

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202191442** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2021.12.28

(22) Дата подачи заявки  
2019.12.02

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)  
*C07K 14/725* (2006.01)  
*C12N 5/0783* (2010.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*C12N 5/073* (2010.01)

---

(54) **АЛЛОГЕННЫЕ CAR Т-КЛЕТКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ПЛАЦЕНТЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) 62/774,142; 62/878,736

(32) 2018.11.30; 2019.07.25

(33) US

(86) PCT/US2019/064074

(87) WO 2020/113234 2020.06.04

(71) Заявитель:  
СЕЛУЛЭРИТИ ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Хэрири Роберт Дж., Карасиевич Кэти,  
Ли Тяньцзянь (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

---

(57) Изобретение раскрывает популяции Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), где указанные Т-клетки представляют собой плацентарные Т-клетки, полученные из пуповинной крови, перфузата плаценты или их смеси. Показано, что такие популяции клеток превосходят по ряду аспектов альтернативные популяции клеток, такие как получаемые из Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. Изобретение также раскрывает ряд способов лечения рака, такого как гематологический рак, например В-клеточный рак, или его симптома у пациента, нуждающегося в этом. Эти способы включают введение пациенту определенного количества любой из предлагаемых изобретением популяций Т-клеток, эффективного для облегчения рака или его симптома у пациента.

---

**A1**

**202191442**

**202191442**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568753EA/032

### АЛЛОГЕННЫЕ CAR T-КЛЕТКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ПЛАЦЕНТЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[1] Настоящее изобретение частично относится к клеткам химерного антигенного рецептора (CAR) и CAR-терапиям.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[2] CAR-терапия становится критически важным инструментом, направленным против рака. Однако эти способы лечения обычно основаны на использовании в качестве популяции эффекторных клеток собственных клеток пациента, например, T-клеток, полученных из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Поскольку клетки каждого пациента следует собрать, протестировать и превратить в терапевтическое средство CAR, CAR-терапия является: 1) очень дорогой; и 2) доступна только в определенных центрах, которые желают и/или могут проводить такую терапию. Эти недостатки приводят к тому, что CAR-терапия в значительной степени недоступна для многих групп пациентов, нуждающихся в ней. Настоящее изобретение частично направлено на создание готовой аллогенной CAR-терапии, направленной на облегчение этих и других проблем.

[3] Аутологичная CAR-T терапия стала частью стандарта лечения больных с гематологическим раком. Источником клеток для CAR-T терапии являются PBMC пациента. Разработка терапии аллогенными CAR-T клетками вступила в клинические испытания, в которых в качестве исходного материала также используются PBMC. T-клетки UCB (umbilical cord blood - пуповинная кровь) обладают различными биологическими свойствами, что делает их более подходящими для использования в качестве исходного материала для аллогенной клеточной терапии. Они имеют преобладающий фенотип T<sub>cm</sub> и T<sub>naïve</sub>, демонстрируют повышенную пролиферативную активность и сохраняют более длинные теломеры/более высокую активность теломеразы по сравнению с T-клетками, размноженными из PBMC (Okas, et. al. Journal of Immunotherapy, 2010; Frumento, et. al. Journal of Transplantation, 2013). У них более высокая иммунная толерантность к несоответствию по HLA и нарушена аллогенная активация (Barker, et. Al. Blood, 2001; Chen, et al. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2006). Для терапевтических целей их можно размножить до клинических масштабов.

[4] T-клетки и NK-клетки являются ключевыми клеточными медиаторами аллореактивности. Рецептор T-клеток является ключевым рецептором, участвующим в аллореактивности. Инактивация гена рецептора T-клеток приводила к снижению аллореактивности. NK-клетки-хозяева убивают донорские клетки с несовпадением по HLA или не экспрессируют молекулы HLA. Один из механизмов, позволяющих избежать уничтожения NK-клетками, заключается в экспрессии молекулы HLA-E, которая

ингибирует функцию NK-клеток.

[5] Мы разработали уникальную платформу для использования послеродовых человеческих Т-клеток, полученных из плаценты, для использования в аллогенной платформе для лечения гематологических и солидных видов рака. В настоящих исследованиях мы продемонстрировали доказательство концепции с использованием плацентарных Т-клеток для лечения В-клеточных злокачественных новообразований как клетками CD19 CAR-T, так и клетками CD20 CAR-T. При том, что Т-клетки, происходящие из плаценты (P-T-клетки), демонстрируют большую иммунную толерантность и нарушение аллогенных ответов, мы предполагаем и нами продемонстрирован константный нокаут (КО) рецептора Т-клеток (TRAC), например, опосредованный CRISPR константный нокаут (КО) Т-клеточного рецептора (TRAC) как этап в качестве дополнительной стратегии снижения риска для обхода любой потенциальной РТПХ (реакция трансплантат против хозяина), возникающей в результате экспрессии эндогенного Т-клеточного рецептора на P-T-клетках. При необходимости эти клетки могут быть дополнительно генетически модифицированы, чтобы НЕ экспрессировать В2М и экспрессировать химерные молекулы HLA-E с тем, чтобы снизить их аллореактивность/клиренс Т-/NK-клетками.

### **РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[6] Настоящее изобретение направлено на использование клеток, полученных из плаценты, в качестве источника клеток для CAR-терапии. Эти клетки включают клетки, выделенные из плаценты, из плацентарного перфузата и из пуповинной крови, а также их комбинации. В настоящих примерах использовались клетки из пуповинной крови и/или из плацентарного перфузата, и было показано, что эти клетки, полученные из плаценты, имеют преимущество перед Т-клетками из других источников, такими как клетки из РВМС.

[7] В данном документе заявители обнаружили, что клетки, полученные из плаценты, имеют более интактный фенотип с меньшим количеством эффекторных клеток/клеток памяти, чем у РВМС, что представляет собой одно из преимуществ этой популяции. Кроме того, заявители продемонстрировали увеличение количества Т-клеток, полученных из плаценты, до 3600 раз. На основании этих открытий одним из аспектов изобретения является использование Т-клеток, полученных из плаценты, как типа клеток для CAR-терапии, например Т-клеток, полученных из пуповинной крови, или размноженных ex vivo Т-клеток, полученных из пуповинной крови.

[8] Заявители также разработали способы реализации этого и показали, что такие клетки можно с высокой эффективностью трансдуцировать с помощью типичного CAR и легко убивать клетки, экспрессирующие мишень, при этом не убивая клетки, лишённые мишени. Это уничтожение или его отсутствие коррелировало с экспрессией эффекторных цитокинов, вызванной в ответ на экспрессирующие мишень, но не лишённые мишени опухолевые клетки.

[9] Заявители также продемонстрировали, что Т-клетки, полученные из плаценты,

значительно менее аллореактивны, чем РВМС. Таким образом, в некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения, для использования в CAR-терапии предлагается использовать клетки, полученные из плаценты, например, клетки, полученные из пуповинной крови, или размноженные клетки, полученные из пуповинной крови.

[10] Дополнительное преимущество, обнаруженное заявителями, заключается в том, что наивный фенотип Т-клеток, полученных из плаценты, допускает истощение Treg-клеток, что в противном случае могло бы снизить эффективность CAR-терапии. Такое истощение невозможно/нецелесообразно для РВМС из-за экспрессии CD25 на активированных Т-клетках.

[11] В дальнейших усилиях по созданию аллогенной CAR-терапии заявители удалили часть TCR, в данном случае TRAC. Заявители разработали высокоэффективные способы проведения генетической модификации Т-клеток, полученных из плаценты, с использованием CRISPR. Ожидается, что использование такой генетической модификации еще больше усилит аллогенные преимущества Т-клеток, полученных из плаценты. Таким образом, в некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения, предлагается генетическая модификация Т-клеток для снижения аллореактивности, такая как отключение гена TCR, например, TRAC.

