молекул для нацеливания и разрушения раковых клеток. Ритуксимаб (RITUXAN®) является таким примером. Иммунный эффектор может представлять собой, например, антитело, специфичное к какому-то маркеру на поверхности опухолевой клетки. Само по себе антитело может служить эффектором терапии или может привлекать другие клетки для фактического уничтожения клеток. Антитело также может быть конъюгировано с лекарственным средством или токсином (химиотерапевтическим средством, радионуклидом, цепью рицина А, токсином холеры, токсином коклюша и т.д.) и служить в качестве нацеливающего средства. Альтернативно, эффектором может быть лимфоцит, несущий поверхностную молекулу, которая напрямую или косвенно взаимодействует с опухолевой клеткой-мишенью. Различные эффекторные клетки включают цитотоксические Т-клетки и NK-клетки.

конъюгаты антитело-лекарственное средство выступают в качестве прорывного подхода к разработке терапии рака. Рак - одна из основных причин смерти в мире. Конъюгаты антитело-лекарство (ADC) содержат моноклональные антитела (MAb), которые ковалентно связаны с лекарствами, убивающими клетки. Этот подход сочетает в себе высокую специфичность MAb против их антигенных мишеней с высокоэффективными цитотоксическими лекарствами, в результате чего получают «вооруженные» MAb, которые доставляют полезную нагрузку (лекарство) в опухолевые клетки с повышенными уровнями антигена. Нацеленная доставка препарата также сводит к минимуму его воздействие на нормальные ткани, что приводит к снижению токсичности и улучшению терапевтического индекса. Одобрение FDA двух препаратов ADC, ADCETRIS® (брентуксимаб ведотин) в

2011 году и KADCYLA® (трастузумаб эмтанзин или T-DM1) в 2013 году, подтвердило правильность этого подхода. В настоящее время более 30 кандидатов в лекарственные препараты ADC проходят различные стадии клинических испытаний для лечения рака (Leal et al., 2014). По мере того, как конструирование антител и оптимизация линкерной полезной нагрузки становятся все более зрелыми, открытие и разработка новых ADC все больше зависит от идентификации и проверки новых мишеней, которые подходят для этого подхода, и от поколения нацеливающих MAб. Два критерия для мишеней ADC - это повышенная регуляция/высокие уровни экспрессии в опухолевых клетках и надежная интернализация.

В одном аспекте иммунотерапии опухолевая клетка должна нести некоторый маркер, который поддается нацеливанию, то есть отсутствует на большинстве других клеток. Существует множество опухолевых маркеров, и любой из них может подходить для нацеливания в контексте настоящих вариантов осуществления. Общие опухолевые маркеры включают CD20, карциноэмбриональный антиген, тирозиназу (p97), gp68, TAG-72, HMFG, сиалиновый антиген Льюиса, MucA, MucB, PLAP, рецептор ламинина, erb B и p155. Альтернативный аспект иммунотерапии - сочетание противоопухолевых эффектов с иммуностимулирующими эффектами. Также существуют иммуностимулирующие молекулы, включая цитокины, такие как IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, гамма-IFN, хемокины, такие как MIP-1, MCP-1, IL-8 и факторы роста, такие как лиганд FLT3.

Примерами иммунотерапевтических средств, которые в настоящее время исследуют или используют, являются иммунные адъюванты, например, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, динитрохлорбензол и ароматические соединения (патенты США 5801005 и 5739169; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides et al., 1998); цитокиновая терапия, например, интерфероны α , β и γ , IL-1, GM-CSF и TNF (Bukowski et al. 1998; Davidson et al. 1998; Hellstrand et al. 1998); генная терапия, например, TNF, IL-1, IL-2 и p53 (Qin et al., 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; патенты США 5830880 и 5846945); и моноклональные антитела, например, антитела против CD20, антитела против ганглиозида GM2 и антитела против p185 (Hollan der, 2012; Hanibuchi et al., 1998; патент США 5824311). Предполагается, что с терапией антителами, описанной в данном документе, можно использовать одну или несколько противораковых терапий.

В некоторых вариантах осуществления иммунотерапией может быть ингибирование иммунных контрольных точек. Иммунные контрольные точки либо включают сигнал (например, костимулирующие молекулы), либо выключают сигнал. Ингибирующие иммунные контрольные точки, на которые может быть нацелена блокада иммунных контрольных точек, включают аденозиновый рецептор A2A (A2AR), B7-H3 (также известный как CD276), аттенуатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA), цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4 (CTLA-4), также известный как CD152), индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), иммуноглобулин клеток-киллеров (KIR), ген активации лимфоцитов-3 (LAG3), белок запрограммированной смерти 1 (PD-1), домен Т-клеточного иммуноглобулина и муциновый домен 3 (TIM-3) и V-домен Ig-супрессор активации Т-

клеток (VISTA). В частности, ингибиторы иммунных контрольных точек нацелены на ось PD-1 и/или CTLA-4.

Ингибиторами иммунных контрольных точек могут быть лекарства, такие как небольшие молекулы, рекомбинантные формы лиганда или рецепторов, или, в частности, антитела, такие как человеческие антитела (например, международная патентная публикация WO2015016718; Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12 (4): 252-64, 2012; оба включены в настоящий документ посредством ссылки). Можно использовать известные ингибиторы белков иммунных контрольных точек или их аналоги, в частности можно использовать химеризованные, гуманизированные или человеческие формы антител. Как известно специалисту, для определенных антител, упомянутых в настоящем раскрытии, можно использовать альтернативные и/или эквивалентные названия. Такие альтернативные и/или эквивалентные названия взаимозаменяемы в контексте настоящего раскрытия. Например, известно, что ламбролизумаб также известен под альтернативными и эквивалентными названиями МК-3475 и пембролизумаб.

В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PD-1 с его партнерами по связыванию лиганда. В конкретном аспекте партнерами по связыванию лиганда PD-1 являются PDL1 и/или PDL2. В другом варианте осуществления антагонист связывания PDL1 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PDL1 с его партнерами по связыванию. В конкретном аспекте партнерами по связыванию PDL1 являются PD-1 и/или B7-1. В другом варианте осуществления антагонист связывания PDL2 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PDL2 с его партнерами по связыванию. В конкретном аспекте партнером связывания PDL2 является PD-1. Антагонист может представлять собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, иммуноадгезин, белок слияния или олигопептид. Иллюстративные антитела описаны в патентах США № US8735553, US8354509 и US8008449, все они включены в настоящий документ посредством ссылки. Другие антагонисты оси PD-1 для использования в способах, представленных в настоящем изобретении, известны в данной области, например, описаны в заявках на патент США № US 20140294898, US 2014022021 и US20110008369, все они включены в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой антитело против PD-1 (например, человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело). В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 выбирают из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба и CT-011. В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой иммуноадгезин (например, иммуноадгезин, содержащий внеклеточную или связывающую PD-1 часть PDL1 или PDL2, слитую с константной областью (например, областью Fc последовательности иммуноглобулина). В некоторых вариантах осуществления антагонистом связывания PD1 является Atp-224. Ниволумаб, также известный как MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558 и OPDIVO®, представляет собой антитело

против PD-1, описанное в WO2006/121168. Пембролизумаб, также известный как MK-3475, Merck 3475, ламбролизумаб, KEYTRUDA® и SCH-900475, представляет собой антитело против PD-1, описанное в WO2009/114335. CT-011, также известный как hBAT или hBAT-1 представляет собой антитело против PD-1, описанное в WO2009/101611. AMP-224, также известный как B7-DCIg, представляет собой растворимый рецептор слияния PDL2-Fc, описанный в WO2010/027827 и WO2011/066342.

Другой иммунной контрольной точкой, на которую могут быть нацелены способы, представленные в настоящем изобретении, является цитотоксический белок 4, ассоциированный с Т-лимфоцитами (CTLA-4), также известный как CD152. Полная последовательность кДНК человеческого CTLA-4 имеет регистрационный номер Genbank L15006. CTLA-4 находится на поверхности Т-клеток и действует как «выключатель» при связывании с CD80 или CD86 на поверхности антигенпрезентирующих клеток. CTLA4 является членом суперсемейства иммуноглобулинов, который экспрессируется на поверхности клеток Т-хелперов и передает ингибирующий сигнал Т-клеткам. CTLA4 подобен костимулирующему белку Т-клеток, CD28, и обе молекулы связываются с CD80 и CD86, также называемыми В7-1 и В7-2, соответственно, на антигенпрезентирующих клетках. CTLA4 передает ингибирующий сигнал Т-клеткам, тогда как CD28 передает стимулирующий сигнал. Внутриклеточный CTLA4 также находится в регуляторных Т-клетках и может иметь важное значение для их функции. Активация Т-клеток через рецептор Т-клеток и CD28 приводит к повышенной экспрессии CTLA-4, рецептора, ингибирующего молекулы В7.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой антитело против CTLA-4 (например, человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело), его антигенсвязывающий фрагмент, иммуноадгезин, белок слияния или олигопептид.

Антитела против CTLA-4 человека (или полученные из них домены VH и/или VL), подходящие для использования в настоящих способах, можно получать с использованием способов, хорошо известных в данной области. В качестве альтернативы можно использовать признанные в данной области антитела против CTLA-4. Например, в раскрытых в данном документе способах можно использовать антитела против CTLA-4, раскрытые в US 8119129, WO 01/14424, WO 98/42752; WO 00/37504 (CP675206, также известные как тремелидумаб; ранее тицилидумаб), патенте США № 6207156; Hurwitz et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(17): 10067-10071; Camacho et al. (2004) J Clin Oncology 22(145): реферат № 2505 (антитело CP-675206); и Mokyr et al. (1998) Cancer Res 58: 5301-5304. Принципы каждой из вышеупомянутых публикаций включены в настоящее описание посредством ссылки. Также можно использовать антитела, которые конкурируют с любыми из этих признанных в данной области антител за связывание с CTLA-4. Например, гуманизированное антитело CTLA-4 описано в международной патентной заявке № WO2001014424, WO2000037504 и патенте США № 8017114; все включены в настоящий документ посредством ссылки.

Примером антитела против CTLA-4 является ипилимумаб (также известный как 10D1, MDX-010, MDX-101 и Yervoy®) или их антигенсвязывающие фрагменты и их варианты (см., например, WO 01/14424). В других вариантах осуществления антитело содержит CDR или VR тяжелой и легкой цепей ипилимумаба. Соответственно, в одном варианте осуществления антитело содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 области VH ипилимумаба и домены CDR1, CDR2 и CDR3 области VL ипилимумаба. В другом варианте осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на CTLA-4, что и вышеупомянутые антитела. В другом варианте осуществления антитело имеет по меньшей мере приблизительно 90% идентичность аминокислотной последовательности вариабельной области с вышеупомянутыми антителами (например, по меньшей мере приблизительно 90%, 95% или 99% идентичность вариабельной области с ипилимумабом).

Другие молекулы для модуляции CTLA-4 включают лиганды и рецепторы CTLA-4, такие как описаны в патентах США №№ US5844905, US5885796 и международных патентных заявках №№ WO1995001994 и WO1998042752; все включены в настоящий документ посредством ссылки, и иммуноадгезины, такие как описаны в патенте США № US8329867, включенном в настоящий документ посредством ссылки.

4. Хирургия

Приблизительно 60% людей с раком будут подвергаться хирургическому вмешательству того или иного типа, которое включает профилактическую, диагностическую или стадийную, лечебную и паллиативную хирургию. Лечебная хирургия включает резекцию, при которой физически удаляют, иссекают и/или разрушают всю или часть раковой ткани, и ее можно использовать в сочетании с другими методами лечения, такими как лечение согласно настоящим вариантам осуществления, химиотерапия, лучевая терапия, гормональная терапия, генная терапия, иммунотерапия и/или альтернативные методы лечения. Резекция опухоли означает физическое удаление по меньшей мере части опухоли. Помимо резекции опухоли, хирургическое лечение включает лазерную хирургию, криохирургию, электрохирургию и хирургию под микроскопом (хирургию Мооса).

После удаления части или всех раковых клеток, ткани или опухоли в организме может образоваться полость. Лечение можно осуществлять с помощью перфузии, прямой инъекции или местного применения в области дополнительной противораковой терапии. Такое лечение можно повторять, например, каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, или каждые 1, 2, 3, 4 и 5 недель или каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. Эти методы лечения также могут иметь различные дозировки.

5. Другие средства

Предполагается, что для улучшения терапевтической эффективности лечения в комбинации с некоторыми аспектами настоящих вариантов осуществления можно использовать другие средства. Эти дополнительные средства включают средства, которые влияют на повышающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности и GAP-соединений, цитостатические средства и средства дифференцировки, ингибиторы

клеточной адгезии, средства, которые повышают чувствительность гиперпролиферативных клеток к индукторам апоптоза, или другие биологические средства. Повышение межклеточной передачи сигналов за счет увеличения числа GAP-соединений может увеличивать антигиперпролиферативные эффекты в соседней популяции гиперпролиферативных клеток. В других вариантах осуществления для улучшения антигиперпролиферативной эффективности лечения в комбинации с некоторыми аспектами настоящих вариантов осуществления можно использовать цитостатические средства или средства дифференцировки. Предполагается, что ингибиторы клеточной адгезии улучшат эффективность настоящих вариантов осуществления. Примерами ингибиторов клеточной адгезии являются ингибиторы киназы очаговой адгезии (ФАК) и ловастатин. Кроме того, предполагается, что для повышения эффективности лечения в сочетании с некоторыми аспектами настоящих вариантов осуществления можно использовать другие средства, которые увеличивают чувствительность гиперпролиферативной клетки к апоптозу, такие как антитела c225.

III. Готовые изделия или наборы

В настоящем изобретении также представлено готовое изделие или набор, содержащий иммунные клетки. Готовое изделие или набор может дополнительно содержать листок-вкладыш, содержащий инструкции для применения иммунных клеток для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума или для улучшения иммунной функции у индивидуума, имеющего рак. В готовое изделие или наборы могут быть включены любые из антигенспецифических иммунных клеток, описанных в данном документе. Подходящие контейнеры содержат, например, бутылки, флаконы, пакеты и шприцы. Контейнер может быть изготовлен из различных материалов, таких как стекло, пластик (например, поливинилхлорид или полиолефин) или металлический сплав (например, нержавеющая сталь или хастеллой). В некоторых вариантах осуществления контейнер содержит состав, а этикетка на контейнере или связанная с ним может указывать направления использования. Изделие или набор могут дополнительно содержать другие материалы, необходимые с коммерческой и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковки с инструкциями по применению. В некоторых вариантах осуществления изделие дополнительно содержит одно или несколько других средств (например, химиотерапевтическое средство и противоопухолевое средство). Подходящие контейнеры для одного или нескольких средств содержат, например, бутылки, флаконы, пакеты и шприцы.

V. Примеры

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Специалистам в данной области должно быть понятно, что методы, раскрытые в примерах, которые следуют ниже, представляют методы, обнаруженные изобретателем, чтобы хорошо функционировать при практическом применении изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как составляющие

предпочтительные режимы для их применения. Однако в свете настоящего раскрытия специалисты в данной области должны принять во внимание, что в конкретные раскрытые варианты осуществления можно внести множество изменений и все же получить похожий или аналогичный результат без отклонения от сущности и объема изобретения.

Пример 1 - CAR-NK-клетки с нокаутом CISH

NK-клетки выделяли с помощью отрицательной селекции из 3 различных единиц пуповинной крови (CB) и размножали. Затем NK-клетки трансдуцировали конструкцией CAR и выполняли КО CISH для каждой CB в разные моменты времени. Для каждой единицы CB получали четыре разные группы клеток, включая NT, NT КО CISH, CAR19/IL-15 и CAR19/IL-15 КО CISH.

В частности, в 1 день NK выделяли с помощью отрицательной селекции, совместно культивировали с облученными APC (K562, экспрессирующими 41BB и IL-21 на своей поверхности) в соотношении 1:2 (NK:APC) в SCGM с IL-2 200 ед/мл. Среду заменяли каждые 2 дня свежей SCGM и IL-2, 200 ед/мл.

На 5 день NK-клетки повторно отбирали для получения чистых NK-клеток и выполняли CAR трансдукцию. В это время присутствовали как нетрансдуцированные клетки (NT), так и CAR-NK-клетки. Эффективность CAR трансдукции измеряли через 3 дня после трансдукции.

На 7 день добавили облученные APC для повторного размножения NK-клеток (как NT, так и CAR-NK). NK-клетки культивировали в SCGM с IL-2 200 ед/мл. Среду заменяли каждые 2 свежей SCGM и IL-2 200 ед/мл.

На 14 день CRISPR Cas9 использовали для КО CISH в CAR-NK-клетках с использованием электропорации Neop. Сконструировали две sgRNA, нацеленные на экзон 4 гена CISH. Приблизительно за 15-30 минут до электропорации белок cas9 и sgRNA инкубировали при комнатной температуре в соотношении 1:1 с 10 мкг cas9 и 10 мкг sgRNA (5000 нг sgRNA #1 и 5000 нг sgRNA #2). Продукт инкубации (то есть sgRNA и Cas9, связанные вместе) подвергали электропорации в 1-2 миллиона клеток с помощью наконечника для электропорации объемом 100 мкл. Условия электропорации: 1600 В, 10 мс, 3 импульса с использованием T-буфера. различные клеточные препараты (электропорированные CAR-NK-клетки, контрольные CAR-NK-клетки и NT NK-клетки) культивировали совместно с облученными APC в соотношении 1:2 (NK:APC) в SCGM с IL-2, 20 ед/мл. Среду заменяли каждые 2 дня свежей SCGM и IL-2, 200 ед/мл. На 15 день проводили ПЦР с целью проверки эффективности КО.

В конце на 21 день выполняли функциональные исследования. Клетки из 4 групп совместно культивировали в 96-луночной планшете с BFA и Raji в соотношении 2:1 в течение 6 часов. Затем проводили окрашивание для сравнения выработки цитокинов (IFN γ , TNF α и CD107 α), которые оценивали с помощью проточной цитометрии. Анализ высвобождения хрома проводили на 21 день для сравнения цитотоксичности 4 различных групп клеток для каждой CB. Статистический анализ проводился с использованием двустороннего анализа Anova с множественными сравнениями с использованием теста

Бонферрони.