[12] Хотя в рассматриваемой заявке использовались определенные CAR, ожидается, что такие преимущества, как: 1) использование Т-клеток, полученных из плаценты; 2) нокаут генов Т-клеток, например, генов TCR, таких как TRAC; и 3) их комбинация, будут применимы к любому CAR, значительно улучшат CAR-терапию и обеспечат аллогенное лечение со снижением РТПХ.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

[13] ФИГ. 1 показывает стратегии обхода аллореактивности, обусловленной Т-/NK-клетками.

[14] ФИГ. 2 показывает схему процесса создания аллогенных CAR-Т клеток, происходящих из плаценты.

[15] ФИГ. 3 показывает фенотип выделенных из плаценты изолированных Т-клеток.

[16] ФИГ. 4 показывает размножение *in vitro* Т-клеток, полученных из плаценты, через 20 дней.

[17] ФИГ. 5 показывает фенотип размноженных *in vitro* Т-клеток, происходящих из плаценты, через 20 дней после рестимуляции через 13 дней.

[18] ФИГ. 6 показывает размножение *in vitro* модифицированных CD 19 CAR Т-клеток, полученных из плаценты, через 15 дней.

[19] ФИГ. 7 показывает статус дифференцировки Р-Т клеток, модифицированных CD 19 CAR, на день 15.

[20] ФИГ. 8 показывает экспрессию CD57 на Т-эффекторных клетках памяти (T<sub>em</sub>) и Т-эффекторных клетках (T<sub>eff</sub>).

[21] ФИГ. 9 показывает фенотипический анализ Р-Т клеток, модифицированных

CD19 CAR, на день 15.

[22] ФИГ. 10 показывает экспрессию CD 19 CAR на 15 день титрованных вирусных векторов CD19 CAR в P-T клетках.

[23] ФИГ. 11 показывает фенотип P-CD19 CAR на 15-й день, воспроизводимый в нескольких препаратах P-T от разных доноров плаценты.

[24] ФИГ. 12 показывает экспрессию CD19 CAR на 15-й день, воспроизводимую в нескольких препаратах P-T от разных доноров плаценты.

[25] ФИГ. 13 показывает цитотоксичность клеток UCB CD19 CAR-T на 14 день по сравнению с мишенями CD19+/CD19- (верхние панели) и цитотоксичность клеток UCB CD20 CAR-T на 14 день по сравнению с мишенями CD20+/ CD20- (нижние панели).

[26] ФИГ. 14 показывает высвобождение цитокинов клетками UCB CD19 CAR-T на 14 день в сравнении с мишенями CD19+/CD19- .

[27] ФИГ. 15 показывает 4-часовой проточный анализ цитотоксичности, в котором тестируется активность P-CD19 CAR на 15-й день по сравнению с мишенями CD 19+/-.

[28] ФИГ. 16 показывает анализ кинетической цитотоксичности ACEA для активности P-CD19 CAR на 15 день в сравнении с мишенями CD 19+/-.

[29] ФИГ. 17 показывает результаты 24-часового анализа высвобождения цитокинов: активность P-CD19 CAR на 15 день в сравнении с CD 19+ Daudi.

[30] ФИГ. 18 показывает результаты 24-часового анализа высвобождения цитокинов: активность P-CD19 CAR на 15-й день в сравнении с CD19+ Nalm6.

[31] ФИГ. 19 демонстрирует активность P-CD19 CAR-T на модели мышей с диссеминированным Daudi-Luc CD19+.

[32] ФИГ. 20 демонстрирует активность P-CD19 CAR-T в отношении повторного заражения опухолевыми клетками на модели диссеминированного Daudi-luc.

[33] ФИГ. 21 показывает эффективность нокаута TRAC в UCB T-клетках.

[34] ФИГ. 22 показывает эффективность P-T TRAC KO на 15 день с использованием CRISPR.

[35] ФИГ. 23 показывает влияние TRACK KO на экспрессию P-T CD19 CAR.

[36] ФИГ. 24 показывает влияние TRAC KO на активность P-CD19 CAR.

[37] ФИГ. 25 показывает аллореактивность P-T клеток, измеренную с помощью анализа цитотоксичности.

[38] ФИГ. 26 показывает аллореактивность P-T клеток, измеренную с помощью анализа пролиферации.

[39] ФИГ. 27 показывает частоту P-T Treg и отсутствие аллореактивности на модели мышей NCG.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[40] Настоящее изобретение относится к популяции T-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), где указанные T-клетки являются плацентарными T-клетками. В некоторых вариантах воплощения, указанные плацентарные T-клетки представляют собой T-клетки пуповинной крови, T-клетки плацентарного перфузата или

их смесь. В некоторых вариантах воплощения, указанные плацентарные Т-клетки представляют собой Т-клетки пуповинной крови. В некоторых вариантах воплощения, указанные плацентарные Т-клетки представляют собой смесь Т-клеток пуповинной крови и Т-клеток плацентарного перфузата.

[41] В других вариантах воплощения, в популяцию Т-клеток, указанный CAR был введен в клетку путем трансфекции. В некоторых вариантах воплощения, указанный CAR был введен в клетку посредством вирусной трансдукции. В других вариантах воплощения, указанный CAR был введен в клетку путем вирусной трансдукции ретровирусным вектором. В других вариантах воплощения, указанный CAR был введен в клетку путем вирусной трансдукции лентивирусным вектором.

[42] Было показано, что эти клетки отличаются, например, от мононуклеарных клеток периферической крови, и, действительно, в нескольких аспектах они лучше указанных клеток.

[43] В некоторых вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CD45RA, чем популяция Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CD27, чем популяция Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CCR7, чем популяция Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CD 127, чем популяция Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток имеет более низкий процент клеток, экспрессирующих CD57, чем популяция Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CD62L, чем популяция Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток имеет более низкий процент клеток, экспрессирующих CD25, чем популяция Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих Lag-3+, чем популяция Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток имеет более низкий процент клеток, экспрессирующих Tim-3, чем популяция Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови.

[44] В некоторых вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток демонстрирует более сильное уничтожение линии раковых клеток *in vitro*, чем популяция Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество перфорины при стимуляции *in vitro* линией раковых клеток, чем популяция Т-клеток из

моноклеарных клеток периферической крови. В других вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество GM-CSF при стимуляции *in vitro* линией раковых клеток, чем популяция Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови. В других вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество TNF- $\alpha$  при стимуляции *in vitro* линией раковых клеток, чем популяция Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови. В других вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество IL-2 при стимуляции *in vitro* линией раковых клеток, чем популяция Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови. В других вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество гранзима В при стимуляции линией раковых клеток *in vitro*, чем популяция Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови.

[45] В некоторых вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток увеличивает выживаемость на модели рака *in vivo* по сравнению с популяцией Т-клеток из моноклеарных клеток периферической крови. В других вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток вызывает меньшую потерю веса тела на модели рака *in vivo*, чем популяция Т-клеток из моноклеарных клеток периферической крови. В других вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток вызывает снижение реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) на модели рака *in vivo* по сравнению с популяцией Т-клеток из моноклеарных клеток периферической крови.

[46] В других вариантах воплощения, указанная популяция моноклеарных Т-клеток периферической крови также экспрессирует указанный CAR. В других вариантах воплощения, указанный CAR вводили в указанную популяцию Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови путем трансфекции. В других вариантах воплощения, указанный CAR вводили в указанную популяцию Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови путем вирусной трансдукции. В других вариантах воплощения, указанный CAR вводили в указанную популяцию Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови путем вирусной трансдукции ретровирусным вектором. В других вариантах воплощения, указанный CAR вводили указанной популяции Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови путем вирусной трансдукции лентивирусным вектором. В других вариантах воплощения, указанный CAR, который был введен указанной популяции Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови, представляет собой такой же CAR, экспрессируемый указанной популяцией Т-клеток.