Редактирование генов NK-клеток является более сложной задачей, чем редактирование T-клеток. В отличие от T-клеток NK-клетки нуждаются в питающих клетках для хорошего роста *in vitro*, что усложняет процесс редактирования генов. NK-клетки также более хрупкие, и исторически было известно, что после генетических манипуляций у них наблюдается слабая жизнеспособность. Текущая жизнеспособность после трансдукции CAR и KO CISH была более 95%.

Пример 2 - Характеристика NK-клеток *in vivo*

Для получения характеристики CAR-NK-клеток с KO CISH *in vivo* изучали самок мышей 10-недельного возраста с нулевым NSG. Мышам вводили 20×10^3 клеток Raji-FFLuc. Для эффекторных клеток инъецировали Cell#1-Cell#3, 3×10^6 или 10^7 клеток/животное в зависимости от групп, указанных ниже.

Категории групп: 5 мышей/группу, всего 7 групп и 35 мышей,

- Группа #1: Только Raji-FFLuc
- Группа #2: Raji-FFLuc+клетки #1 3×10^6 клеток/животное.
- Группа #3: Raji-FFLuc+клетки #1 10^7 клеток/животное
- Группа #4: Raji-FFLuc+клетки #2 3×10^6 клеток/животное
- Группа #5: Raji-FFLuc+клетки #2 10^7 клеток/животное.
- Клетка #1: NKCAR19 cas9+электропорации
- Клетка #3: NKCAR19 KO CISH

Мышам вводили клетки Raji отдельно или в комбинации с CAR-NK-клетками. CAR-NK-клетки были дикого типа, только cas9 или имели нокаут CISH. Было обнаружено, что мыши, которые получили нокаутные по CISH CAR-NK-клетки, имели повышенную выживаемость, не имели признаков лимфомы Raji и не имели CRS. Нокаутные по CISH NK-клетки также дольше сохранялись *in vivo*, и их можно было обнаружить до 7 недель после инфузии.

Пример 3 - Удаление контрольной точки CIS модулирует приспособленность полученных из пуповинной крови трансдуцированных CAR клеток-естественных киллеров

Повышенная функциональность *in vitro* в CIS-дефицитных NK-клетках iC9/CAR19/IL-15: уровни экспрессии CIS оценивали, чтобы определить, подчиняются ли СВ-NK-клетки iC9/CAR 19/IL-15 тем же контррегуляторным схемам, которые физиологически отрицательно регулируют цитокиновые сигналы в немодифицированных NK-клетках. СВ-NK-клетки культивировали с линией питающих клеток K562, сконструированной для экспрессии мембраносвязанного IL21, лиганда 4-1BB и CD48 (uAPC) в присутствии IL-2 в течение 21 дня. NK-клетки либо трансдуцировали на 4 день ретровирусным вектором, экспрессирующим iC9/CAR19/IL-15, как описано в материалах и методах, либо не трансдуцировали (NT, контроль). Экспрессия CIS значительно повышалась во время размножения *in vitro* контрольных NT и iC9/CAR19/IL-15 СВ-NK-клеток с течением времени (фиг. 7A). Примечательно, что уровни экспрессии CIS были

более заметны в iC9/CAR19/IL-15 по сравнению с NT СВ-NK-клетками, вероятно, из-за дополнительного влияния IL-15 на индукцию CIS (фиг. 7А).

Затем функциональные последствия делеции CISH исследовали на СВ-NK-клетках iC9/CAR19/IL-15. Поскольку CIS является мощной иммунной контрольной точкой в NK-клетках, было высказано предположение, что нокаут гена CISH может усилить их эффекторную функцию аналогично блокаде PD-1 в Т-клетках. Чтобы проверить эту идею, сперва разработали протокол комбинированной ретровирусной трансдукции конструкции iC9/CAR19/IL15 и опосредованного рибонуклеопротеином cas9 (cas9 RNP) редактирования гена для выключения CISH. На 7 день трансдуцированные CAR NK-клетки подвергали нуклеофекции с помощью только cas9 (cas9 имитация) или cas9, предварительно нагруженной дуплексом crRNA:tracrRNA, нацеленным на экзон 4 CISH (KO CISH) (фиг. 7А-В.). эффективность трансдукции iC9/CAR19/IL-15 и жизнеспособность клеток на 7 день были более 90% и оставалась стабильной с течением времени (фиг. 13). Эффективность KO CISH была более 80% как в NT, так и в экспрессирующих CAR NK-клетках по оценке с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (фиг. 7А) и анализа вестерн-блоттинга (фиг. 7В). Эти результаты были также подтверждены секвенированием по Сэнгеру (фиг. 7С).

Чтобы определить влияние KO CISH на противоопухолевую активность NK-клеток, ответ NT клеток и СВ-NK-клеток iC9/CAR19/IL-15 тестировали через семь дней после электропорации Cas9, соединенной с нецелевой гРНК (CTRL) или с cas9, соединенной с гРНК, нацеленной на ген CISH (KO CISH) против клеток-мишеней лимфомы Raji. CAR-NK-клетки KO CISH продуцировали значительно большее количество IFN- γ и TNF- α ; что показывает повышенная дегрануляция (CD107a), и оказывали большую цитотоксичность против Raji по сравнению с их соответствующим контролем NT или iC9/CAR19/IL-15 (фиг. 8А-8С). Примечательно, что среди всех групп СВ-NK-клетки KO CISH iC9/CAR19/IL-15 имели наивысшую выработку цитокинов и цитотоксичность против мишеней Raji, подтверждая идею о том, что сочетание трансдукции CAR с подавлением CISH приводит к усилению функции NK-клеток (фиг. 8А-8С).

Затем эффект KO CISH исследовали по образованию иммунологического синапса (IS) между NT или iC9/CAR19/IL-15 NK-клетками и клетками Raji. Поляризация центра организации микротрубочек (MTOC) увеличивалась за счет KO CISH, что отражалось сокращением расстояния MTOC до IS по сравнению с контролем (фиг. 8Е). Взятые вместе, эти результаты предполагают, что KO CISH усиливает иммунологический синапс между NK-клетками (NT и iC9/CAR19/IL-15) и опухолевыми клетками, что коррелирует с повышенной эффекторной функцией и цитотоксичностью.

Фенотипический и молекулярный портрет NK-клеток KO CISH, NT и трансдуцированных iC9/CAR19/IL-15: для понимания механизма, с помощью которого KO CISH в NK-клетках увеличивает их действие против опухолевых клеток, использовали времяпролетную цитометрию (CyToF) и панель из 32 антител против ингибирующих и активирующих рецепторов, а также маркеры дифференциации, хоуминга и активации, чтобы получить представление об их фенотипическом составе. KO CISH в NK-клетках

iC9/CAR19/IL-15 индуцировал функциональный фенотип со значительно более высокой экспрессией маркеров цитотоксичности, включая гранзим-b, перфорин, TRAIL, CD3z, факторы транскрипции и адапторные молекулы, такие как Eomes, T-bet, DAP12 и корцепторы активации /маркеры пролиферации, такие как DNAM, CD25 и Ki67, по сравнению с их контрольными аналогами (фиг. 9A). Точно так же делеция *CISH* в NT NK-клетках приводила к усилению регуляции нескольких маркеров активации по сравнению с контрольными NT NK-клетками (фиг. 14A). для дальнейшего анализа этих активированных маркеров NK-клеток после KO *CISH* использовали *viSNE*, алгоритм нелинейного снижения размерности и визуализации многомерных переменных (tSNE), и обнаружили значительную сегрегацию между контрольными и NK-клетками KO *CISH* iC9/CAR19/IL-15 с преимущественно активированным фенотипом (повышенная экспрессия CD25, Ki67, CD3z, перфорина и гранзима-b), доминирующим над NK-клетками KO *CISH* iC9/CAR19/IL-15 (фиг. 9B).

Затем было выполнено секвенирование РНК для более глубокого понимания транскриптомного профиля NK-клеток после KO *CISH*. Примечательно, что результаты выявили разный профиль экспрессии генов у KO *CISH* и контрольных NK-клеток iC9/CAR19/IL-15 (фиг. 9C). KO *CISH* в NT NK-клетках приводил к повышенной регуляции ограниченного числа генов, связанных со стимулируемыми интерфероном генами (ISG) и STAT-1, включая OSA-1, OSA-2 (фиг. 14A-14C). Напротив, KO *CISH* в NK-клетках iC9/CAR19/IL-15 приводил к повышенной регуляции множества генов, связанных с активацией JAK/STAT и путем MAPK/ERK (фиг. 9).

Чтобы получить более полное представление о механистической основе повышенной функции и цитотоксичности, индуцированной KO *CISH* в NK-клетках iC9/CAR19/IL-15, был использован анализ представленности групп генов (GSEA) для идентификации групп генов или биологических путей, которые могут вносить вклад в фенотип. Анализ показал увеличение представленности передачи сигналов TNF- α , IFN- γ , IL-2/STAT5 и IL-6/STAT3, а также генов, связанных с воспалительным ответом (фиг. 9F.). Находки были подтверждены на уровне белка путем демонстрации усиленного фосфорилирования STAT5, STAT3 и фосфолипазы C гамма 1 (PLCg1) в СВ-NK-клетках KO *CISH* iC9/CAR19/IL-15 (фиг. 9G, H). Взятые вместе, эти данные показывают, что IL-15 управляет активацией *CISH*, и что KO *CISH* в NK-клетках iC9/CAR19/IL-15 индуцирует молекулярный портрет, совместимый с активированным фенотипом.

KO *CISH* перепрограммирует метаболизм NK-клеток iC9/CAR19/IL-15: Как показано на фиг. 10A, данные последовательности РНК и результаты GSEA также показали новое наблюдение, что KO *CISH* приводит к увеличению представленности генов mTORC1, гипоксии и гликолиза. Активность mTORC1 является существенной для гликолитического перепрограммирования активированных NK-клеток и представляется необходимым условием для эффекторных функций NK-клеток. Таким образом, пытаются определить, модулирует ли удаление *CISH* метаболическую активность NK-клеток iC9/CAR19/IL-15. Было высказано предположение, что KO *CISH* усиливает цитотоксическую активность NK-

клеток iC9/CAR19/IL-15, модулируя их метаболизм и увеличивая потребление кислорода и глюкозы. Чтобы проверить эту гипотезу, была проведена серия анализов Seahorse для измерения энергетических путей в NK-клетках, которые показали, что в ответ на лимфому Raji NK-клетки KO CISH iC9/CAR19/IL-15 имели больший гликолитический резерв при измерении по более высокой скорости внеклеточного закисления (ECAR) по сравнению с контрольными NK-клетками Cas9 iC9/CAR19/IL-15. Эти функциональные данные были дополнительно подтверждены анализом ingenuity pathway (IPA), показывающим повышенную регуляцию ферментов гликолиза. Кроме того, NK-клетки KO CISH iC9/CAR19/IL-15 показали более высокое потребление глюкозы по сравнению с их контролями Cas9, что продемонстрировано колориметрическим тестом на глюкозу, выполненным на супернатанте CAR-NK-клеток, совместно культивированных с опухолевыми клетками Raji в течение 3 часов. Это подтверждает, что KO CISH увеличивал метаболическую активность CAR-NK-клеток за счет повышения их способности потреблять глюкозу и использовать ее для гликолиза. Кроме того, NK-клетки KO CISH iC9/CAR19/IL-15 продемонстрировали повышенную норму потребления кислорода (OCR) с помощью анализа Seahorse по сравнению с контрольными NK-клетками iC9/CAR19/IL-15. Это указывает на то, что KO CISH также усиливает метаболизм CAR-NK-клеток, повышая их митохондриальную активность. Действительно, в серии специализированных исследований конфокальной микроскопии было обнаружено, что количество митохондрий и соотношение митохондриального/ядерного объема значительно выше в клетках KO CISH iC9/CAR19/IL-15 по сравнению с контрольными Cas9 (фиг. 10).

На основании этих данных было высказано предположение, что при увеличении активации JAK/STAT, KO CISH приводит к увеличению активности mTORC1 и усилению активности HIF1a, что привело к увеличению гликолитической способности и пригодности NK-клеток. Действительно, было обнаружено, что после совместного культивирования с клетками Raji в течение 2 часов фосфорилирование рибосомного белка S6 (S6), последующей мишени активации пути mTOR1, было значительно выше в KO CISH iC9/CAR19/IL-15 по сравнению с контролем Cas9.

Сочетание нарушения контрольной точки CIS и конструирования iC9/CAR19/IL-15 улучшает подавление опухоли и выживаемость в мышинной модели лимфомы Raji: Используя мышиную модель NSG агрессивной лимфомы Raji (Фиг.11А), исследовали, может ли адоптивный перенос СВ-NK-клеток KO CISH усилить подавление опухоли *in vivo*. Сначала мыши получали одну внутривенную инфузию (10×10^6 /мышь) контрольных NT СВ-NK-клеток, которые либо подвергали электропорации с помощью Cas9 (Cas9 CTRL), либо имели KO CISH (5 мышей на группу). Рост опухоли контролировали с использованием изменений в биолюминесцентной визуализации опухоли (BLI) с течением времени. Опухолевая нагрузка увеличивалась с течением времени без существенной разницы в выживаемости между группами (фиг. 11В-С), что позволяет предположить, что в отсутствие трансдукции CAR KO CISH не усиливает активность NK-клеток против опухоли Raji. Затем исследовали действие *in vivo* KO CISH

на противоопухолевую активность NK-клеток iC9/CAR19/IL-15. Поскольку клетки КО CISH iC9/CAR19/IL-15 являются более мощным средством уничтожения опухолевых клеток-мишеней, даже при низких соотношениях E:T, была выдвинута гипотеза о том, что они также будут более эффективными для подавления опухоли при более низких инфузионных дозах. Действительно, инфузия всего 3×10^6 NK-клеток CISH КО iC9/CAR19/IL-15 значительно улучшила выживаемость и подавление лимфомы Raji по сравнению с СВ-NK-клетками CTRL iC9/CAR19/IL-15, но в конечном итоге мыши погибали от опухоли через 46 дней (фиг. 11E-G). При инфузии более высокой дозы 10×10^6 CAR-NK-клеток группа, которая получала клетки КО CISH, не показала никаких признаков опухоли, вызванной B1 (фиг. 11) или патологии, и показала впечатляюще длительную выживаемость до 341 дня. По сравнению с СВ-NK-клетками CTRL iC9/CAR19/IL-15 (фиг. 11E-H, 16). Это было связано с улучшенным сохранением NK-клеток у мышей, получавших КО CISH iC9/CAR19/IL-15, по сравнению с животными, которые получали СВ-NK-клетки CTRL iC9/CAR19/IL-15 (фиг. 11d). Следует отметить, что КО CISH не был связан с признаками повышенной токсичности у мышей, такими как потеря веса (фиг. 11I). В совокупности эти данные указывают на то, что подавление CISH улучшало способность СВ-NK-клеток iC9/CAR19/IL-15 вызывать *in vivo* подавление опухоли без увеличения токсичности.

Клинический перенос готовых NK-клеток КО CISH iC9/CAR19/IL-15 для рецидивирующего/рефрактерного В-клеточного злокачественного новообразования: даже несмотря на то, что повышенная токсичность *in vivo* не наблюдалась у мышей, которым вводили CAR-NK-клетки КО CISH, усиление передачи сигналов IL-15 может потенциально привести к увеличению высвобождения воспалительных цитокинов. Таким образом, индуцируемые каспазы 9 (iC9) использовали в качестве суицидального гена в конструкции, чтобы подтвердить, что можно вызывать апоптоз трансдуцированных CAR NK-клеток КО CISH в присутствии микромолекулярного димеризатора AP1903. Добавление всего 10 нМ AP1903 в культуры NK-клеток iC9/CAR.19/IL-15 индуцировало апоптоз трансдуцированных NK-клеток в течение 4 часов, а КО CISH не влиял на действие димеризатора (фиг. 17A). Суицидальный ген также был эффективен для элиминации клеток CAR *in vivo* как в клетках КО CISH, так и в контрольных СВ-NK-клетках iC9/CAR.19/IL-15 (фиг. 16B). Мыши с привитыми опухолями Raji получали либо контрольные, либо СВ-NK-клетки КО CISH iC9/CAR.19/IL-15 с последующим лечением димеризатором на 7 день и 9 день после инфузии NK (n=5 мышей на группу). Затем животных умерщвляли на 12 день. Введение низкомолекулярного димеризатора привело к резкому снижению СВ-NK-клеток iC9/CAR.19/IL-15 (как контрольных, так и КО CISH) в крови и тканях (печени, селезенке и костном мозге) получавших лечение мышей (фиг. 17B-C).

Идентификация нецелевых вставок/делеций (INDEL) CRISPR управляемой РНК нуклеазы (RGN) имеет решающее значение до того, как этот подход можно будет применить в клинике. Таким образом, были использованы технологии GuideSeq и Rhampseq для оценки нецелевого действия специфичных CISH гидовых РНК, используемых в

экспериментах. Эксперименты GuideSeq с использованием клеток HEK293, которые конститутивно экспрессируют нуклеазу Cas9, выявили множественные потенциальных нецелевых сайтов для обеих sgRNA, нацеленных на локус CISH, и еще более высокие частоты нецелевых событий были отмечены для sgRNA2 (фиг. 12A-B).

Таким образом, это первое сообщение о стратегии генной инженерии, сочетающей трансдукцию CAR и блокаду контрольных точек в NK-клетках пуповинной крови. Этот продукт для клеточной терапии NK готов к реализации, безопасен и эффективен в устранении опухолевых клеток CD19+ даже в низких дозах.