[47] В некоторых вариантах воплощения, указанная популяция Т-клеток содержит дополнительное генетическое изменение для снижения иммуногенности в отношении хозяина. В других вариантах воплощения, указанное генетическое изменение представляет собой нокаут гена. В других вариантах воплощения, указанный нокаут гена представляет собой нокаут Т-клеточного рецептора (TCR). В других вариантах воплощения, указанный нокаут гена представляет собой нокаут альфа-константы Т-клеточного рецептора (TRAC). В других вариантах воплощения, указанное

дополнительное генетическое изменение осуществляется путем трансфекции, ретровирусной трансдукции или лентивирусной трансдукции. В других вариантах воплощения, указанное дальнейшее генетическое изменение осуществляется с использованием технологий CRISPR, TALEN или «цинковые пальцы».

[48] Изобретение также относится к способу лечения рака или его симптома у пациента, нуждающегося в этом, причем способ включает стадию введения пациенту некоторого количества любой по изобретению популяции Т-клеток, эффективного для облегчения рака или его симптома у пациента. В некоторых вариантах воплощения, указанный рак представляет собой гематологический рак. В других вариантах воплощения, указанный гематологический рак представляет собой В-клеточный рак. В других вариантах воплощения, популяция Т-клеток является аллогенной по отношению к указанному пациенту.

[49] В контексте данного документа, термин «плацентарный перфузат» означает перфузионный раствор, который прошел по меньшей мере через часть плаценты, например, плаценты человека, например, через сосудистую сеть плаценты, и включает множество клеток, собранных перфузионным раствором, при прохождении через плаценту.

[50] В контексте данного документа, термин «клетки плацентарного перфузата» означает ядросодержащие клетки, например, общие ядросодержащие клетки, выделенные из плацентарного перфузата или выделяемые из него.

[51] В контексте данного документа, термины «подавление опухолевых клеток», «подавление пролиферации опухолевых клеток» и т.п. включают замедление роста популяции опухолевых клеток, например, путем уничтожения одной или более опухолевых клеток в указанной популяции опухолевых клеток, например, путем контактирования или переноса, например, Т-клеток или популяции Т-клеток, полученных с использованием трехэтапного способа, описанного в настоящем документе, для сближения с популяцией опухолевых клеток, например, путем контакта популяции опухолевых клеток с Т-клетками или популяцией Т-клеток, полученных с использованием описанного здесь трехэтапного способа. В некоторых вариантах воплощения, указанный контакт происходит *in vitro* или *ex vivo*. В других вариантах воплощения, указанный контакт происходит *in vivo*.

[52] В контексте данного документа, термин «кроветворные клетки» включает кроветворные стволовые клетки и кроветворные клетки-предшественники.

[53] В контексте данного документа, знак «+», при его использовании для обозначения присутствия конкретного клеточного маркера, означает, что клеточный маркер обнаруживается при сортировке активированных флуоресценцией клеток по сравнению с контролем изотипа; или обнаруживается выше фона при количественной или полуколичественной ПЦР в реальном времени.

[54] В контексте данного документа, знак «-», при его использовании для обозначения присутствия конкретного клеточного маркера, означает, что клеточный

маркер не обнаруживается при сортировке активированных флуоресценцией клеток по сравнению с контролем изотипа; или не обнаруживается выше фона при количественной или полуколичественной ПЦР в реальном времени.

[55] В контексте данного документа, термин «химерный антигенный рецептор» или, альтернативно, «CAR» относится к набору полипептидов, обычно к двум в простейших вариантах воплощения, которые при нахождении в иммунной эффекторной клетке придают клетке специфичность в отношении клетки-мишени, обычно раковой клетки, и генерируют внутриклеточный сигнал. В некоторых вариантах воплощения, CAR содержит по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен (также называемый здесь «внутриклеточный сигнальный домен»), содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы и/или костимулирующей молекулы, как определено ниже. В некоторых аспектах набор полипептидов примыкает друг к другу. В некоторых вариантах воплощения изобретения набор, полипептидов включает переключатель димеризации, который в присутствии молекулы димеризации может связывать полипептиды друг с другом, например, может связывать антигенсвязывающий домен с внутриклеточным сигнальным доменом. В одном аспекте стимулирующая молекула представляет собой дзета-цепь, связанную с рецепторным комплексом Т-клеток. В одном аспекте цитоплазматический сигнальный домен дополнительно содержит один или более функциональных сигнальных доменов, происходящих от по меньшей мере одной костимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR включает химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR включает химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR включает химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий два функциональных сигнальных домена, полученных из одной или более костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR включает химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий по меньшей мере два функциональных сигнальных домена, полученных из одной или более костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR содержит необязательную лидерную последовательность на амино-конце (N-ter) слитого белка CAR. В одном аспекте CAR дополнительно содержит лидерную последовательность на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена, где лидерная

последовательность необязательно отщепляется от антигенсвязывающего домена (например, scFv) во время клеточного процессинга и локализации CAR в клеточной мембране.

[56] CAR, который содержит антигенсвязывающий домен (например, scFv или TCR), нацеленный на специфический продуцент опухоли X, такой как описанный здесь, также называется XCAR. Например, CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, нацеленный на CD 19, называется CD19CAR.

[57] В контексте данного документа, термин «сигнальный домен» относится к функциональной части белка, который действует путем передачи информации внутри клетки с тем, чтобы регулировать клеточную активность через определенные сигнальные пути, генерируя вторичные мессенджеры или, отвечая на такие мессенджеры, функционируя в качестве эффекторов.

[58] В контексте данного документа, термин «антитело» относится к последовательности белка или полипептида, полученной из молекулы иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут быть поликлональными или моноклональными, много- или одноцепочечными или интактными иммуноглобулинами и могут быть получены из природных источников или из рекомбинантных источников. Антитела могут представлять собой тетрамеры молекул иммуноглобулинов.

[59] В контексте данного документа, термин «фрагмент антитела» относится по меньшей мере к одной части антитела, которая сохраняет способность специфически взаимодействовать (например, путем связывания, стерических препятствий, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) с эпитопом антигена. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, фрагменты Fv, фрагменты антител scFv, дисульфидно-связанные Fv (sdFv), фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1, линейные антитела, однодоменные антитела, такие как sdAb (VL или VH), домены VHH верблюда, мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител, таких как двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным блоком в шарнирной области, и изолированный CDR или другие связывающие эпитоп фрагменты антитела. Антигенсвязывающий фрагмент также может быть включен в однодоменные антитела, макситела, мини-тела, нанотела, интратела, диатела, триатела, тетратела, v-NAR и бис-scFv (см., например, Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23: 1126-1136, 2005). Антигенсвязывающие фрагменты также могут быть привиты к каркасам на основе полипептидов, таких как фибронектин типа III (Fn3) (см. Патент США № 6703199, в котором описаны минитела с полипептидами фибронектина).

[60] В контексте данного документа, «scFv» относится к слитому белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, где переменные области легкой и тяжелой цепей

связаны непрерывно, например, через синтетический линкер, например, короткий гибкий полипептидный линкер, и способны экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида, и при этом scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он получен. Если не указано иное, в контексте настоящего описания scFv может иметь переменные области VL и VH в любом порядке, например, относительно N-концевого и C-концевого концов полипептида, scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL.