Пример 4 - Материал и методы

Клеточные линии и культуральная среда: Raji (линия клеток лимфомы Беркитта) была приобретена в Американской коллекции типовых культур (Manassa, VA, USA). Питающие клетки на основе K562 трансдуцировали с помощью ретровируса для совместной экспрессии 4-1BBL, CD48 и мембраносвязанных IL-21 (9uAPC). Трансдуцированные люциферазой светлячка клетки Raji (Raji-FFLUC), используемые для экспериментов *in vivo*, были любезно предоставлены доктором Джанпьетро Дотти (Университет Северной Каролины).

Все клеточные линии культивировали в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 1% пенициллин-стрептомицина и 1% L-глутамина. NK-клетки культивировали в среде для роста стволовых клеток (SCGM) с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 1% пенициллин-стрептомицина и 1% L-глутамина.

Размножение NK-клеток пуповинной крови: единицы СВ для исследований были предоставлены из банка СВ онкологического центра Андерсона. СВ выделяли методом градиента плотности (Ficoll-Histopaque; Sigma, St Louis, MO, USA). CD56+ NK-клетки, очищенные с помощью набора для выделения NK (Miltenyi Biotec, Inc. San Diego, CA, USA), стимулировали с помощью облученных (100 Гр) uAPC (соотношение питающих клеток: NK 2:1) и рекомбинантного человеческого IL-2 (пролейкин, 200 ед/мл; Chiron, Emeryville, CA, USA) в полной среде для роста стволовых клеток (CellGenix GmbH, Freiburg, Germany) на 0 день. Активированные NK-клетки трансдуцировали ретровирусными супернатантами на 4 день в планшетах, покрытых человеческим фибронектином (Clontech Laboratories, Inc. Mountain View, CA, USA). На 7 и 14 день NK-клетки снова стимулировали облученными uAPC и IL-2. На 21 день собирали трансдуцированные CAR NK-клетки для использования.

Ретровирусная трансфекция и трансдукция: ретровирусные векторы, кодирующие iC9.CAR19.CD28-zeta-2A-IL-15, были описаны ранее (Vera et al., 2006). Временные ретровирусные супернатанты получали, как описано ранее (Vera et al., 2006). Активированные NK-клетки трансдуцировали ретровирусными супернатантами на 4 день в планшетах, покрытых человеческим фибронектином (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA). Через три дня (на 7 день) эффективность трансдукции CAR измеряли с помощью проточной цитометрии, и NK-клетки снова стимулировали облученными uAPC и IL-2.

Редактирование гена CRISPR/Cas9 CISH: КО CISH проводили на 7 день с использованием рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса как в NT, так и в трансдуцированных CAR NK-клетках. Протоспейсерные последовательности для гена CISH идентифицировали с использованием CRISPRscan (Moreno-Mateos et al., 2015). ДНК-матрицы для гРНК сделали с использованием протокола, описанного Li et al. использовали две гРНК, нацеленные на экзон 4 гена CISH: гРНК1: AGGCCACATAGTGCTGCACA (SEQ ID NO: 1), гРНК2: TGTACAGCAGTGGCTGGTGG (SEQ ID NO: 2). Белок Cas9 (PNA bio) и гРНК инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин в соотношении 1:1 с 10 мкг Cas9 и 10 мкг гРНК (5000 нг sgRNA#1 и 5000 нг sgRNA#2). затем продукт инкубации (связанные вместе гРНК и Cas9) использовали для электропорации 1-2 миллионов NT или трансдуцированных CAR NK-клеток с использованием системы трансфекции Neon (Thermo Fisher Scientific). Оптимизированными условиями электропорации были 1600 В, 10мс, 3 импульса, использование Т-буфера. затем разные клеточные препараты совместно культивировали с облученными uAPC в соотношении 1:2 (NK:uAPC) в среде SCGM с IL-2 200 ед/мл.

Количественная ПЦР в реальном времени (RT Q-PCR): Общую РНК выделяли с использованием набора RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), и синтез кДНК проводили с помощью смеси для синтеза кДНК ReadyScript (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA) в соответствии с инструкциями производителя. реакции ПЦР проводили в 20 мкл; 10 мкл TaqMan 2X Advanced Fast PCR MasterMix (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA), 1 мкл CISH TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems), 2 мкл кДНК и 7 мкл не содержащей нуклеазы воды. Были описаны последовательности праймеров и условия ПЦР (Kolesnik et al., 2013). Q-PCR в реальном времени выполняли на системе ABI 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems). Уровни мРНК количественно определяли в зависимости от стандартных кривых, полученных с помощью последовательных разведений олигонуклеотида, соответствующего каждому амплифицированному фрагменту ПЦР и с использованием программного обеспечения 7500 Fast v2.3 (Applied Biosystems). Относительную экспрессию определяли путем нормализации количества каждого представляющего интерес гена к гену домашнего хозяйства 18S.

Вестерн-блоттинг: NK-клетки предварительно обрабатывали 10 мкМ MG132 в течение 4 ч, чтобы заблокировать протеосомное разложение. Затем NK-клетки лизировали в буфере для лизиса (IP Lysis Buffer, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL) с добавлением ингибиторов протеаз (Complete Mini, EDTA-free Cocktail tablets, Roche Holding, Basel, Switzerland) и инкубировали в течение 30 минут на льду. Концентрации белка определяли с помощью анализа BCA (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL). Использовали следующие первичные антитела: антитела против CIS (клон D4D9) и антитела против В-актина (клон 8H10D10), оба антитела были получены от Cell Signaling Technology.

Измерение частот модификации аллелей с использованием ПЦР и секвенирования по Сенгеру: ДНК экстрагировали и очищали (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen Inc., Hilden, Germany) из трансдуцированных CAR и размноженных ex vivo NT

НК-клеток (контрольных и в состоянии КО CISH). Праймеры ПЦР, использованные для амплификации локуса-мишени, были следующими:

Прямой праймер экзона 4: CGTCTGGACTCCAAGTCTT (SEQ ID NO: 7)

Обратный праймер экзона 4: GTACAAAGGGCTGCACCAGT (SEQ ID NO: 8)

Очищенные продукты ПЦР отправляли на секвенирование по Сэнгеру в головной центр MD Anderson с использованием обоих праймеров ПЦР, и анализировали хроматограмму каждой последовательности.

Функциональный анализ: на 14 или 21 день культивирования контрольные размноженные *ex vivo* NT (контроль или КО CISH) и НК-клетки CAR19/II-15 (контроль или КО CISH) в количестве 100×10^3 клеток/лунку совместно культивировали в присутствии брефельдина А в течение 6 часов в круглодонных 96-луночных планшетах с клетками Raji или мишенями K562 (положительный контроль) в соотношении эффектор:клетки-мишени (Е:Т) 2:1. Для измерения дегрануляции антитело CD107a (антитело Brilliant Violet 785™ против человеческого CD107a (LAMP-1), Biolegend, San Diego, CA, USA) добавляли в лунки в начале совместного культивирования. Дегрануляцию, измеренную с помощью CD107a и внутриклеточной выработки цитокинов (TNF α (моноклональное антитело против TNF альфа (MAb11), Alexa Fluor 700, eBioscience Inc., San Diego, CA, USA) и IFN- γ (BD Horizon™ V450 мышиноантитело против человеческого IFN- γ , BD Biosciences, San Jose, CA, USA), оценивали с помощью проточной цитометрии, как описано ранее (Rouse et al., 2016)

Анализ высвобождения хрома: для оценки цитотоксичности размноженные *ex vivo* NT НК-клетки (контроль и КО CISH) и трансдуцированные CAR (контроль и КО CISH) совместно культивировали с мечеными ^{51}Cr мишенями Raji в нескольких соотношениях Е:Т; цитотоксичность измеряли по высвобождению ^{51}Cr , как описано ранее (Rouse et al., 2016).

Конфокальная микроскопия для изучения иммунологического синапса: $0,5 \times 10^6$ эффекторных клеток, как описано выше, конъюгировали с $0,25 \times 10^6$ клеток Raji в 250 мл SCGM с добавлением 10% инактивированной нагреванием среды, содержащей FBS, в течение 40 минут при 37°C и окрашивали, как показано в другом месте (Banarjee et al., 2010). Вкратце, после инкубации клетки прикрепляли к предметному стеклу, покрытому поли-А-лизинном (Electron Microscopy Sciences), и окрашивали на представляющие интерес белки. Для обнаружения CAR использовали конъюгированные с Alexa Fluor 647 аффинно очищенные фрагменты F(ab')₂ козьего антитела против человеческого IgG (H+L). Использовали анти-CD19 Alexa Fluor (AF) 488 (клон H1B19, BD BioSciences), фаллоидин AF 568 (Invitrogen) для обнаружения F-актина и анти-перфорин 488 (клон δ G9; BioLegend). Конъюгаты помещали в среду, содержащую средство, препятствующее выгоранию флуоресценции (Prolong gold, Invitrogen), и получали изображения путем последовательного сканирования с помощью конфокального микроскопа Yokogawa с вращающимся диском, оснащенного камерой Zyla 4.2sCMOS и под объективом 63x. Изображения экспортировали в Imaris (Bitplane) для количественных измерений.

Расстояние от центроида перфорина до синапса измеряется, как описано ранее.

Массовая цитометрия

Конъюгация антител: панель, состоящую из 38 меченных металлами антител, использовали для углубленной характеристики НК-клеток. Перечень антител с изотопами соответствующей метки металла. Все немеченные антитела были приобретены в форме неконъюгированного носителя и конъюгированы на месте с соответствующей меткой металла с использованием полимера Maxrap X8 в соответствии с инструкциями производителя (Fluidigm). Все изотопы металлов были приобретены у Fluidigm, за исключением хлорида индия (III) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Концентрацию антител определяли путем измерения количества белка A280 с использованием Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). затем конъюгированные антитела разводили в стабилизирующем антитела растворе на основе PBS или буфере LowCross (Candor Bioscience GmbH, Wangen, Germany) с добавлением 0,05% азида натрия (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) до конечной концентрации 0,5 мг/мл. Были проведены эксперименты с серийным титрованием для определения концентрации с оптимальным соотношением сигнал/шум для каждого антитела.

Получение и сбор образцов: NT НК-клетки (контроль или КО CISH) и трансдуцированные CAR НК-клетки (контроль или КО CISH) собирали, дважды промывали буфером для окрашивания клеток (0,5% бычий сывороточный альбумин/PBS) и инкубировали с 5 мкл блокирующего раствора человеческого Fc-рецептора (Trustain FcX, Biolegend, San Diego, CA) в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем клетки окрашивали свежеприготовленной смесью антител против маркеров клеточной поверхности в течение 30 минут при комнатной температуре на шейкере (100 об/мин). В течение последних 3 минут инкубации клетки инкубировали с 2,5 мкМ цисплатина (Sigma Aldrich, St Louis, MO), дважды промывали буфером для окрашивания клеток и фиксировали/пермеабелизировали с использованием раствора BD Cytotix/Cytoperm в течение 30 минут в темноте при 4°C. Клетки дважды промывали перманентным/промывным буфером, окрашивали антителами, направленными против внутриклеточных маркеров, и после дополнительной стадии промывки хранили в течение ночи в 500 мкл 1,6% параформальдегида (EMD Biosciences)/PBS с 125 нМ иридиевого интеркалятора нуклеиновой кислоты (Fluidigm). На следующий день образцы дважды промывали буфером для окрашивания клеток, ресуспендировали в 1 мл MilliQ dH₂O, фильтровали через нейлоновую сетку 35 мкм (пробирки с сетчатым колпачком для клеток, BD, San Jose, CA) и подсчитывали. Перед анализом образцы суспендировали в MilliQ dH₂O с добавлением четырехэлементных калибровочных шариков EQTM в концентрации $0,5 \times 10^5$ /мл. Образцы собирали со скоростью 300 событий в секунду на приборе Helios (Fluidigm) с использованием программного обеспечения для сбора данных Helios 6.5.358 (Fluidigm).

Анализ данных: данные масс-цитометрии нормировали на основе сдвига во времени четырехэлементного сигнала EQTM с использованием программного обеспечения

для нормирования Fluidigm 2. Первоначальный контроль качества данных проводили с использованием Flowjo версии 10.2. Гейтировали калибровочные шарики, и выбирали синглеты на основе окрашивания иридием 193 и продолжительности события. Мертвые клетки исключали по каналу Pt195, и проводили дальнейшее гейтирование для выбора CD45+ клеток, а затем интересующей популяции NK-клеток (CD3-CD56+). из всех образцов пропорционально отобрали в общей сложности 320000 клеток для выполнения автоматизированной кластеризации. Данные анализировали с использованием автоматизированного уменьшения размеров, в том числе (viSNE) в сочетании с FlowSOM для кластеризации с целью глубокого фенотипирования иммунных клеток, как опубликовано ранее (Van Gassen et al., 2015).

Секвенирование РНК: РНК экстрагировали и очищали (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen) из трансдуцированных CAR и размноженных ex vivo NT-NK-клеток (контрольных и в состоянии KO CISH) и отправляли для секвенирования РНК в Novogen, где проводили контроль качества, создание библиотеки и секвенирование. Анализ данных RNAseq проводили в отделе биоинформатики MD Anderson. Показания секвенирования выравнивали с эталонным геномом человека (hg38) с использованием TOPHAT2 v2.0.13 (Kim et al., 2013). Уровни экспрессии гена измеряли путем подсчета картированных считываний с использованием HTSEQ на основе генной модели hg38 GENCODE v25. Дифференциально экспрессируемые гены идентифицировали с использованием пакета EdgeR, с отсечкой FDR (уровень ложноположительных результатов) $<0,01$ и кратным изменением > 2 (Robinson et al., 2010).

Визуализация митохондрий и лизосом

Мечение NK-клеток: NK-клетки инкубировали при 37°C в течение 40 минут в растворе 1:1 (об./об.) буфера для окрашивания живых клеток (abcam) и RPMI (Corning), содержащего конечные концентрации 500 нМ MitoTracker™ Deep Red FM (Invitrogen™), 250 нМ LysoRed (abcam) и 1 мкМ Hoechst 33342 (Sigma) для мечения митохондрий, лизосомы и ядра, соответственно. Затем клетки промывали сбалансированным солевым раствором Хэнкса (Cellgro) + 10% HEPES (Corning) сначала и полной культуральной средой RPMI+10% FBS (R10) для второй промывки.

Конфокальная микроскопия: 50000 NK-клеток загружали в отдельные лунки 96 планшета со стеклянным дном. Для визуализации использовали инвертированный микроскоп Nikon A1/TiE, оснащенный объективом 100x, 1,45 NA. Трехмерные изображения (z-стеки, с шагом 0,3 мкм, ~ 40 срезов) получали из разных полей обзора с использованием каналов DAPI (404,0 нм), TXRed (561,8 нм) и Cy5 (641,0 нм).

Анализ конфокальных изображений: Z-стеки 16-битных изображений извлекали для каждого канала и обрабатывали в ImageJ (National Institutes of Health (NIH), США) с использованием серии плагинов. Сначала изображения сегментировали для каждого канала до применения порогового значения. Затем к изображению применяли плагин 3D Objects Counter, чтобы определить интересующие области митохондрий и лизосом (ROI). Эти ROI накладывали на исходное изображение, после чего проводили измерения. Точно так же

плагин 3D Objects Counter также использовали в ядре, но с использованием только исходного изображения. Наконец, с использованием плагина TrackMate1 проводили отслеживание движения отдельных клеток, чтобы отфильтровать нестабильные клетки при их движении. Все измерения консолидировали в R, где митохондрии, лизосомы и ядра сопоставляли с соответствующими клетками.

Ксеногенные модели лимфомы: для оценки противоопухолевого эффекта трансдуцированных CAR CB-NK-клеток *in vivo* использовали модель ксенотрансплантата NOD/SCID IL-2R γ null (NSG) с агрессивной устойчивой к NK клеточной линией Raji. Эксперименты на мышах проводили в соответствии с рекомендациями NIH по протоколам, утвержденным Комитетом по уходу за животными и их использованию. Мышей NSG (возраст 10-12 недель; Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) в 1 день облучали 300 сГр и внутривенно вводили меченные люциферазой светлячка клетки Raji (2×10^4) в 0 день. Где указано, свежее размноженные NT (контрольные или KO CISH) или трансдуцированные CAR CB-NK (контрольные или KO CISH) клетки вводили через хвостовую вену в 0 день. Мышей подвергали еженедельной биолуминесцентной визуализации (система Xenogen-IVIS 200 Imaging; Caliper, Waltham, MA, USA). Проводили количественное измерение сигнала в фотонах/секундах путем определения скорости потока фотонов в пределах интересующих стандартизированных областей с использованием программного обеспечения Living Image (Caliper). Миграцию, устойчивость и размножение NK-клеток измеряли с помощью проточной цитометрии.

Активация суицидального гена *in vitro* и проверка *in vivo*: низкомолекулярный димеризатор AP1903 (10 нМ) добавляли к культурам клеток CB-NK в течение 4 часов. Элиминацию трансдуцированных клеток оценивали по окрашиванию аннексином-V/живых мертвых клеток. Эффективность суицидального гена также тестировали *in vivo* путем лечения мышей с опухолями, которые внутрибрюшинно получили NK-клетки iC9/CAR.19/IL-15+ (контрольные или KO CISH) с двумя дозами AP1903 (50 мкг каждая) с перерывом в 2 дня на 7 и 9 дни. Две другие группы мышей (контрольные и KO CISH) служили в качестве контроля без применения AP1903. Всех мышей умерщвляли на 12 день, собирали кровь и органы (печень, селезенку и костный мозг), обрабатывали и проводили проточную цитометрию для определения фракции CAR-NK и жизнеспособности.