[61] Часть CAR по изобретению, содержащая антитело или фрагмент его антитела, может существовать в различных формах, где антигенсвязывающий домен экспрессируется как часть непрерывной полипептидной цепи, включая, например, однодоменный фрагмент антитела (sdAb), одноцепочечное антитело (scFv), гуманизованное антитело или биспецифическое антитело (Harlow et al., 1999, In: *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426). В одном аспекте антигенсвязывающий домен композиции CAR по изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте CAR включает фрагмент антитела, содержащий scFv. Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR могут быть определены с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая схемы, описанные Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (система нумерации "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) *JMB* 273,927-948 (система нумерации "Chothia") или их комбинацию.

[62] В контексте данного документа, термин «связывающий домен» или «молекула антитела» относится к белку, например, цепи иммуноглобулина или ее фрагменту, содержащему по меньшей мере одну последовательность переменного домена иммуноглобулина. Термин «связывающий домен» или «молекула антитела» охватывает антитело и фрагменты антител. В одном из вариантов воплощения, молекула антитела представляет собой мультиспецифическую молекулу антитела, например, она содержит множество последовательностей переменного домена иммуноглобулина, причем первая последовательность переменного домена иммуноглобулина из множества имеет специфичность связывания для первого эпитопа, и вторая последовательность переменного домена иммуноглобулина из множества имеет специфичность связывания для второго эпитопа. В одном из вариантов воплощения, молекула мультиспецифического антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела. Биспецифические антитела обладают специфичностью не более чем к двум антигенам. Молекула биспецифического антитела характеризуется первой последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая имеет специфичность связывания для первого эпитопа, и второй последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая имеет специфичность связывания для второго эпитопа.

[63] В контексте данного документа, термин «тяжелая цепь антитела» относится к большему из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их естественных конформациях, и который обычно определяет класс, к которому принадлежит антитело.

[64] В контексте данного документа, термин «легкая цепь антитела» относится к меньшему из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их естественных конформациях. Легкие цепи каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ) относятся к двум основным изотипам легкой цепи антитела.

[65] В контексте данного документа, термин «рекомбинантное антитело» относится к антителу, которое генерируется с использованием технологии рекомбинантной ДНК, такому как, например, антитело, экспрессируемое системой экспрессии бактериофага или дрожжей. Термин также следует толковать как обозначение антитела, которое было образовано путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, и какая молекула ДНК экспрессирует белок антитела или аминокислотную последовательность, определяющую антитело, где ДНК или аминокислотная последовательность были получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК или аминокислотных последовательностей, доступных и хорошо известных в данной области техники.

[66] В контексте данного документа, термин «антиген» или «Ag» относится к молекуле, которая вызывает иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать либо продукцию антител, либо активацию специфических иммунологически компетентных клеток, либо и то, и другое. Квалифицированный специалист поймет, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить антигеном. Кроме того, антигены могут происходить из рекомбинантной или геномной ДНК. Квалифицированный специалист поймет, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидные последовательности или частичную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, поэтому кодирует «антиген», как этот термин используется в данном документе. Кроме того, специалист в данной области техники поймет, что антиген не обязательно должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Совершенно очевидно, что настоящее изобретение включает, но не ограничивается этим, использование частичных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена и что эти нуклеотидные последовательности расположены в различных комбинациях для кодирования полипептидов, которые вызывают желаемый иммунный ответ. Более того, квалифицированный специалист поймет, что антиген вовсе не обязательно должен кодироваться «геном». Совершенно очевидно, что антиген может быть получен путем синтеза или может быть получен из биологического образца, или может быть макромолекулой помимо полипептида. Такой биологический образец может включать, помимо прочего, образец ткани, образец опухоли, клетку или жидкость с другими биологическими компонентами.

[67] В контексте данного документа, «внутриклеточный сигнальный домен»

относится к внутриклеточной части молекулы. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который способствует иммунной эффекторной функции клетки, содержащей CAR, например клетки CART. Примеры иммунной эффекторной функции, например, в клетке CART, включают цитолитическую активность и хелперную активность, включая секрецию цитокинов.

[68] В одном из вариантов воплощения, внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен. Примеры первичных внутриклеточных сигнальных доменов включают те, которые происходят из молекул, ответственных за первичную стимуляцию или антигензависимое стимулирование. В одном из вариантов воплощения, внутриклеточный сигнальный домен может включать костимулирующий внутриклеточный домен. Примеры костимулирующих внутриклеточных сигнальных доменов включают те, которые происходят из молекул, ответственных за костимулирующие сигналы или антигеннезависимую стимуляцию. Например, в случае CART первичный внутриклеточный сигнальный домен может включать цитоплазматическую последовательность Т-клеточного рецептора, а костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может включать цитоплазматическую последовательность корцептора или костимулирующей молекулы.

[69] Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать сигнальный мотив, известный как иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина или ITAM. Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают, но не ограничиваются ими, последовательности, полученные из дзета CD3, общего FcR гамма (FCER1G), Fc гамма R1a, FcR бета (Fc Epsilon Rib), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD79a, CD79b, DAP 10 и DAP 12.

[70] В контексте данного документа, термины «дзета» или альтернативно «дзета-цепь», «CD3-дзета» или «TCR-дзета» устанавливаются как белок, представленный как GenBank Acc. No. BAG36664.1, или как эквивалентные остатки из не относящихся к человеку видов, например, мышей, грызунов, обезьян, человекообразных обезьян и т.п., и «дзета-стимулирующий домен» или, альтернативно, «стимулирующий домен CD3-дзета» или «стимулирующий домен TCR-дзета» определяется как аминокислотные остатки из цитоплазматического домена дзета-цепи или их функциональные производные, которые достаточны для функциональной передачи начального сигнала, необходимого для активации Т-клеток. В одном аспекте цитоплазматический домен дзета содержит остатки с 52 по 164 GenBank Acc. No. BAG36664.1 или эквивалентные остатки из не относящихся к человеку видов, например, мышей, грызунов, обезьян, человекообразных обезьян и т.п., которые являются их функциональными ортологами. В одном аспекте «дзета-стимулирующий домен» или «стимулирующий домен CD3-дзета» представляет собой последовательность, представленную как SEQ ID NO: 18. В одном аспекте «дзета-стимулирующий домен» или «стимулирующий дзета-домен CD3» представляет собой последовательность, представленную как SEQ ID NO: 20.

[71] В контексте данного документа, термин «костимулирующая молекула»

относится к родственному партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, тем самым опосредуя костимулирующий ответ Т-клетки, такой как, но не ограничиваясь этим, пролиферация. Костимулирующие молекулы - это молекулы клеточной поверхности, отличные от рецепторов антигенов или их лигандов, которые способствуют эффективному иммунному ответу. Костимулирующие молекулы включают, но не ограничиваются ими, молекулу MHC класса I, BTLA и рецептор лиганда Toll, а также OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137). Дополнительные примеры таких костимулирующих молекул включают CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8альфа, CD8бета, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганд, который специфически связывается с CD83.

[72] Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может быть внутриклеточной частью костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула может быть представлена в следующих семействах белков: рецепторные белки TNF, иммуноглобулиноподобные белки, цитокиновые рецепторы, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-клеток. Примеры таких молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, ICAM-1, антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CDS, CD7, CD287, LIGHT, NKG2C, NKG2D, SLAMF7, NKp80, NKp30, NKp44, NKp46, CD160, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т.п.

[73] Внутриклеточный сигнальный домен может включать всю внутриклеточную часть или весь нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой он получен, или его функциональный фрагмент или производное.