Нецелевая Идентификация: Метод GUIDE-seq использовали для объективного обнаружения событий нецелевого редактирования (Tsai et al. 2015). В этом исследовании источником Cas9 были клетки HEK293, которые конститутивно экспрессируют нуклеазу Sruogenes Cas9 (клетки «HEK293-Cas9»). Комплексы гРНК Alt-R® были образованы путем объединения Alt-R tracrRNA и Alt-R crRNA XT в молярном соотношении 1:1. Комплексы гРНК доставляли посредством нуклеофекции с использованием Amaxa™ Nucleofector™ 96-луночной системы Shuttle™ (Lonza, Basel, Switzerland). Для каждой нуклеофекции $3,5 \times 10^5$ клеток HEK293-Cas9 промывали 1X PBS, ресуспендировали в 20 мкл раствора SF (Lonza) и объединяли с 10 мкМ гРНК вместе с 0,5 мкМ донорского фрагмента dsDNA GUIDE-seq. Эту смесь переносили в одну лунку планшета Nucleocuvette™ (Lonza) и подвергали

электропорации с использованием протокола 96-DS-150. ДНК экстрагировали через 72 часа после электропорации с использованием набора для очистки геномной ДНК GeneJET (Thermo Fisher Scientific). Подготовку библиотеки NGS, секвенирование и работу программного обеспечения GU IDE-seq проводили, как описано ранее, за исключением использования выравнивания Нидлмана-Вунша (Tsai et al., 2016).

Обогащение мишени с помощью rhAmpSeq для мультиплексной ПЦР: для лучшей количественной оценки редактирования на нецелевых сайтах, обнаруженных с помощью GUIDE-seq, мультиплексную ПЦР, связанную с NGS ампликонов, проводили с использованием rhPCR (ПЦР, выполняемой в присутствии RNaseH2) (Dobosy et al., 2011) с заблокированными-расщепляемыми праймерами. Праймеры были сконструированы с помощью алгоритма (IDT) для перекрестного сравнения и отбора праймеров на основании совместимости с другими праймерами в мультиплексе. Эта технология амплификации требует надлежащей гибридизации праймера с сайтом-мишенью перед амплификацией. Несоответствие между мишенью и праймером предотвращает разблокировку, тем самым повышая специфичность и устраняя димеры праймеров. Этот подход обеспечивает эффективное получение высоко мультиплексных ампликонов ПЦР в одной пробирке. Для этих экспериментов комплексы гРНК доставляли в клетки HEK293-Cas9, как описано ранее, или в комплекс с Alt-R HiFi Cas9 нуклеазой v3 с образованием активного рибонуклеопротеинового комплекса (RNP), который затем напрямую подвергали нуклеофекции в клетки HEK293 в концентрации 2 мкМ вместе с 2 мкМ усилителя электропорации Alt-R Cas9 (IDT). ДНК экстрагировали через 48 часов после электропорации с использованием раствора для экстракции ДНК QuickExtract (Epicentre). Специфическую к локусу амплификацию с rh-праймерами выполняли в течение 10 циклов с последующей очисткой шариками 1,5x SPRI. Раунд индексации ПЦР выполняли в течение 18 циклов для включения уникальных для образца индексов P5 и P7 с последующей очисткой шариками 1x SPRI и количественной оценкой библиотеки с помощью qPCR (IDT). ампликоны ПЦР секвенировали на приборе Illumina MiSeq (v2 chemistry, считывание парных концов 150 пар оснований) (Illumina, San Diego, CA, USA). Данные анализировали с использованием специально созданного конвейера. Данные распаковывали (инструменты Picard v2.9); прямое и обратное считывания объединяли в расширенные ампликоны (flash v1.2.11) (Magoc et al., 2011); считывания сопоставляли с геномным эталоном GRCh38 (bwa mem v0.7.15) и присваивали мишеням в мультиплексном пуле праймеров (метки bedtools v2.25) (Quinlan et al., 2010). Считывания с любым базовым показателем качества <10 отфильтровывали. Для каждой мишени редактирование рассчитывали, как процент от общего числа считываний, содержащих вставку/делецию, в пределах окна вырезанного участка размером 10 п.о.

Статистика: для сравнения количественных различий (среднее \pm стандартное отклонение) между группами использовали двухфакторный дисперсионный анализ; P-значения были двусторонними, и P < 0,05 считалось значимым. Для всех экспериментов по биолюминесценции сигналы интенсивности суммировали как средние значения \pm

стандартное отклонение на исходном уровне и в нескольких последующих временных точках для каждой группы мышей (Shah et al., 2013). Вероятность выживания рассчитывали по методу Каплана-Мейера. Указанные статистические тесты проводили с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad версии 7,0с). Для анализа конфокальной микроскопии наборы данных анализировали с использованием непарного критерия Стьюдента. Представленные данные означают доверительный интервал \pm 95%. Изображения получали с помощью ImageJ.

* * *

Все способы, раскрытые и заявленные в данном документе, в свете настоящего раскрытия могут быть реализованы и выполнены без излишнего экспериментирования. Хотя композиции и способы согласно настоящему изобретению были описаны в терминах предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области будет очевидно, что могут быть проведены изменения способов и этапов или последовательности этапов способа, описанного в данном документе, без отклонения от концепции, сущности и объема изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что определенные средства, которые являются как химически, так и физиологически родственными, могут быть заменены средствами, описанными в данном документе, при этом могут быть достигнуты такие же или аналогичные результаты. Все такие аналогичные замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области, считаются находящимися в пределах сущности, объема и концепции изобретения, которые определены в прилагаемой формуле изобретения.

Ссылки

Следующие ссылки специально включены в настоящее описание посредством ссылки, в той степени, в которой они предоставляют примерные процедурные или другие подробности, дополняющие изложенные в данном документе.

Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.

Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994.

Banerjee et al., *J Immunol Methods* 355(1-2): 1-13, 2010.

Bennekov et al., *Mt. Sinai J. Med.* 71 (2): 86-93, 2004.

Bukowski et al., *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.

Camacho et al. *J Clin Oncology* 22(145): Abstract № 2505 (antibody CP-675206), 2004.

Campbell, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 298: 23-57, 2006.

Chothia et al., *EMBO J.* 7:3745, 1988.

Christodoulides et al., *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.

Cohen et al. *J Immunol.* 175:5799-5808, 2005.

Daher et al., *Curr Opin Immunol* 51: 146-53, 2018.

Davidson et al., *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.

Davila et al. *PLoS ONE* 8(4): e61338, 2013.

Dobosy et al., *BMC Biotechnol* 11: 80, 2011.

- Doulatov et al., *Cell Stem Cell*. 10:120-36, 2012.
- European patent application number EP2537416
- Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215), 2013.
- Frolet et al., *BMC Microbiol*. 10:190 (2010).
- Gaj et al., *Trends in Biotechnology* 31(7), 397-405, 2013.
- Gay et al., *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 17(8): 471-8, 2017.
- Hanibuchi et al., *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.
- Hartmann et al., *EMBO Mol Med* 9(9): 1183-97, 2017.
- Heemskerk et al. *Hum Gene Ther*. 19:496-510, 2008.
- Hellstrand et al., *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.
- Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.
- Hubert et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 14523-28, 1999.
- Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.
- Hurwitz et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071, 1998.
- Международная заявка на получение патента № WO 00/37504
- Международная заявка на получение патента № WO 01/14424
- Международная заявка на получение патента № WO 2007/069666
- Международная заявка на получение патента № WO 2007/069666
- Международная заявка на получение патента № WO 98/42752
- Международная заявка на получение патента № WO/2014055668
- Международная заявка на получение патента № WO1995001994
- Международная заявка на получение патента № WO1998042752
- Международная заявка на получение патента № WO2000037504
- Международная заявка на получение патента № WO200014257
- Международная заявка на получение патента № WO2001014424
- Международная заявка на получение патента № WO2006/121168
- Международная заявка на получение патента № WO2007/103009
- Международная заявка на получение патента № WO2009/101611
- Международная заявка на получение патента № WO2009/114335
- Международная заявка на получение патента № WO2010/027827
- Международная заявка на получение патента № WO2011/066342
- Международная заявка на получение патента № WO2012/129514
- Международная заявка на получение патента № WO2013/071154
- Международная заявка на получение патента № WO2013/123061
- Международная заявка на получение патента № WO2013/166321
- Международная заявка на получение патента № WO2013126726
- Международная заявка на получение патента № WO2014/055668
- Международная заявка на получение патента № WO2014031687
- Международная заявка на получение патента № WO2015016718
- Международная заявка на получение патента № WO99/40188

- Janeway et al, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 433, 1997.
- Johnson et al. Blood 114:535-46, 2009.
- Jores et al., PNAS U.S.A. 87:9138, 1990.
- Kim et al., Genome biology 14(4): R36, 2013.
- Kim et al., Nature Biotechnology 31, 251-258, 2013.
- Kirchmaier and Sugden, J. Virol., 72(6):4657-4666, 1998.
- Kolesnik et al., Methods Mol Biol 967: 235-48, 2013.
- Leal, M., Ann N Y Acad Sci 1321, 41-54, 2014.
- Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003.
- Li et al. Nat Biotechnol. 23:349-354, 2005.
- Li et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279, 1992.
- Linnemann, C. et al. Nat Med 21, 81-85, 2015.
- Lockey et al., Front. Biosci. 13:5916-27, 2008.
- Loewendorf et al., J. Intern. Med. 267(5):483-501, 2010.
- Ludwig et al. Nature Biotech., (2):185-187, 2006a.
- Ludwig et al. Nature Methods, 3(8):637-646, 2006b.
- Magoc Bioinformatics 27(21): 2957-63, 2011.
- Marschall et al., Future Microbiol. 4:731-42, 2009.
- Mehta et al., Front Immunol 9: 283, 2018.
- Mokyr et al. Cancer Res 58:5301-5304, 1998.
- Moreno-Mateos et al., Nat Methods 12(10): 982-8, 2015.
- Notta et al., Science, 218-221, 2011.
- Pardoll, Nat Rev Cancer, 12(4): 252-64, 2012
- Parkhurst et al. Clin Cancer Res. 15: 169-180, 2009.
- Qin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(24):14411-14416, 1998.
- Quinlan et al., Bioinformatics 26(6): 841-2, 2010.
- Rieder et al., J. Interferon Cytokine Res. (9):499-509, 2009.
- Robinson et al., Bioinformatics 26(1): 139-40, 2010.
- Rouce et al., Leukemia 30(4): 800-11, 2016.
- Rykman, et al., J. Virol. 80(2):710-22, 2006.
- Sadelain et al., Cancer Discov. 3(4): 388-398, 2013.
- Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001.
- Shah et al., PLoS One 8(10): e76781, 2013.
- Singh et al., Cancer Research, 68:2961-2971, 2008.
- Singh et al., Cancer Research, 71:3516-3527, 2011.
- Takahashi et al., Cell, 126(4):663-76, 2007.
- Terakura et al. Blood. 1:72- 82, 2012.
- Tsai et al., Nat Biotechnol 33(2): 187-97, 2015.

Tsai et al., *Nat Biotechnol* 34(5): 483, 2016.

Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 24(5): 633-39, 2012.

Патент США № 4870287

Патент США № 5739169

Патент США № 5760395

Патент США № 5801005

Патент США № 5824311

Патент США № 5830880

Патент США № 5844905

Патент США № 5846945

Патент США № 5885796

Патент США № 5994136

Патент США № 6013516

Патент США № 6103470

Патент США № 6207156

Патент США № 6225042

Патент США № 6355479

Патент США № 6362001

Патент США № 6410319

Патент США № 6416998

Патент США № 6544518

Патент США № 6790662

Патент США № 7109304

Патент США № 7442548

Патент США № 7446190

Патент США № 7598364

Патент США № 7989425

Патент США № 8008449

Патент США № 8017114

Патент США № 8058065

Патент США № 8071369

Патент США № 8119129

Патент США № 8129187

Патент США № 8183038

Патент США № 8268620

Патент США № 8329867

Патент США № 8354509

Патент США № 8546140

Патент США № 8691574

Патент США № 8735553

Патент США № 8741648
Патент США № 8900871
Патент США № 9175268
Публикация патента США № 2010/0210014
Публикация патента США № 12/478,154
Публикация патента США № 2002131960
Публикация патента США № 2003/0211603
Публикация патента США № 2005/0260186
Публикация патента США № 2006/0104968
Публикация патента США № 2009/0004142
Публикация патента США № 2009/0017000
Публикация патента США № 2009/0246875
Публикация патента США № 2011/0104125
Публикация патента США № 2011/0301073
Публикация патента США № 20110008369
Публикация патента США № 2012/0276636
Публикация патента США № 2013/0315884
Публикация патента США № 20130149337
Публикация патента США № 2013287748
Публикация патента США № 2014/0120622
Публикация патента США № 2014022021
Публикация патента США № 20140294898
Van Gassen et al., *Cytometry* 87(7): 636-45, 2015.
Varela-Rohena et al. *Nat Med.* 14: 1390-1395, 2008.
Vera et al., *Blood* 108(12): 3890-7, 2006.
Wang et al. *J Immunother.* 35(9):689-701, 2012.
Wu et al., *Adv. Cancer Res.*, 90: 127-56, 2003.
Wu et al., *Cancer*, 18(2): 160-75, 2012.
Yamanaka et al., *Cell*, 131(5):861-72, 2007.
Yu et al., *Science*, 318:1917-1920, 2007.
Zysk et al., *Infect. Immun.* 68(6):3740-43, 2000.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная клетка-естественный киллер (NK), сконструированная для экспрессии (1) химерного антигенного рецептора (CAR) и/или Т-клеточного рецептора (TCR) и (2) человеческого IL-15 (hIL-15) и по существу не экспрессирующая CISH.
2. NK-клетка по п.1, причем NK-клетка сконструирована для экспрессии CAR.
3. NK-клетка по п.1, причем NK-клетка сконструирована для экспрессии TCR.
4. NK-клетка по п.1, причем NK-клетка сконструирована для экспрессии CAR и TCR.
5. NK-клетка по п.1, причем NK-клетка получена из клеток пуповинной крови, периферической крови, костного мозга, CD34⁺ или iPSC.
6. NK-клетка по п.1, причем NK-клетка получена из пуповинной крови.
7. NK-клетка по п.6, причем пуповинная кровь была ранее заморожена.
8. NK-клетка по п.1, причем CAR и/или TCR обладают антигенной специфичностью в отношении CD19, CD319/CS1, ROR1, CD20, CD5, CD7, CD22, CD70, CD30, BCMA, CD25, лигандов NKG2D, MICA/MICB, карциноэмбрионального антигена, альфафетопротеина, CA-125, MUC-1, эпителиального опухолевого антигена, ассоциированного с меланомой антигена, мутировавшего p53, мутировавшего ras, HER2/Neu, ERBB2, связывающего фолат белка, гликопротеина gp120 оболочки ВИЧ-1, гликопротеина gp41 оболочки ВИЧ-1, GD2, CD123, CD33, CD30, CD56, c-Met, мезотелина, GD3, HERV-K, IL-11Ralpha, цепи каппа, цепи лямбда, CSPG4, ERBB2, WT-1, EGFRvIII, TRAIL/DR4 и/или VEGFR2.
9. NK-клетка по п.1, причем CAR обладает антигенной специфичностью в отношении CD19.
10. Способ по п.1, в котором NK-клетка дополнительно экспрессирует второй цитокин.
11. Способ по п.10, в котором цитокином является IL-21 или IL-12.
12. Способ по любому из пп. 1-11, в котором NK-клетка активирует передачу сигналов мишени рапамицина у млекопитающих (mTOR).
13. Способ по п.12, в котором NK-клетка усиливает передачу сигналов JAK/STAT.
14. Способ получения NK-клеток по любому из пп. 1-14, включающий:
 - (a) получение исходной популяции NK-клеток;
 - (b) культивирование исходной популяции NK-клеток в присутствии искусственных представляющих клеток (APC);
 - (c) введение вектора экспрессии CAR и/или TCR в NK-клетки;
 - (d) размножение NK-клеток в присутствии APC, тем самым получая размноженные NK-клетки; и
 - (e) нарушение экспрессии CISH в размноженных NK-клетках.
15. Способ по п.14, в котором нарушение экспрессии включает использование опосредованного CRISPR сайленсинга гена.
16. Способ по п.15, в котором опосредованное CRISPR подавление гена включает введение в контакт CAR-NK-клеток с одиночной гидовой РНК и Cas9.

17. Способ по п.11, в котором одиночная гидовая РНК нацелена на экзон 4 CISH.
18. Способ по п.17, в котором одиночная гидовая РНК содержит SEQ ID NO:1-2.
19. Способ по п.14, в котором исходную популяцию НК-клеток получают путем выделения мононуклеарных клеток с использованием градиента плотности фиколл-пак.
20. Способ по п.14, в котором APC представляют собой гамма-облученные APC.
21. Способ по п.14, в котором APC представляют собой универсальные APC (uAPC).
22. Способ по п.14, в котором APC сконструированы для экспрессии 41BB и IL-21.
23. Способ по п.21, в котором uAPC сконструированы для экспрессии (1) CD48 и/или CS1 (CD319), (2) мембраносвязанного интерлейкина-21 (mbIL-21) и (3) лиганда 41BB (41BBL).
24. Способ по п.14, в котором НК-клетки и APC присутствуют в соотношении 1:2.
25. Способ по п.14, в котором НК-клетки стадии (b) и (d) дополнительно размножают в присутствии IL-2.
26. Способ по п.25, в котором IL-2 присутствует в концентрации 100-300 ед/мл.
27. Способ по п.25, в котором IL-2 присутствует в концентрации 200 ед/мл.
28. Способ по п.14, в котором введение включает трансдукцию.
29. Способ по п.14, в котором экспрессионной конструкцией CAR и/или TCR является лентивирусный вектор или ретровирусный вектор.
30. Способ по п.14, в котором НК-клетки совместимы с GMP.
31. Способ по п.14, в котором НК-клетки являются аллогенными.
32. Способ по п.14, в котором НК-клетки являются аутологичными.
33. Способ по п.14, в котором CAR и/или TCR обладают антигенной специфичностью в отношении CD19, CD319/CS1, ROR1, CD20, CD5, CD7, CD22, CD70, CD30, BCMA, CD25, лигандов NKG2D, MICA/MICB, карциноэмбрионального антигена, альфафетопротейна, CA-125, MUC-1, эпителиального опухолевого антигена, ассоциированного с меланомой антигена, мутировавшего p53, мутировавшего gas, HER2/Neu, ERBB2, связывающего фолат белка, гликопротеина gp120 оболочки ВИЧ-1, гликопротеина gp41 оболочки ВИЧ-1, GD2, CD123, CD23, CD30, CD56, c-Met, мезотелина, GD3, HERV-K, IL-11Alpha, цепи каппа, цепи лямбда, CSPG4, ERBB2, WT-1, EGFRvIII, TRAIL/DR4 и/или VEGFR2.
34. Способ по п.14, в котором CAR обладает антигенной специфичностью в отношении CD19.
35. Способ по п.14, в котором экспрессионная конструкция CAR и/или TCR дополнительно экспрессирует цитокин.
36. Способ по п.35, в котором цитокином является IL-15, IL-21 или IL-12.
37. Способ по п.14, дополнительно включающий криоконсервацию популяции размноженных НК-клеток.
38. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию НК-клеток по любому из пп. 1-11 или НК-клеток, полученных способом по любому из пп. 14-37, и фармацевтически приемлемый носитель.