[74] В контексте данного документа, термин «4-1BB» относится к члену суперсемейства TNFR с аминокислотной последовательностью, представленной как GenBank Acc. No. AAA62478.2, или как эквивалентные остатки из не относящихся к человеку видов, например, мышей, грызунов, обезьян, человекообразных обезьян и т.п.; и «костимулирующий домен 4-1BB» определяется как аминокислотные остатки 214-255 GenBank Acc. No. AAA62478.2, или эквивалентные остатки от не относящихся к человеку видов, например, мышей, грызунов, обезьян, человекообразных обезьян и т.п. В одном аспекте «костимулирующий домен 4-1BB» представляет собой последовательность, представленную как SEQ ID NO: 14 или эквивалентные остатки от вида, отличного от

человека, например, мышей, грызунов, обезьян, человекообразных обезьян и т.п.

[75] В контексте данного документа, термин «эффекторная иммунная клетка» относится к клетке, которая участвует в иммунном ответе, например, в стимулировании иммунного эффекторного ответа. Примеры иммунных эффекторных клеток включают Т-клетки, например, альфа/бета-Т-клетки и гамма/дельта-Т-клетки, В-клетки, естественные киллерные (NK) клетки, естественные киллерные Т (NKT) -клетки, тучные клетки и фагоциты миелоидного происхождения.

[76] В контексте данного документа, термин «иммунная эффекторная функция или иммунный эффекторный ответ» относится к функции или ответу, например, иммунной эффекторной клетки, которая усиливает или способствует иммунной атаке клетки-мишени. Например, иммунная эффекторная функция или ответ относится к свойству Т-или NK-клетки, которое способствует уничтожению или ингибированию роста или пролиферации клетки-мишени. В случае Т-клетки, первичная стимуляция и костимуляция являются примерами иммунной эффекторной функции или ответа.

[77] В контексте данного документа, термин «противораковый эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, включая, но не ограничиваясь этим, например, уменьшение объема опухоли, уменьшение количества раковых клеток, уменьшение количества метастазов, увеличение продолжительности жизни, уменьшение пролиферации раковых клеток, уменьшение выживаемости раковых клеток или улучшение различных физиологических симптомов, связанных с раком. «Противораковый эффект» может также проявляться в способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител в первую очередь предотвращать возникновение рака. Термин «противоопухолевый эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, включая, но не ограничиваясь этим, например, уменьшение объема опухоли, уменьшение количества опухолевых клеток, уменьшение пролиферации опухолевых клеток или снижение выживаемости опухолевых клеток.

[78] В контексте данного документа, термин «аутологичный» относится к любому материалу, полученному от того же человека, которому он позже будет повторно введен.

[79] В контексте данного документа, термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному от другого животного того же вида, что и индивидуум, которому этот материал вводится. Говорят, что два или более индивидуума аллогенны друг другу, если гены в одном или более локусах не идентичны. В некоторых аспектах аллогенный материал от особей одного и того же вида может быть достаточно генетически непохожим, чтобы взаимодействовать антигенно.

[80] Способы добавления/модификации генов хорошо известны в данной области техники и применимы к настоящему изобретению. Например, способы доставки CAR или нокаута гена можно осуществлять способами стабильной или временной трансфекции или с помощью лентивирусной или ретровирусной трансдукции. Модификация генов может осуществляться с помощью тех или иных способов, например, с использованием CRISPR,

TALLEN или других подобных технологий.

### **ПРИМЕРЫ**

Пример 1: Исходный материал. Отделение мононуклеарных клеток и выделение Т-клеток

[81] Исходный материал Плацентарную кровь (которая включает как человеческую пуповинную кровь (Umbilical Cord Blood - UCB) так и/или человеческий перфузат плаценты (HPP)) собирают при условии Информированного согласия через LifebankUSA. После сбора исходные материалы обогащаются мононуклеарными клетками (MNC) с использованием седиментации Hetastarch RBC или разделения клеток в градиенте плотности Ficoll-Paque. Затем MNC подвергаются процессу позитивной селекции для истощения CD25+ Т-регуляторных Т-клеток (Treg) с последующей позитивной селекцией на CD4+ и CD8+ Т-клетки с использованием наборов гранул для разделения клеток Miltenyi bead. Перед замораживанием клеток аликвоты изолированных Т-клеток берут для серологического исследования и тестирования на стерильность, а также для фенотипического анализа.

[82] Фенотип изолированных Р-Т-клеток отличается от мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Р-Т-клетки содержат более 78% CD3+ CD56- Т-клеток и состоят в основном из CD3+ CD45RA+ CCR7+ CD27+ наивных Т-клеток с низкими частотами CD3+ CD45RA- CCR7+ CD27+ Т-клеток центральной памяти и CD3+ CD45RA- CCR7- CD27+ Т-клеток эффекторной памяти. Истощение CD25 значительно снижает частоту CD3+ CD4+ CD25+ CD 127- Treg в Р-Т клетках до уровня ниже 0,5%.

[83] Дополнительный исходный материал должен включать, еще до тестирования, гематопозитические стволовые клетки CD34/Т-клетки плаценты, полученные из предшественников. Процесс размножения и дифференцировки предшественников в Т-клетки может занять 50-60 дней. Важно отметить, что в популяциях, показанных ниже с текущими протоколами, присутствуют значительные популяции клеток CD4+/CD8+, однако полностью дифференцированные одиночные положительные Т-клетки могут быть легко отобраны/получены путем обогащения.

[84] Оценка Т-клеток, полученных из перфузата плаценты, завершена, однако процедура выделения должна быть оптимизирована, поскольку текущая процедура дает низкое количество клеток, низкую жизнеспособность и чистоту Т-клеток.

### **Пример 2: Активация и размножение Т-клеток**

Немодифицированные Р-Т клетки:

[85] Выделенные Р-Т клетки оттаивают, подвергают истощению CD25 с использованием гранул Miltenyi anti-CD25 для удаления CD4+ CD25+ CD127- Treg (могут быть включены до этапа выделения Т-клеток) и активируют с помощью анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (соотношение гранулы: клетки 1: 1) от Invitrogen или с использованием наночастиц Transact анти-CD3/анти-CD28 (объемное разведение 1: 100) от Miltenyi. Затем клетки размножают, используя 100 МЕ/мл IL-2, 10 нг/мл IL-7+ 10 нг/мл IL-15 или 100 МЕ/мл IL-2+ 10 нг/мл IL-7. Дополнительные повторные стимуляции завершаются на 12-

14 день, и клетки размножаются до 21 дня в сосудах Grex для максимального размножения.

[86] Количество немодифицированных Р-Т клеток может быть увеличено до 600 раз при начальной стимуляции и до 3600 раз при повторной стимуляции (ПС) на 14-й день при культивировании до 20-го дня.

[87] В различных условиях культивирования немодифицированные 20-дневные размноженные Р-Т клетки проявляли более ранний фенотип дифференцировки по сравнению с некультивированными РВМС после оттаивания (ПО) и фенотип состоял в основном из CD3<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> наивных Т-клеток и CD3<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup> Т-клеток центральной памяти, тогда как некультивированные после оттаивания РВМС состояли в основном из более дифференцированных CD3<sup>+</sup> CD45RA<sup>-/+</sup> CD62L<sup>-</sup> эффекторных Т-клеток памяти и терминальных эффекторных Т-клеток. Учитывая статус ранней дифференцировки Р-Т клеток, следует обеспечить дополнительные циклы стимуляции и значительно увеличить кратность размножения с тем, чтобы поддержать пригодную к применению выработку аллогенных CAR-Т клеток, полученных из плаценты, при сохранении сбалансированного сочетания Т-клеток центральной памяти, которые будут сохраняться в организме пациента, и эффекторных Т-клеток, которые немедленно атакуют и убивают опухолевые клетки.