39. Композиция, содержащая эффективное количество НК-клеток по любому из пп. 1-11 или НК-клеток, полученных способом по любому из пп. 14-37, для применения в лечении заболевания или расстройства у субъекта.

40. Применение композиции, содержащей эффективное количество НК-клеток по любому из пп. 1-11 или НК-клеток, полученных способом по любому из пп. 14-37, для лечения иммуноопосредованного расстройства у субъекта.

41. Способ лечения иммуноопосредованного расстройства у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества НК-клеток по любому из пп. 1-11 или НК-клеток, полученных способом по любому из пп. 14-37.

42. Способ по п.41, в котором иммуноопосредованным расстройством является рак, аутоиммунное заболевание, заболевание трансплантат против хозяина, отторжение аллотрансплантата или воспалительное состояние.

43. Способ по п.41, в котором иммуноопосредованным расстройством является воспалительное состояние, а иммунные клетки по существу не обладают экспрессией глюкокортикоидного рецептора.

44. Способ по п.43, в котором субъект получал или получает стероидную терапию.

45. Способ по п.41, в котором НК-клетки являются аутологичными.

46. Способ по п.41, в котором НК-клетки являются аллогенными.

47. Способ по п.41, в котором иммуноопосредованным расстройством является рак.

48. Способ по п.47, в котором раком является солидный рак или гематологическое злокачественное новообразование.

49. Способ по п.41, дополнительно включающий введение по меньшей мере второго терапевтического средства.

50. Способ по п.49, в котором по меньшей мере второе терапевтическое средство включает в себя химиотерапию, иммунотерапию, хирургию, лучевую терапию или биотерапию.

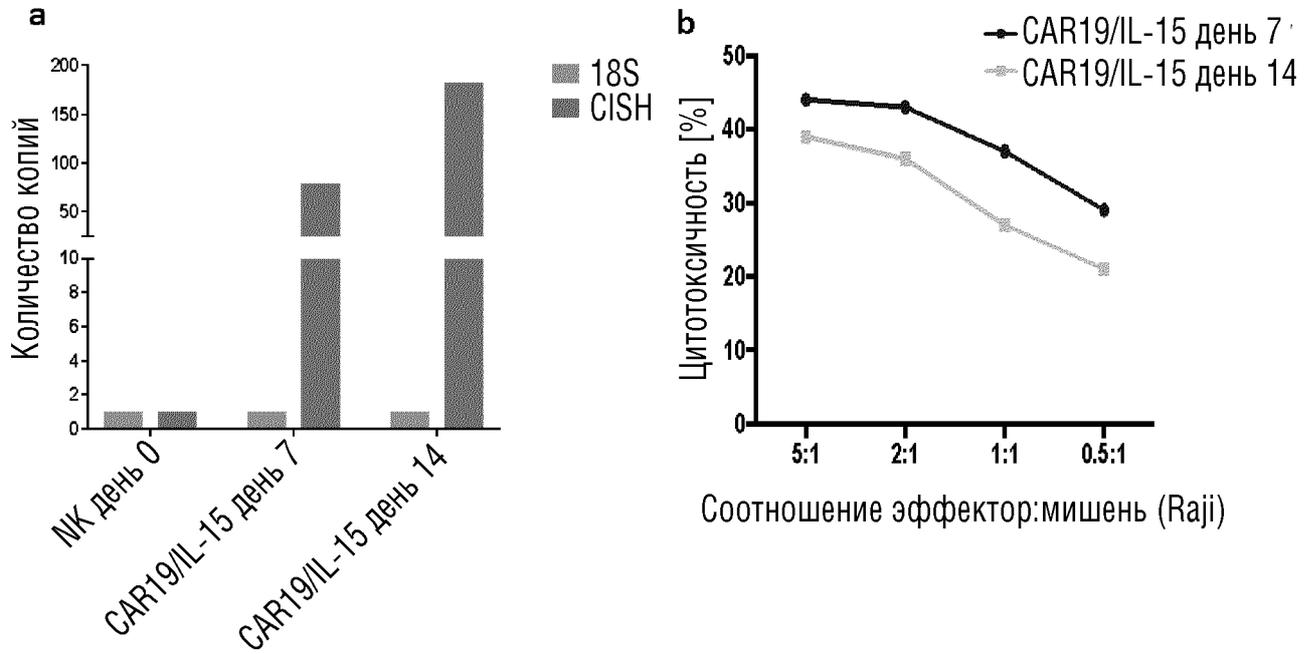
51. Способ по п.49, в котором НК-клетки и/или по меньшей мере второе терапевтическое средство вводят внутривенно, внутривентриально, интратрахеально, внутриопухолево, внутримышечно, эндоскопически, внутрь очага поражения, чрескожно, подкожно, местно или путем прямой инъекции или перфузии.

52. Способ по п.49, в котором НК-клетки по существу без экспрессии CISH обладают улучшенной функцией по сравнению с НК-клетками с экспрессией CISH.

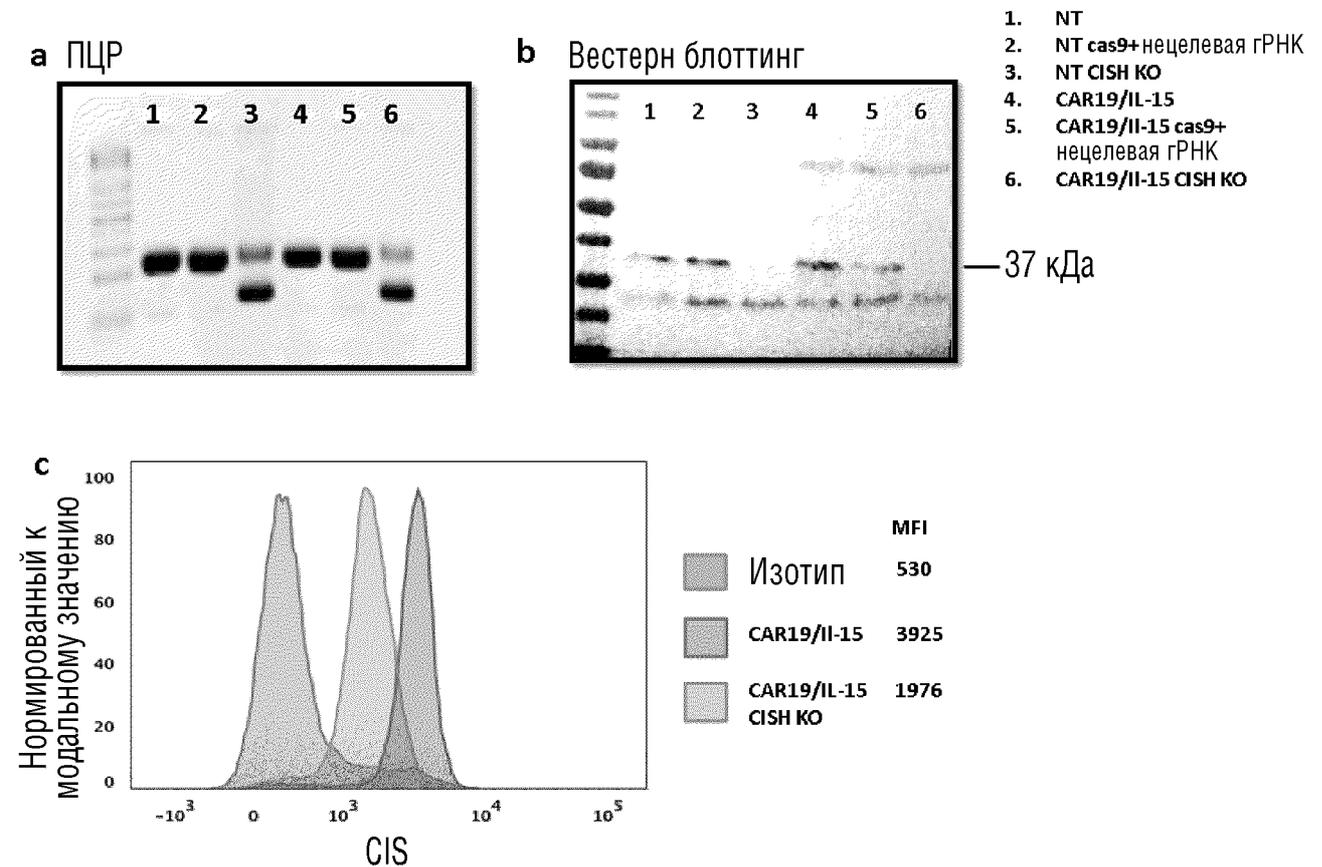
53. Способ по п.52, в котором улучшенную функцию измеряют путем внутриклеточного окрашивания на IFN- γ и TNF- α , дегрануляции CD107a и уничтожения опухоли с помощью анализа высвобождения ^{51}Cr .

54. Способ по п.52, в котором улучшенную функцию измеряют по повышенной экспрессии гранзима-b, перфорина, TRAIL, CD3z, Eomes, T-bet, DAP12, DNAM, CD25 и/или Ki67.

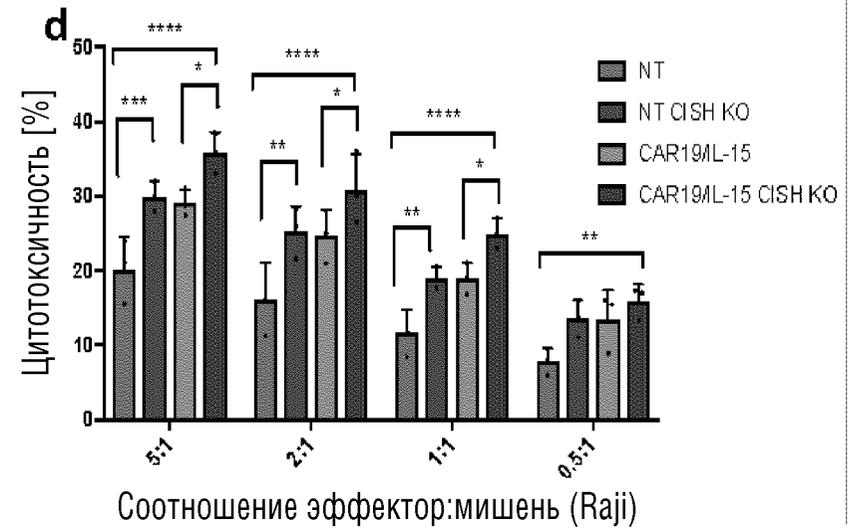
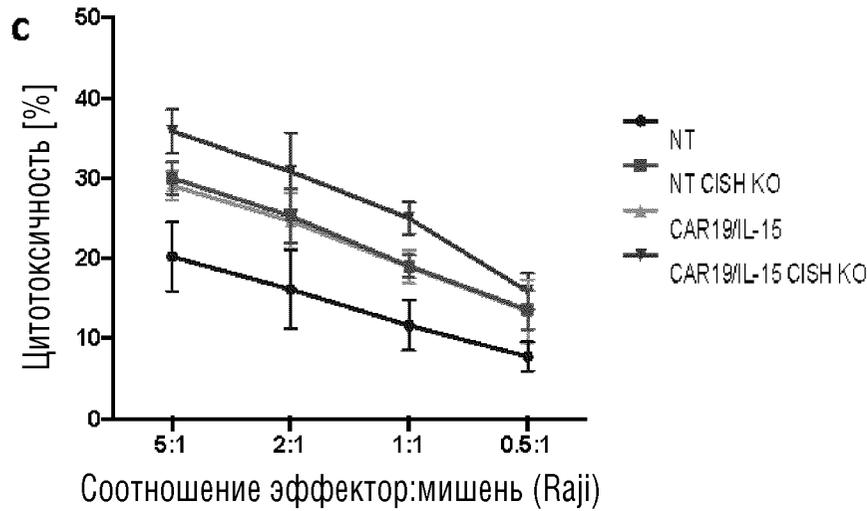
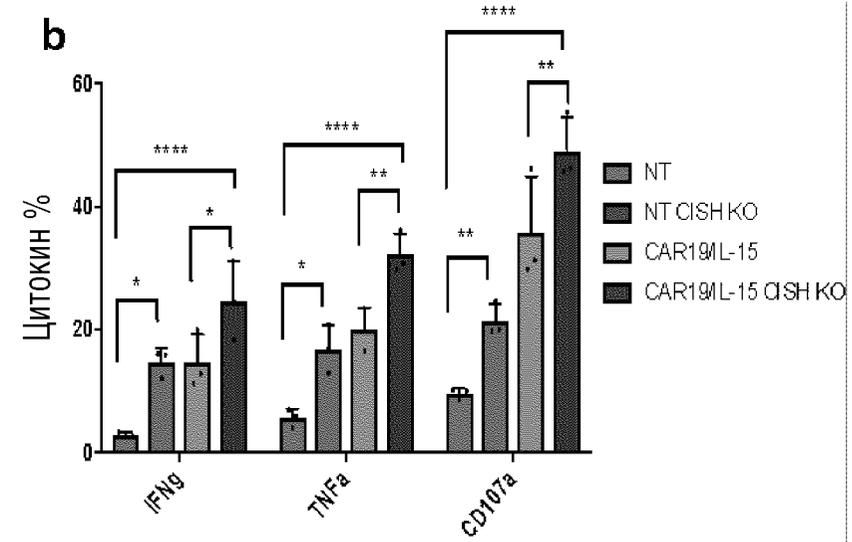
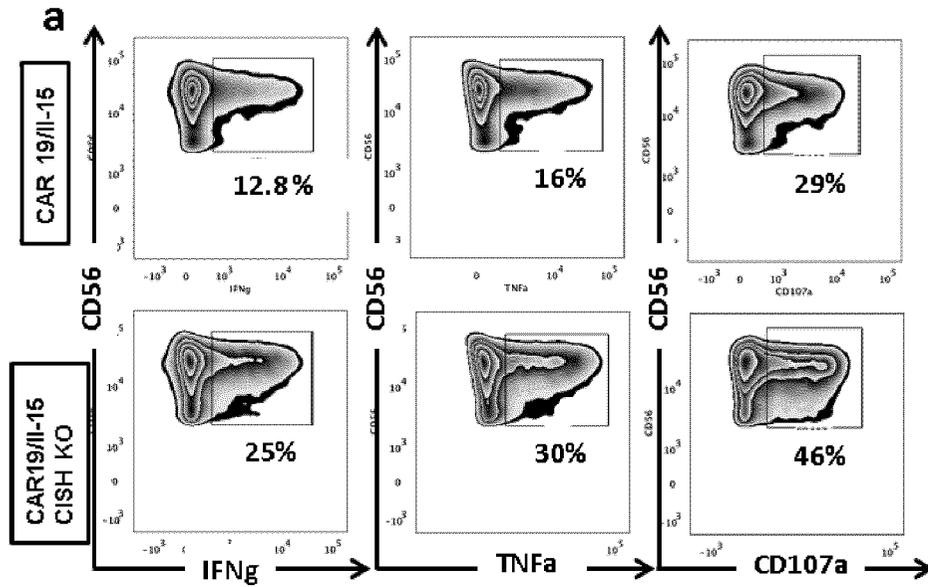
ФИГ.1А-1В