CAR-модифицированные Р-Т клетки:

[88] Выделенные Т-клетки (которые подверглись истощению CD25 перед замораживанием) были разморожены и активированы с использованием наночастиц Transact анти-CD3/анти-CD28 (объемное разведение 1: 100) от Miltenyi. Затем клетки размножали в сосудах Grex с использованием 100 МЕ/мл IL-2. На 3-й день клетки трансдуцировали либо лентивирусом CD 19 CAR (LV), либо ретровирусом (RV) на планшетах, покрытых ретронектином, с использованием способа предварительной вирусной стимуляции. Затем клетки культивировали до 15-го дня, меняя среду каждые 2-3 дня.

[89] CD19 CAR модифицированные Р-Т клетки могут быть размножены в 237-336 раз после 15 дней культивирования без повторной стимуляции.

[90] Через пятнадцать дней культивирования Р-Т клетки, модифицированные CD19 CAR, проявляли особый фенотип дифференцировки Т-клеток по сравнению с Т-клетками CD 19 CAR, полученными из РВМС. Р-Т клетки состояли из хорошей смеси CD3<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> наивных клеток/стволовых Т-клеток памяти и CD3<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> эффекторных Т-клеток, в то время как полученные из РВМС Т-клетки CD 19 CAR состояли в основном из CD3<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> эффекторных Т-клеток памяти и CD3<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> эффекторных Т-клеток. Клетки Р-Т NT (не трансдуцированные) и Р-Т CD 19 CAR RV состояли из большего количества Т-наивных/scm Т-клеток по сравнению с клетками Р-Т CD19 CAR LV.

[91] Кроме того, полученные из РВМС эффекторные Т-клетки памяти (T<sub>em</sub>) и эффекторные Т-клетки (T<sub>eff</sub>) экспрессировали значительно более высокие уровни

маркера истощения CD57, в то время как экспрессия P-T клеток была низкой.

[92] Более высокая частота и сочетание эффекторных Т-клеток и наивных/стволовых Т-клеток памяти в P-T клетках, наряду с низкой экспрессией CD57, представляет собой продукт CAR-T, который может эффективно нацеливаться и убивать опухолевые клетки, сохраняя при этом способность к самообновлению и пополнению с течением времени своих, более дифференцированных субпопуляций Т-клеток.

[93] В целом, на 15-й день P-T NT и P-CD19 CAR Т-клетки экспрессировали высокие уровни CD45RA, CD27, CCR7, CD127 и CD28, а также низкие уровни маркера истощения CD57 и маркеров иммунных контрольных точек (негативных регуляторов иммунных ответов) PD-1, Lag-3 и Tim-3.

[94] Эффективность трансдукции CD 19 CAR измеряли путем инкубации клеток с реагентом CD 19 Fc-Fitc и количественного определения процентного содержания клеток CD 19 CAR+ с помощью проточной цитометрии. К 15 дню клетки P-T экспрессировали CD 19 CAR при трансдукции всеми Ms scFv LV или RV (от Vector Builder, SignaGen или Sorrento) и экспрессировали CD19 CAR при трансдукции последовательностями Hu scFv JK2 и JL, все состоящие из костимулирующего домена 4-1BB. P-T клетки не экспрессировали CD 19 CAR при трансдукции последовательностью Hu scFv JK1, содержащей костимулирующий домен CD28. Оптимальные MOI (множественность инфекции)/концентрации для каждого CD 19 CAR были определены следующим образом: MOI 50 для Vector Builder Ms scFv CD19 CAR LV, MOI 100 для SignaGen Ms scFv CD 19 CAR LV, MOI 200 для SignaGen Hu scFv CD 19 CAR LV и 2,5X для Sorrento Ms scFv CD19 CAR RV (расчетный титр неизвестен).

[95] На день 15 P-CD19 CAR Т-клетки проявляли высокую жизнеспособность и чистоту CD3+ CD56- Т-клеток, независимо от вирусного вектора, используемого для трансдукции. P-T клетки, трансдуцированные с помощью Vector Builder Ms scFv CD 19 CAR LV, приводили к значительно большему количеству CD4+ Т-клеток по сравнению с такой же последовательностью Ms scFv CD 19 CAR LV, продуцируемой SignaGen. P-T клетки, трансдуцированные Ms scFv CD19 CAR Sorrento, давали наибольшую частоту CD8+ Т-клеток и сбалансированное сочетание CD4+ и CD8+ Т-клеток.

[96] При использовании оптимизированных MOI/концентраций для каждого типа вируса CD19 CAR, экспрессия CD19 CAR находилась в диапазоне 22-70% на 15-й день культивирования P-T клеток. Vector Builder Ms scFv CD19 CAR LV привел к тому, что большая часть его экспрессии CD 19 CAR была экспрессирована на CD4+ Т-клетках, тогда как Ms scFv CD19 CAR RV Sorrento приводил к равному сочетанию экспрессии CD19 CAR на CD4+ и CD8+ Т-клетках и наибольшей общей частоте экспрессии CD 19 CAR на CD8+ Т-клетках.

### Пример 3: Активность CD 19 CAR и CD20 CAR in vitro

Цитолитическая активность на день 15 P-CD19 CAR Т-клеток в отношении линий раковых клеток

[97] Активированные UCB-T клетки трансдуцировали CD 19 CAR ретровирусом

или лентивирусом на 2-4 день культивирования UCB-T клеток с использованием центрифужной инокуляции. Экспрессию CAR выявляли с использованием либо меченного FITC рекомбинантного слитого белка CD19-Fc, либо антитела против Мус PE, в случае, если вектор CAR содержал метку Мус. Активность UCB-CAR-T оценивали с помощью следующих двух анализов.

[98] Трансдуцированные CD 19 CAR UCB-T клетки специфически убивают мишени рака Daudi CD 19+ на уровнях, сравнимых с уровнями PBMC CD19 CAR T-клеток, но не убивают клетки CD19- K562.

[99] Трансдуцированные CD20 CAR UCB-T клетки специфически убивают мишени рака Daudi CD20+ на уровнях, сравнимых с PBMC CD20 CAR T-клеток, но не убивают клетки CD20-Molp8.

[100] Трансдуцированные CD19 CAR UCB-T клетки специфически секретируют провоспалительные цитокины IFN-g и GM-CSF и цитолитический эффекторный белок перфорин в ответ на мишени рака Daudi CD 19+, но не в ответ на клетки CD19-K562.

[101] Функциональная активность *in vitro* P-CD19 CAR T-клеток также оценивалась по сравнению с клеточными линиями CD19+ лимфомы Беркитта (Daudi) и CD19+ острого лимфобластного лейкоза (Nalm6) в анализе цитотоксичности на основе 4-часовой проточной цитометрии и кинетического анализа цитотоксичности ACEA. В качестве отрицательного контроля для оценки неспецифического уничтожения в обоих анализах были включены клетки CD19-K562.

[102] Как в анализах 4-часовой проточной цитометрии, так и в анализе кинетической цитотоксичности ACEA, P-CD19 CAR T-клетки специфически убивали клетки CD19+ Daudi и Nalm6, но не убивали клетки CD19-K562. В 4-часовом анализе цитотоксичности активность P-CD19 CAR по сравнению с мишенями Nalm6 была сопоставима с активностью PBMC CD 19 CAR T-клеток, тогда как в анализе кинетической цитотоксичности ACEA активность P-CD19 CAR T-клеток для мишеней Daudi и Nalm6 была сопоставима с активностью CD 19 CAR T-клеток из PBMC.