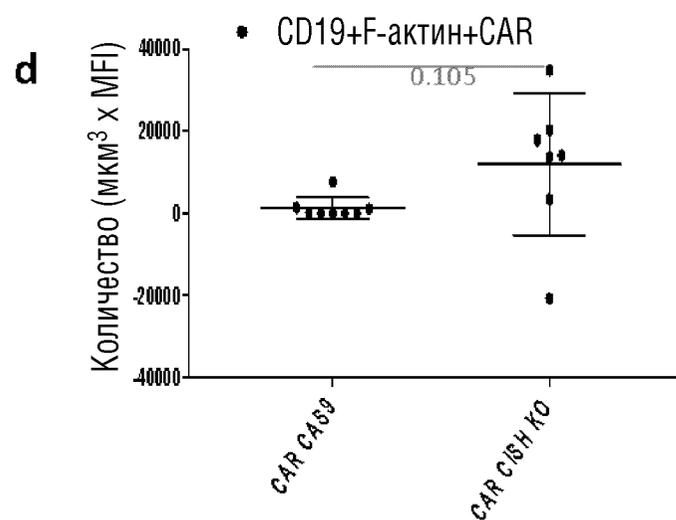
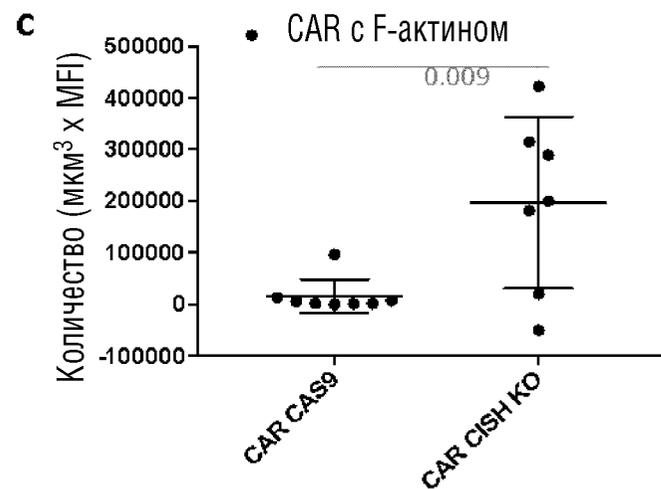
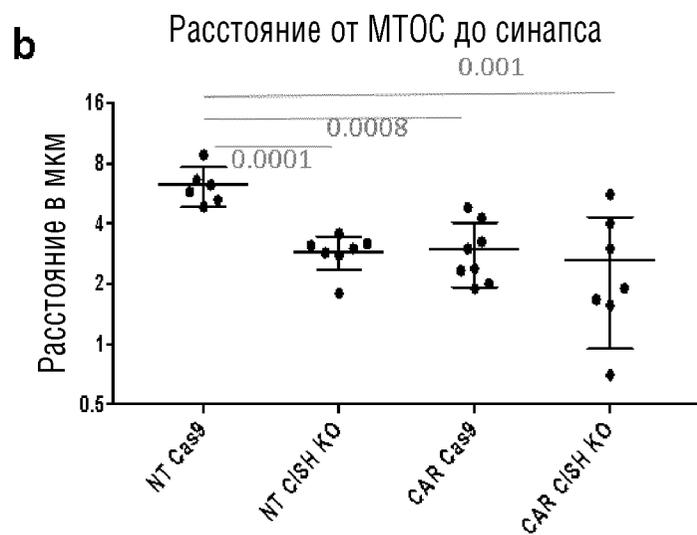
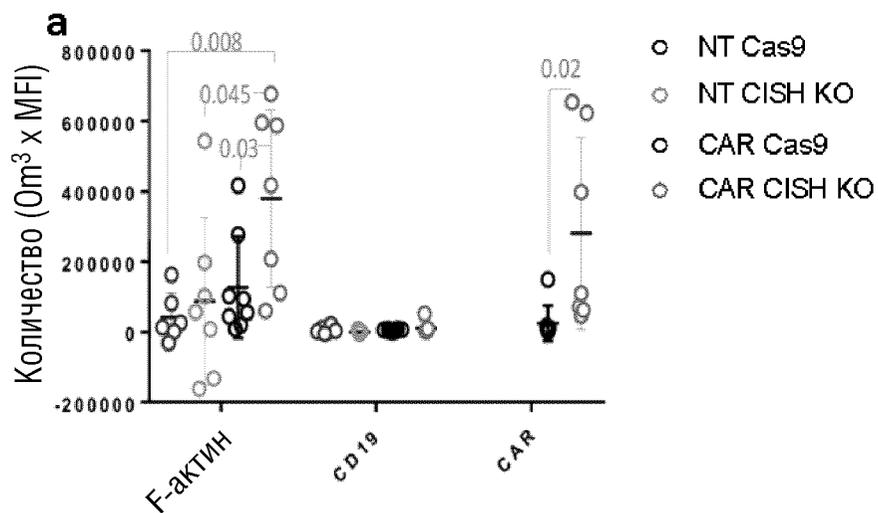
ФИГ.2А-2С



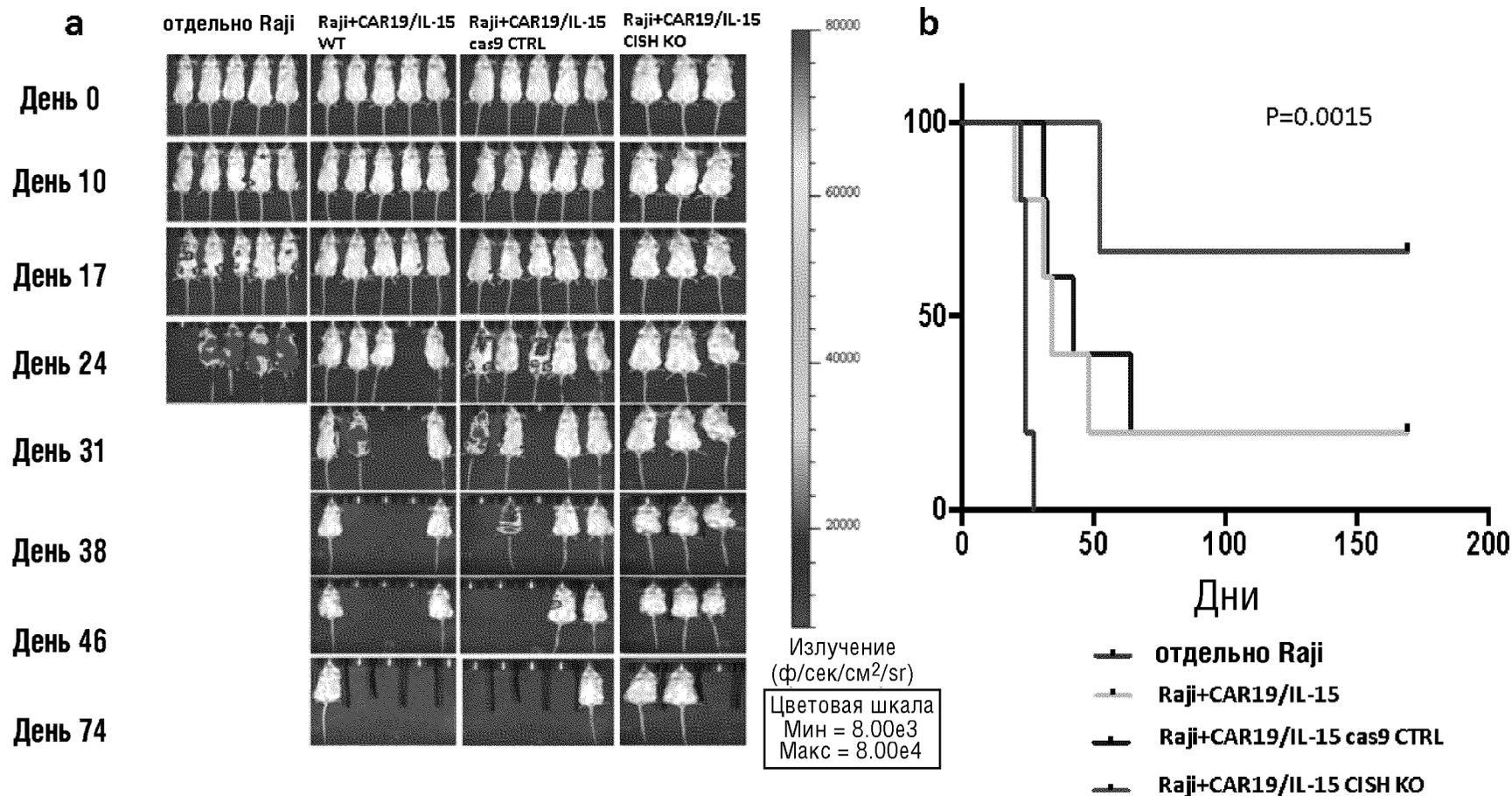
ФИГ.3А-3D



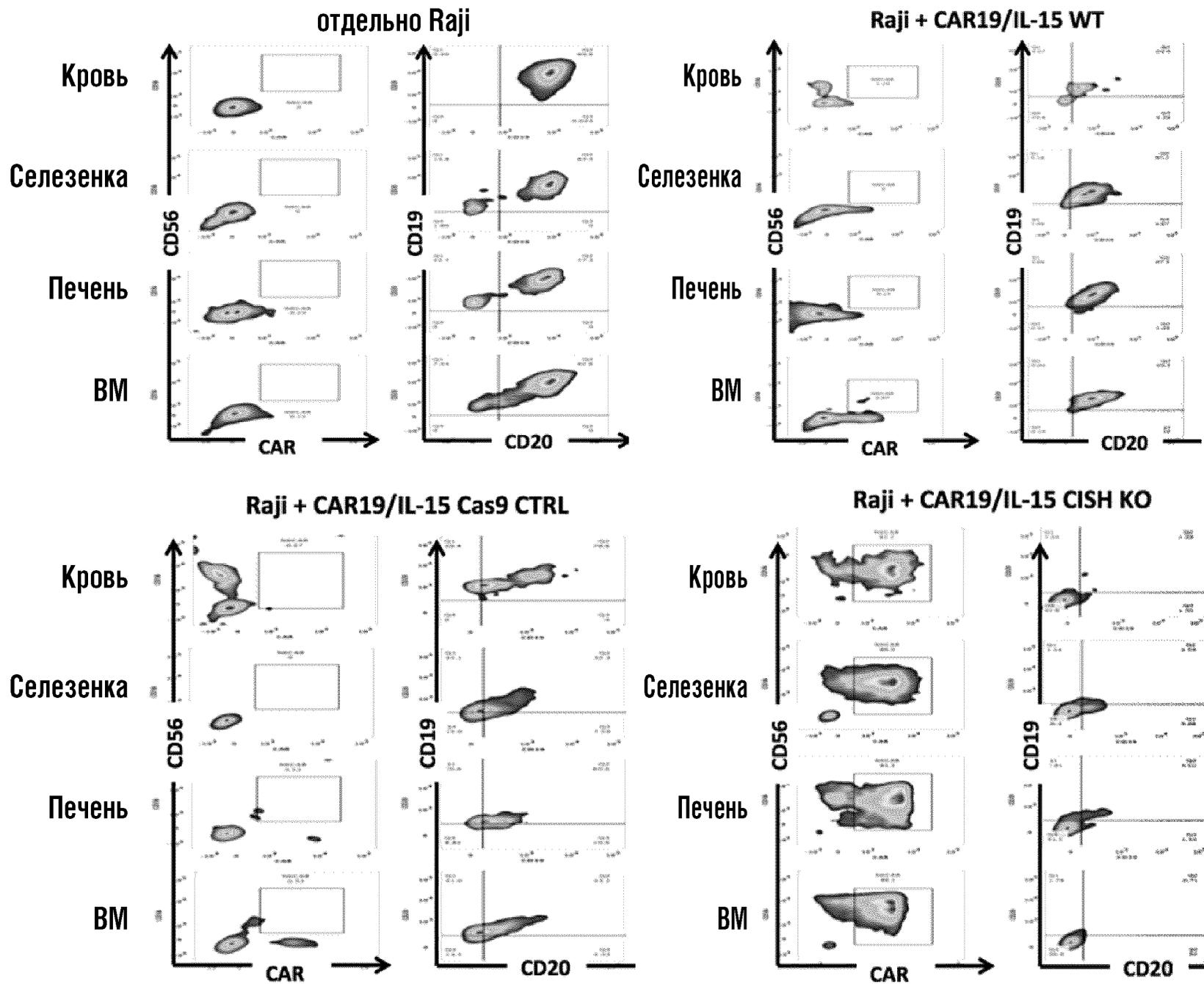
ФИГ.4А-4D



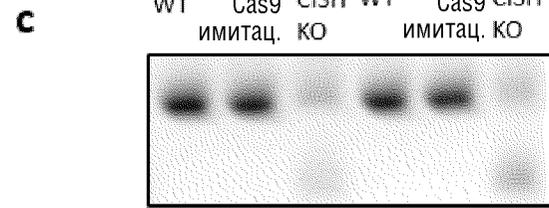
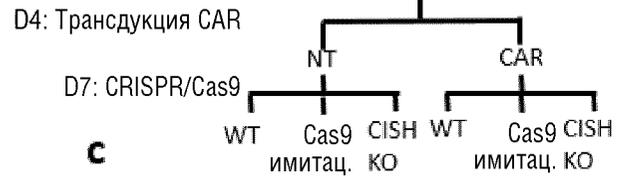
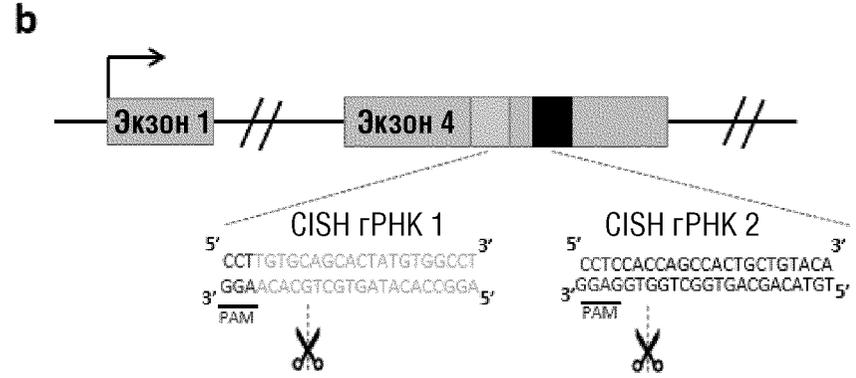
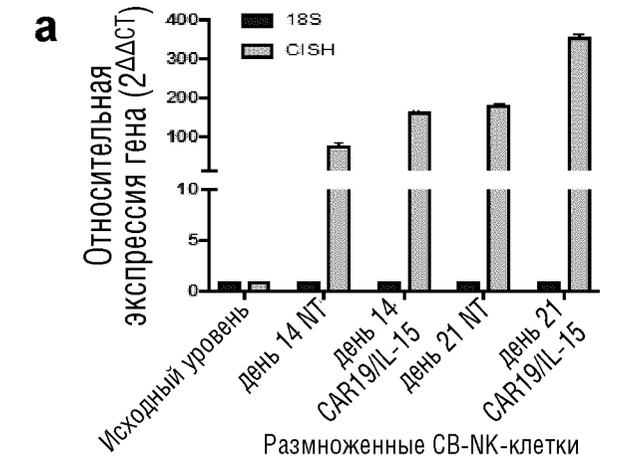
ФИГ.5А-5В



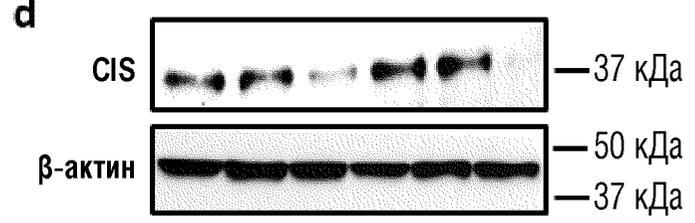
ФИГ.6



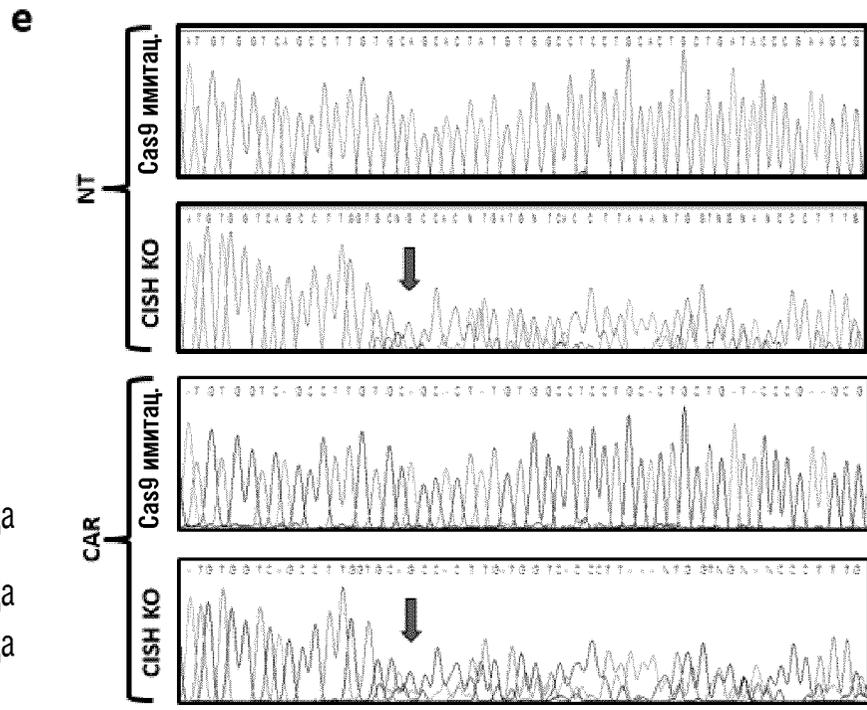
ФИГ.7А-7Е



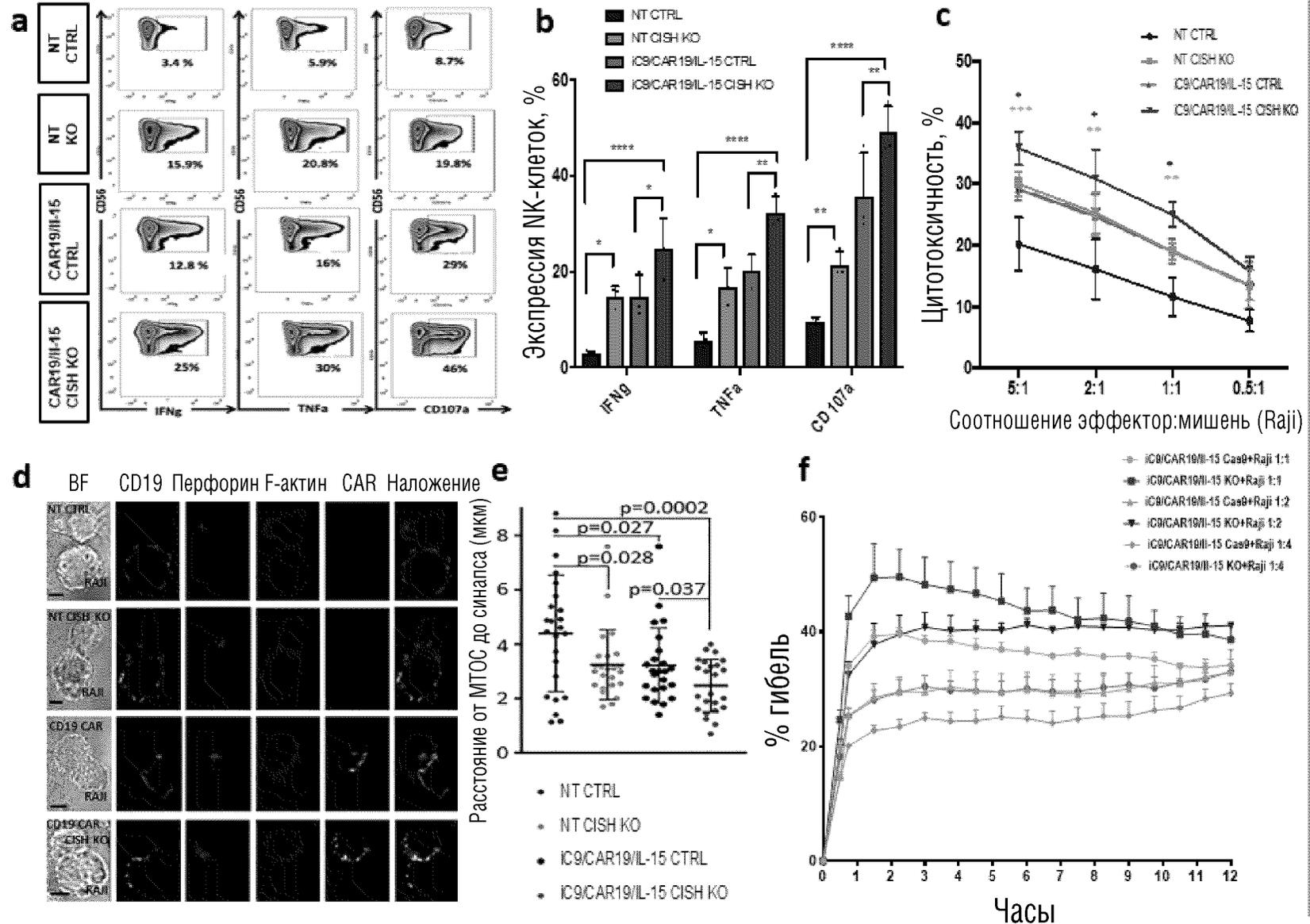
% InDel 0 0 91 0 0 95



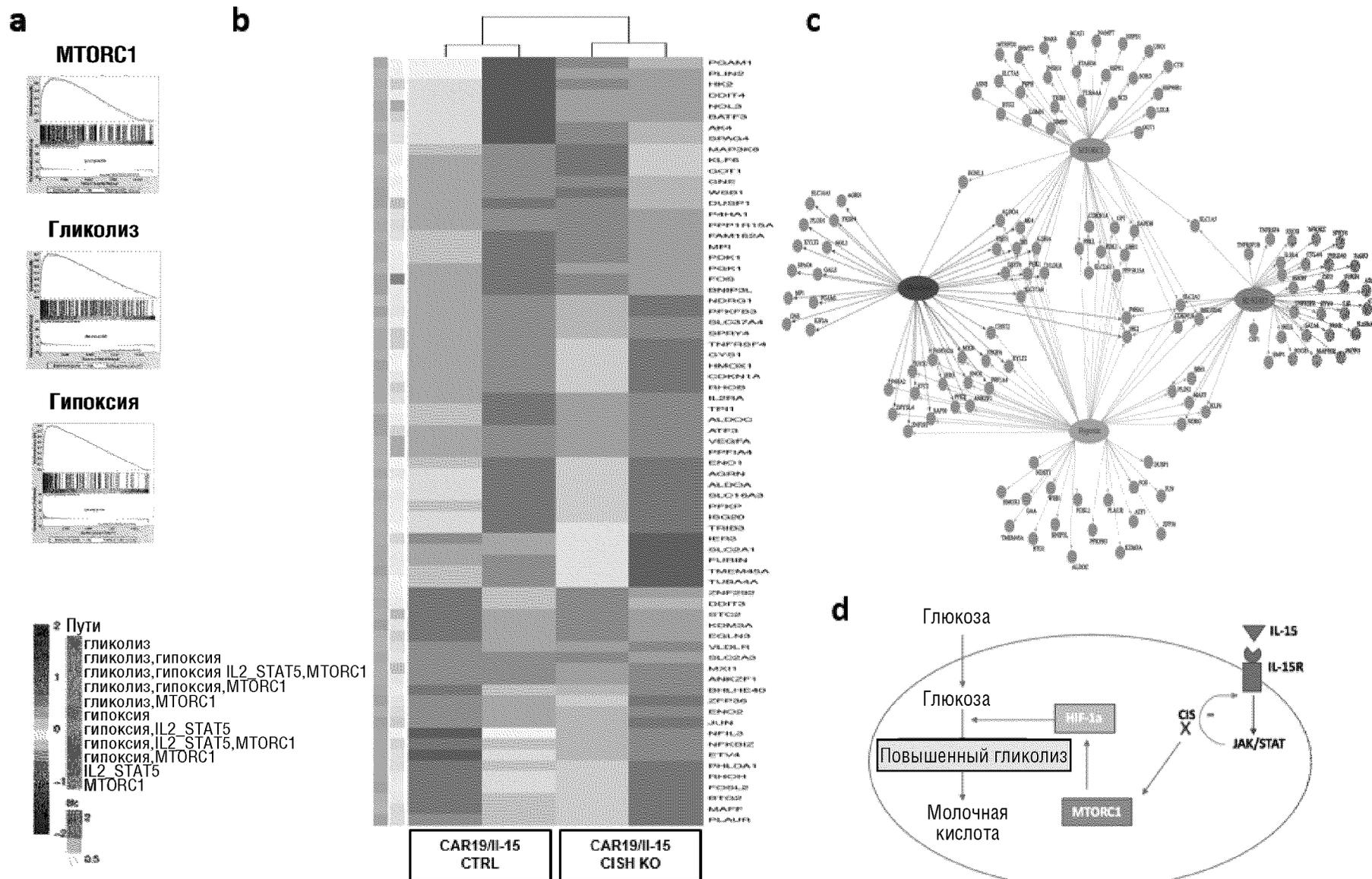
Потеря белка, % 0 0 81 0 0 98



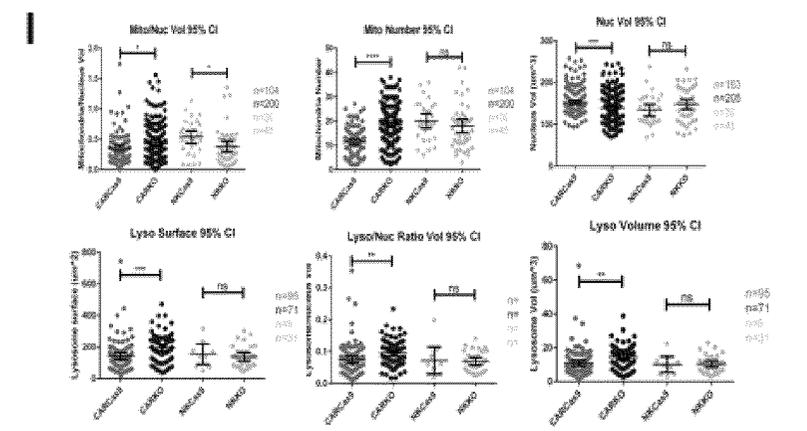
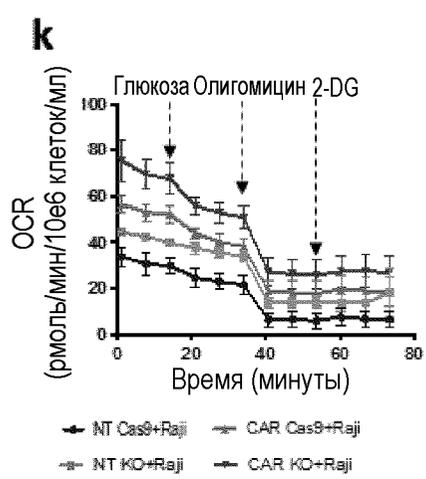
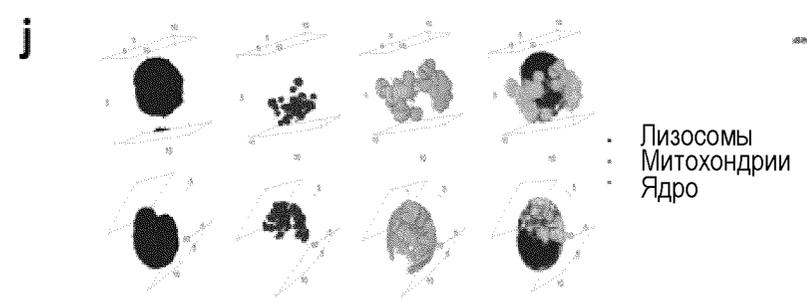
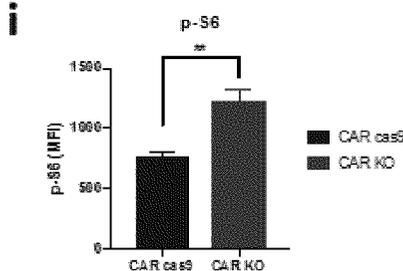
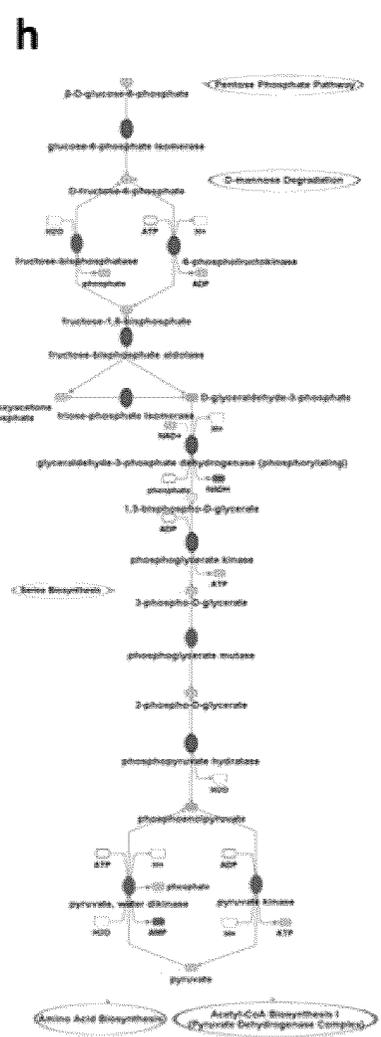
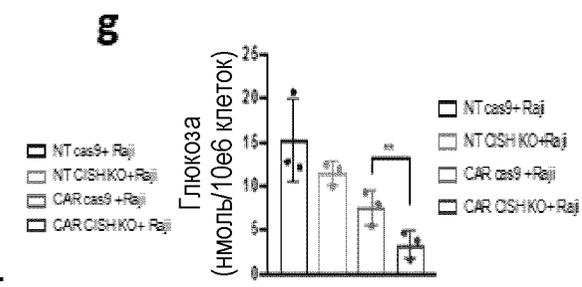
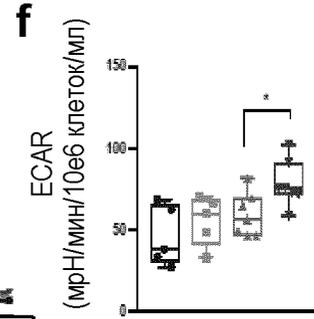
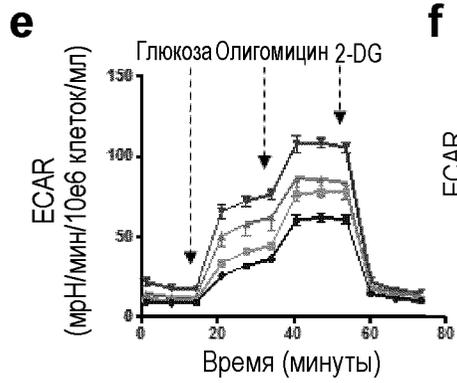
ФИГ.8А-8F