[103] Кроме того, функциональную активность *in vitro* T-клеток P-CD19 CAR оценивали по сравнению с линиями клеток лимфомы Беркита CD 19+ (Daudi) и CD 19+ острого лимфобластного лейкоза (Nalm6) в анализе высвобождения цитокинов. Клетки P-CD19 CAR-T совместно культивировали с мишенями CD19+ при соотношении эффектор : мишень 1: 1 в течение 24 часов, супернатанты клеточных культур собирали и анализировали на предмет секреции различных цитокинов и эффекторных белков. Трех доноров P-T клеток, трансдуцированных CD 19 CAR RV, оценивали/сравнивали с T-клетками CD 19 CAR RV, полученными из PBMC.

[104] Кроме того, P-CD19 CAR T-клетки секретировали провоспалительные цитокины и эффекторные белки (GM-CSF, перфорин, TNF-а, IFN-g, IL2, гранзим В и гранзим А) антиген-специфическим образом при совместном культивировании с мишенями CD19+ Daudi и Nalm6. Против мишеней CD 19+ Daudi и Nalm6 P-CD19 CAR T-клетки секретировали более высокие концентрации GM-CSF, перфорины, TNF-а, гранзима

В и особенно IL2 по сравнению с их аналогами, полученными из PBMC. Значительно более высокая секреция IL2 свидетельствует о менее дифференцированной, более похожей на стволовую, популяции и может способствовать большему размножению Т-клеток, усилению функции Т-клеток и выживанию.

Пример 4: Активность P-CD19 CAR-T in vivo

[105] In vivo противоопухолевую активность Т-клеток P-CD19 CAR оценивали с использованием модели ксенотрансплантата диссеминированной лимфомы у мышей NSG. Экспрессирующие люциферазу клетки Daudi ( $3 \times 10^6$ ) вводили внутривенно (BV) в день 0 с последующей внутривенной инъекцией Т-клеток P-CD19 CAR. P-T клетки вводили в соответствии с частотами CD8+ CD19 CAR+, указанными в таблице 1 (P-T: RV: одна доза  $14 \times 10^6$  на 7 день; LV: одна доза  $20 \times 10^6$  на 7 сутки или три дозы  $20 \times 10^6$  на 7, 10 и 14 сутки). В качестве основных конечных точек исследования использовались биолюминесцентная визуализация (BLI) и выживаемость.

Группа	Обработка	Кол-во животных	Схема дозирования	Доза Т-клеток	% Предварительно замороженных CD19 CAR+ CD8+ (из CD3+)	Доза клеток CD19 CAR+ CD8+	Способ введения
1	Носитель (PBS)	5	День 7	Н/Д	Н/Д	Н/Д	<b>BV</b>
2	PBMC	5	День 7	7MM	30,59%	2,14MM	
3	CD 19-CAR RV	5	День 7	2MM	30,59%	0,612 MM	
4	P-T CD 19- CAR RV	5	День 7	14MM	15,01%	2,1MM	
5	P-T CD 19- CAR LV-TRAC KO	5	День 7	20MM	3,11%	0,622 MM	
6	P-T CD 19- CAR LV (многодозовая)	5	День 7, 10, 14	20MM	3,50%	3 x 0,7MM= 2,1 MM	

[106] В этой мышинной модели P-CD19 CAR Т-клетки были хорошо переносимы и безопасны, даже при трех дозах  $20 \times 10^6$  Т-клеток, не модифицированных TRAC. Все P-CD19 CAR Т-клетки значительно снижали опухолевую нагрузку и улучшали выживаемость. Через четыре недели после лечения в группе носителя уровень смертности составил 100%, в то время как все животные из группы, обработанной P-CD19 CAR Т (N=5), остались живы без клинических симптомов, включая потерю веса. Группы, обработанные P-CD19 CAR LV, а также группа, обработанная PBMC CD 19 CAR (7MM) справились с опухолевой нагрузкой. Многократное введение (3X) клеток P-CD19 CAR LV

продемонстрировало улучшение по сравнению с однократной дозой и показало немного лучшее лечение опухоли и выживаемость по сравнению с группой, получавшей 7ММ CD 19-CAR RV из PBMC (обе дозировки в сумме составляли 2,1ММ CD19- CAR+ CD8+ Т-клеток). Следует отметить, что однократная доза клеток P-CD19 CAR LV (0,6ММ Т-клеток CD19- CAR+ CD8+) уменьшала опухолевую нагрузку и улучшала выживаемость лучше, чем группа, обработанная 2 ММ CD19 CAR RV из PBMC (также 0,6ММ Т-клеток CD19- CAR+ CD8+). Примечательно, что мыши, обработанные P-CD19 CAR RV, превосходили все группы лечения и уничтожили опухолевые клетки со 100% выживаемостью до 109 дня. Менее дифференцированный фенотип Т-клеток, наряду с присутствием как наивных/scm Т-клеток, так и эффекторных Т-клеток, хорошее сочетание CD4+ и CD8+ Т-клеток, большая экспрессия CD8+ CD19 CAR+ и большая секреция цитокинов (особенно IL-2 для поддержки функции/выживания Т-клеток), все описанные здесь, предположительно, в совокупности способствуют большей эффективности и увеличению выживаемости, наблюдаемых *in vivo* с Т-клетками P-CD19 CAR, особенно с Т-клетками P-CD19 CAR RV.

[107] Выжившим мышам из группы, получавшей P-CD19 CAR RV, затем повторно вводили дополнительные опухолевые клетки Daudi. На 122-й день экспрессирующие люциферазу клетки Daudi ( $3 \times 10^6$ ) были внутривенно (BV) введены выжившим мышам, обработанным P-CD19 CAR RV, а также сопоставимым по возрасту (6-месячным) наивным мышам NSG, как новой группе контроля носителя.

[108] Это исследование все еще продолжается, но на 151-й день (через 28 дней после повторного введения опухолевых клеток) мы наблюдали значительно более низкий BLI (масса опухоли) и отсутствие клинических симптомов (потеря веса) в группе повторного введения P-CD19 CAR RV, в то время как мы обнаружили увеличение BLI и потерю веса в группе контроля носителя. Мы будем продолжать контролировать BLI, массу тела и выживаемость и, как ожидается, эти показатели будут оставаться улучшенными.

#### Пример 5: Нокаут Т-клеточного рецептора (TRAC) в клетках UCB-T

[109] TRAC был мишенью с использованием гидовой РНК (гРНК) против первого экзона локуса TRAC. Химически модифицированные формы РНК Cas9 и гРНК трансфицировали в Р-Т клетки на 6-8 день культивирования Р-Т с помощью Nucleofection (Lonza). Эффективность модификации генов контролировали с помощью проточной цитометрии с использованием антитела против TCR $\alpha$  или CD3.

[110] В трех отдельных экспериментах эффективность нокаута TRAC измеряли через 3 дня после трансфекции. Дата на оси абсцисс указывает время трансфекции. Более 90% нокаута гена TRAC были достигнуты независимо от способа активации Р-Т и условий культивирования (Dynabeads с IL2 или Transact с IL7 и IL15). В. Процесс CRISPR минимально повлиял на пролиферацию и жизнеспособность клеток. Значительное изменение пролиферации и жизнеспособности клеток среди разных групп отсутствует.

[111] Кроме того, когда клетки Р-Т трансдуцировали CD19 CAR LV или RV на 3-й

день с последующей трансфекцией и TRAC KO с использованием CRISPR на 6-й день, на 15-й день клетки P-T NT-TRAC KO и P-CD19 CAR-TRAC KO проявляли более 97% эффективности TRAC KO.

[112] Кроме того, TRAC KO не привел к каким-либо значительным изменениям в экспрессии CD 19 CAR или цитолитической активности *in vitro* по сравнению с мишенями CD19+ Daudi и Nalm6 в P-T клетках.