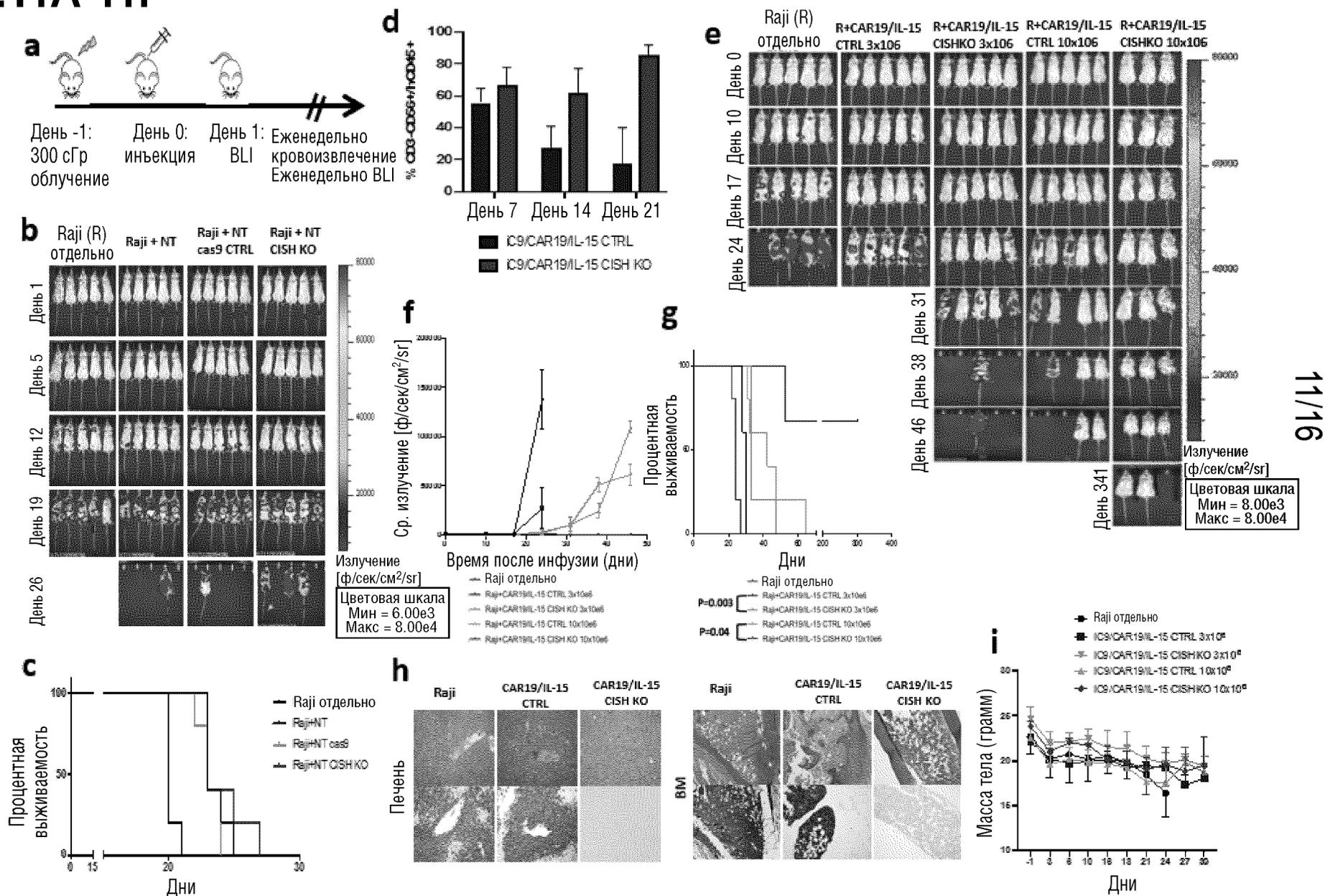
ФИГ.10А-10D



ФИГ.10E-10L

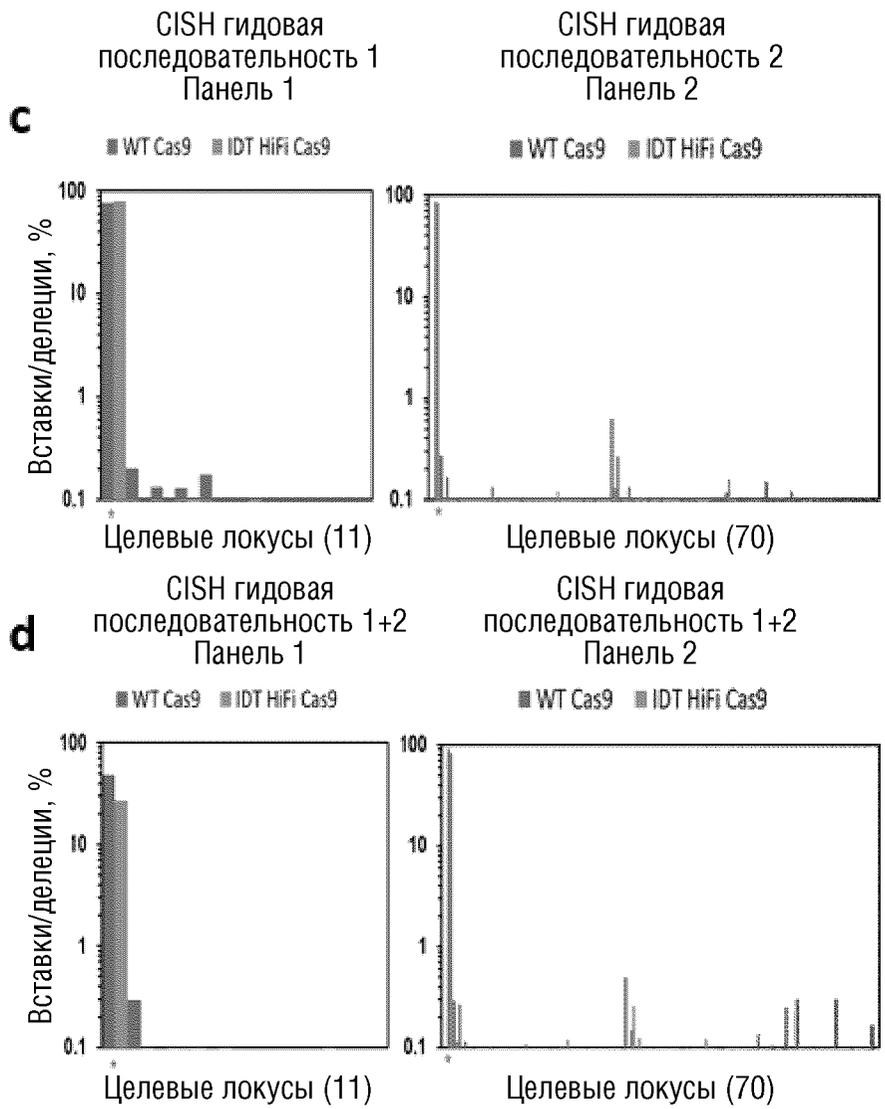
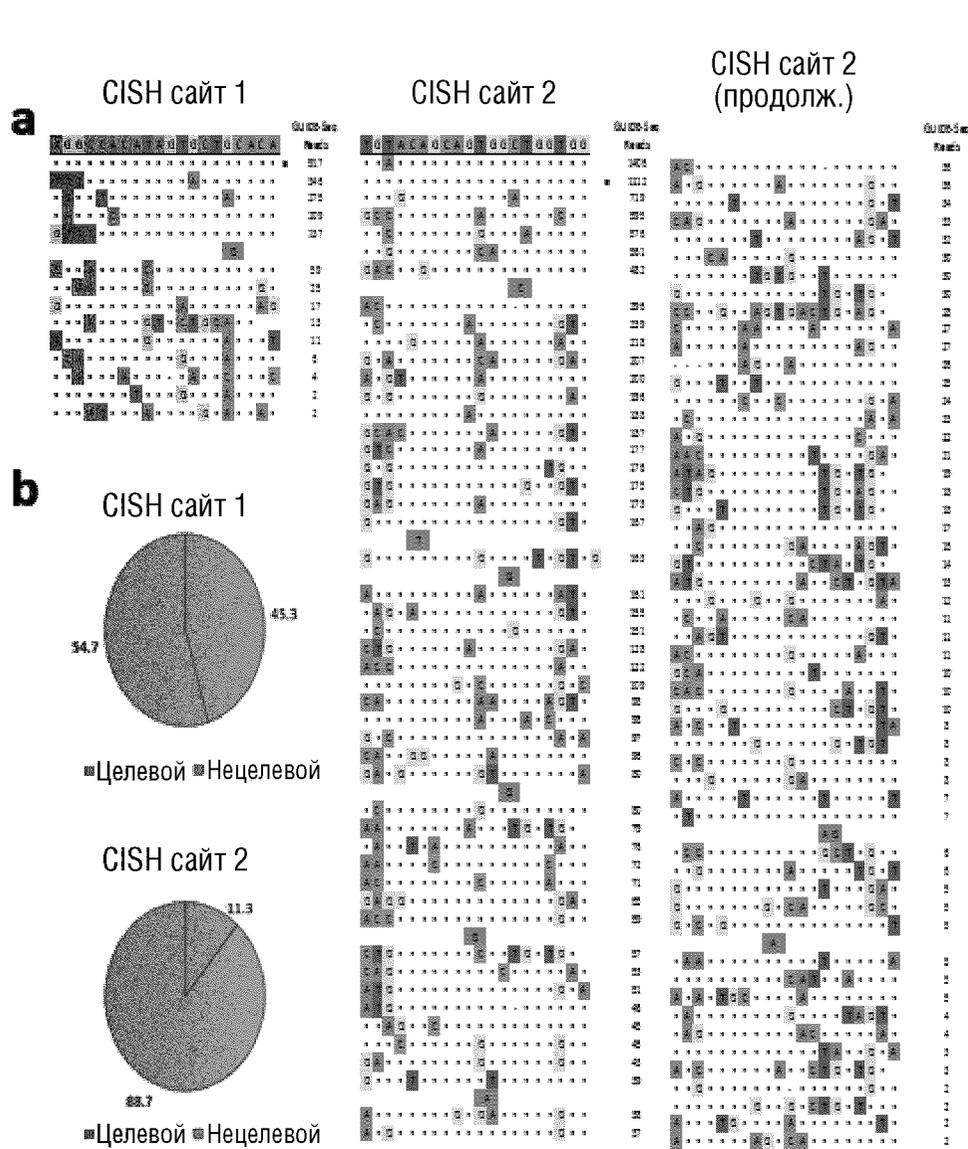


ФИГ.11А-11I

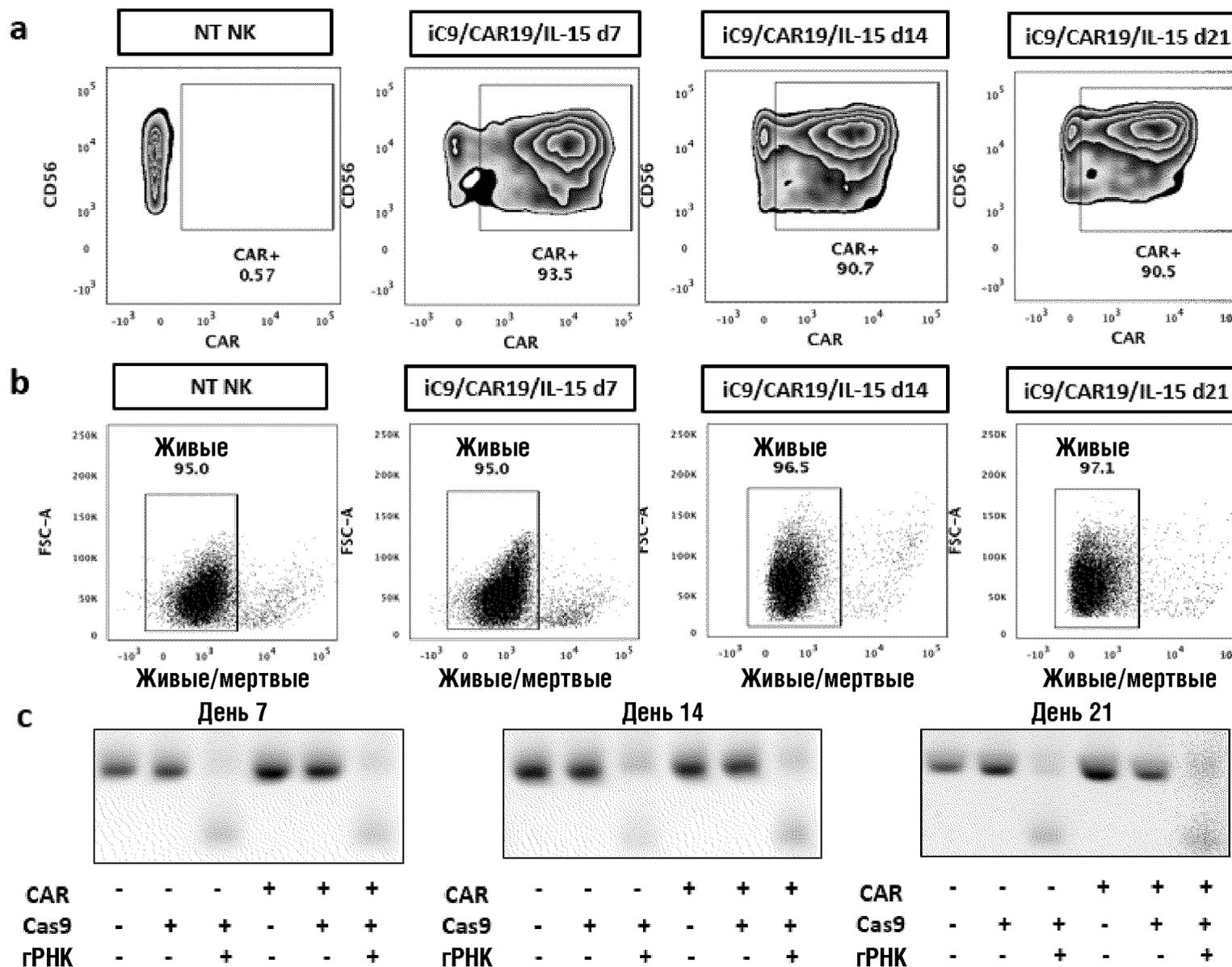


11/16

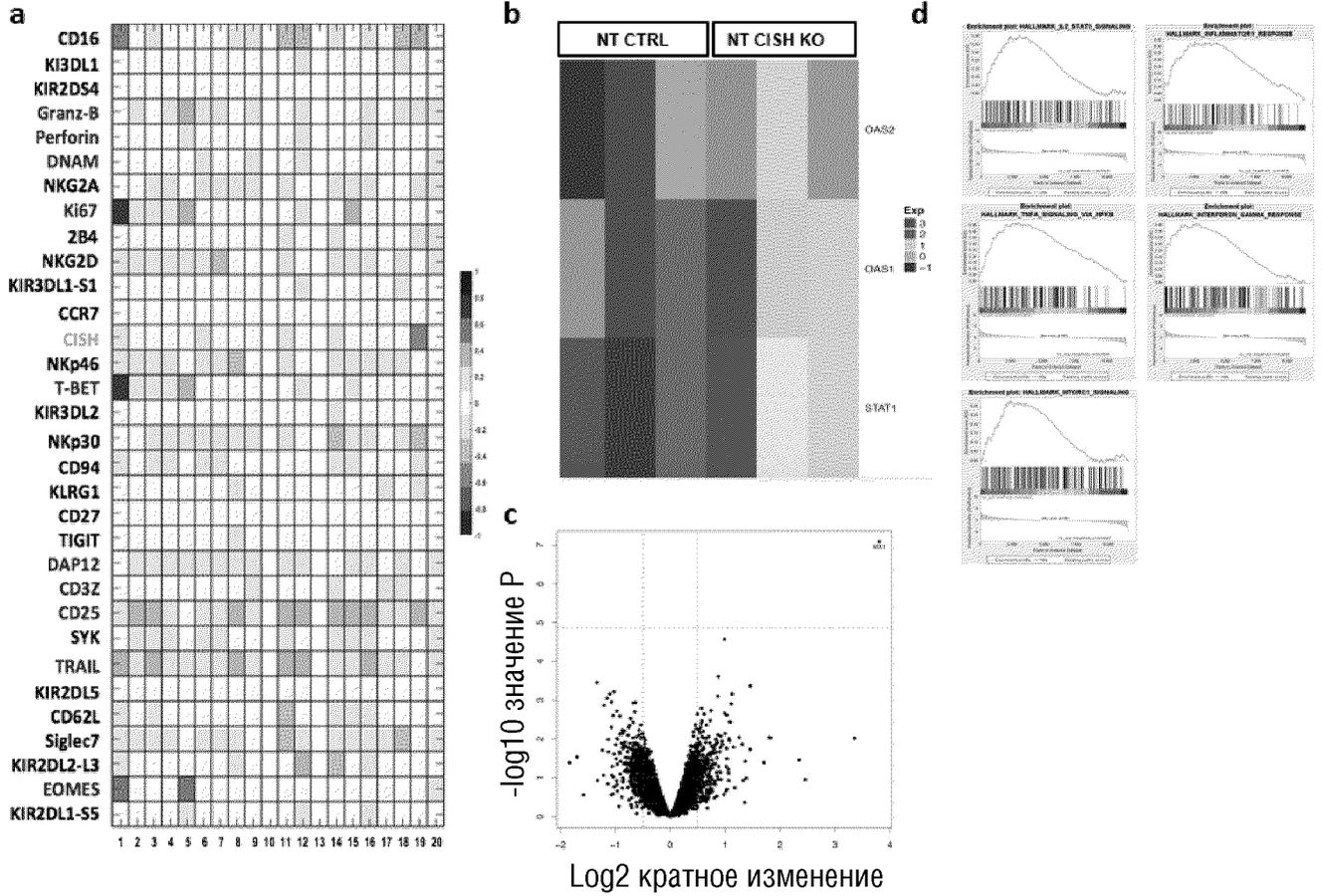
ФИГ.12А-12D



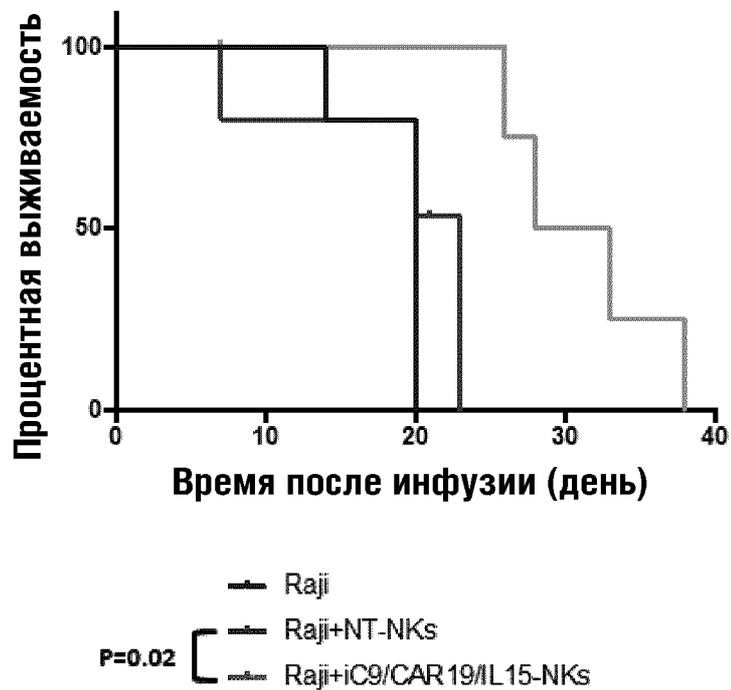
ФИГ.13А-13С



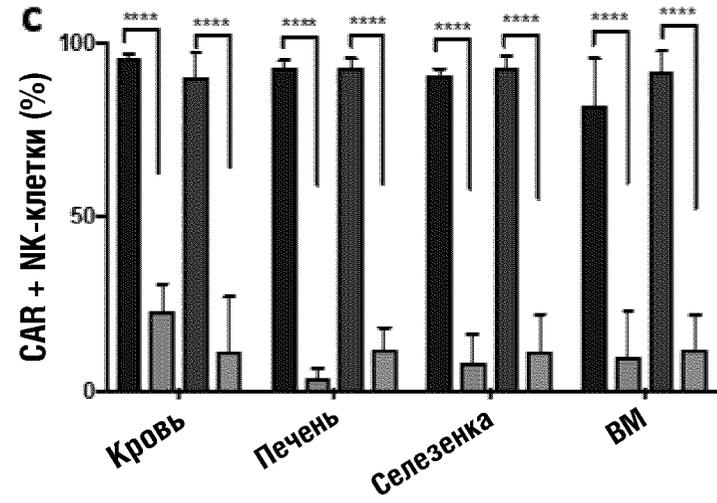
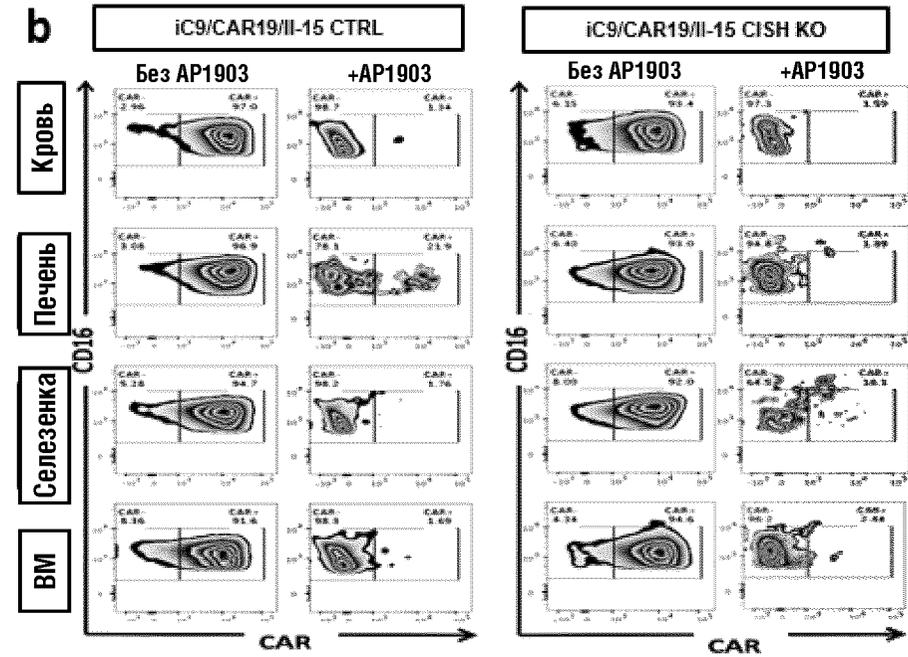
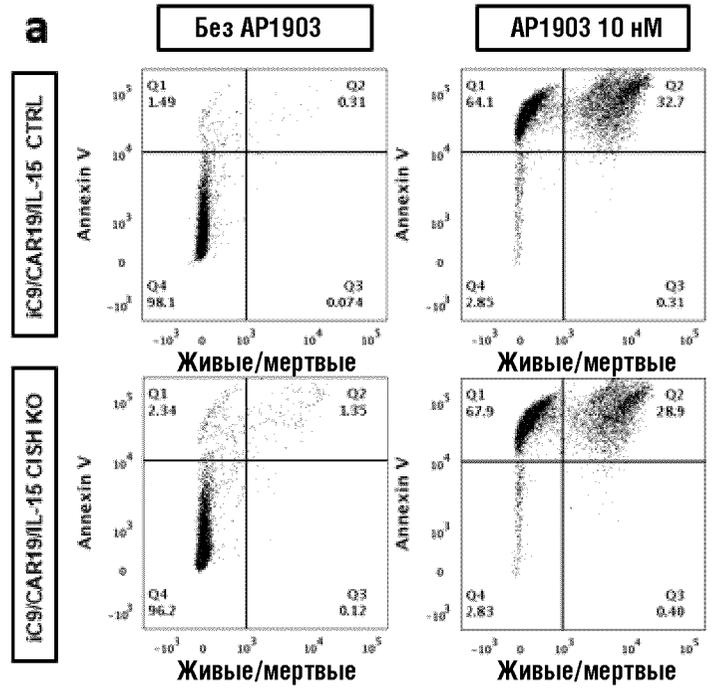
ФИГ.14А-14D



ФИГ.15



ФИГ.16



- iC9/CAR19/IL-15 CTRL
- iC9/CAR19/IL-15 CTRL + AP1903
- iC9/CAR19/IL-15 CISH KO
- iC9/CAR19/IL-15 CISH KO + AP1903

ФИГ.17

Селезенка

Печень

BM