Пример 6: Аллореактивность клеток UBC-T, измеренная в анализах *in vitro*

[113] Для измерения аллореактивности РМВС против P-T-клеток или P-T клеток против РВМС использовали два независимых анализа. В первом из них аллореактивность измерялась как киллерная активность клеток от одного донора в отношении клеток другого донора при 4-часовом совместном культивировании. Клетки-мишени метили РКН26, и цитотоксичность выражали как процент мертвых клеток-мишеней по отношению к общему количеству клеток-мишеней. Во втором случае аллореактивность измерялась как преимущественная пролиферация Т-клеток одного донора при совместном культивировании с клетками другого донора. Клетки от двух доноров метят разными красителями (CFSE и РКН26) и совместно культивируют в соотношении 1:1 в течение 4 дней. Разбавление красителя указывает на пролиферацию клеток и может выражаться как уменьшение процента клеток с высокой интенсивностью или изменение средней интенсивности флуоресценции.

[114] В двух отдельных экспериментах РВМС или Т-клетки, полученные из РВМС, культивировали совместно с P-T клетками. РВМС от одного донора уничтожали РВМС от другого донора с высокой эффективностью. Но РВМС не уничтожали P-T клетки (CBT). В отдельном эксперименте Т-клетки, полученные из РМВС (РВТ), уничтожали линию раковых клеток RPMI8226 (RPMI) с высокой эффективностью. Но у них была минимальная активность в уничтожении P-T клеток (CBT). P-T клетки также не уничтожали Т-клетки, полученные из РВМС.

[115] P-T клетки и контрольные РВМС метили РКН26, а РВМС метили CFSE. РВМС, меченные CFSE, P-T (CBT), меченные РНК26, и смешанная культура РВМС, меченных CFSE или РКН26, служили контролями. Процент клеток РКН26-hi P-T (CBT) ниже по сравнению с культурой одних только P-T клеток, что свидетельствует о преимущественной пролиферации P-T клеток при совместном культивировании с РВМС.

[116] В соответствии с этим результатом, MFI (среднекратный прирост) P-T клеток также снизился при совместном культивировании с РВМС по сравнению только с P-T-клетками и РВМС с контролем РВМС, что указывает на лучшую пролиферацию. Напротив, MFI РВМС в совместном культивировании увеличивался по сравнению только с РВМС или РВМС с культивированием РВМС.

Пример 7: Аллореактивность P-T клеток в моделях на животных

[117] Аллореактивность (ксено-аллореактивность) немодифицированных, размноженных за 21 день P-T клеток тестировали на мышинной модели РТПХ у NCG. В этой модели РВМС вызывает РТПХ, которую можно измерить как потерю веса. 30

миллионов истощенных по CD25 P-T клеток от трех доноров и контрольные РМВС вводили мышам NCG внутривенным путем. Вес животных контролировали с течением времени.

[118] Изменение массы тела животных выражали в процентах от массы тела в день инъекции клеток. Каждая линия представляет одну мышь. Все пять животных в группе РМВС потеряли вес в течение 28 дней и были умерщвлены. Ни у одного из участников группы P-T не наблюдалось значительной потери веса и не индуцировалось ксено-РТПХ. P-T клетки были истощены по CD25 перед размножением для удаления Treg, поэтому отсутствие РТПХ не было связано с иммунорегуляторными Т-клетками CD4+ CD25+ CD127- FoxP3+. В настоящее время проводятся дополнительные исследования РТПХ для оценки аллореактивности Т-клеток P-CD19 CAR-T и P-CD19 CAR-TRAC KO.

[119] Объем настоящего изобретения не ограничивается описанными здесь конкретными вариантами воплощения. В действительности, различные модификации изобретения в дополнение к описанным станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих фигур. Предполагается, что такие модификации попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

[120] Все ссылки, процитированные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки во всей полноте для всех целей. Цитирование любой публикации предназначено для ее раскрытия до даты подачи и не должно толковаться как признание того, что настоящее изобретение не имеет права датировать такую публикацию задним числом на основании предшествующего изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Популяция Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), в которой указанные Т-клетки являются плацентарными Т-клетками.
2. Популяция Т-клеток по п.1, отличающаяся тем, что указанные плацентарные Т-клетки представляют собой Т-клетки пуповинной крови, Т-клетки перфузата плаценты или их смесь.
3. Популяция Т-клеток по п.1, отличающаяся тем, что указанные плацентарные Т-клетки представляют собой Т-клетки пуповинной крови.
4. Популяция Т-клеток по п. 1, отличающаяся тем, что указанные плацентарные Т-клетки представляют собой смесь Т-клеток пуповинной крови и Т-клеток плацентарного перфузата.
5. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-4, отличающаяся тем, что указанный CAR был введен в клетку посредством трансфекции.
6. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-4, отличающаяся тем, что указанный CAR был введен в клетку путем вирусной трансдукции.
7. Популяция Т-клеток по п.6, отличающаяся тем, что указанный CAR был введен в клетку путем вирусной трансдукции ретровирусным вектором.
8. Популяция Т-клеток по п.6, отличающаяся тем, что указанный CAR был введен в клетку путем вирусной трансдукции лентивирусным вектором.
9. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-8, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CD45RA, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.
10. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-9, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CD27, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.
11. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-10, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CCR7, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.
12. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-11, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CD 127, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.
13. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-12, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет более низкий процент клеток, экспрессирующих CD57, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.
14. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-13, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CD62L, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.
15. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-14, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет более низкий процент клеток, экспрессирующих CD25, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

16. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-15, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих Lag-3+, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

17. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-16, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет более низкий процент клеток, экспрессирующих Tim-3, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

18. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-17, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток демонстрирует более сильное уничтожение линии раковых клеток *in vitro*, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

19. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-18, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество перфорина при провокации *in vitro* в отношении линии раковых клеток, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

20. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-19, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество GM-CSF при провокации *in vitro* в отношении линии раковых клеток, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

21. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-20, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество TNF-а при провокации *in vitro* в отношении линии раковых клеток, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

22. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-21, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество IL-2 при провокации *in vitro* в отношении линии раковых клеток, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

23. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-22, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество гранзима В при провокации *in vitro* в отношении линии раковых клеток, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

24. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-23, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток обеспечивает повышенную выживаемость на модели рака *in vivo*, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

25. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-24, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток вызывает меньшую потерю веса тела на модели рака *in vivo*, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

26. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-25, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток вызывает меньшую реакцию трансплантата против хозяина (РТПХ) на модели рака *in vivo*, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

27. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 9-26, отличающаяся тем, что указанная

популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови также экспрессирует указанный CAR.

28. Популяция Т-клеток по п. 27, отличающаяся тем, что указанный CAR был введен в указанную популяцию Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови путем трансфекции.

29. Популяция Т-клеток по п. 27, отличающаяся тем, что указанный CAR был введен в указанную популяцию Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови посредством вирусной трансдукции.

30. Популяция Т-клеток по п.29, отличающаяся тем, что указанный CAR был введен в указанную популяцию Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови путем вирусной трансдукции ретровирусным вектором.

31. Популяция Т-клеток по п.29, отличающаяся тем, что указанный CAR был введен в указанную популяцию Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови посредством вирусной трансдукции лентивирусным вектором.

32. Популяция Т-клеток по любому из п.п.1-31, отличающаяся тем, что указанный CAR, который был введен указанной популяции Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови, представляет собой такой же CAR, экспрессируемый указанной популяцией Т-клеток.

33. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 1-32, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток включает дополнительное генетическое изменение для снижения иммуногенности в отношении хозяина.

34. Популяция Т-клеток по п. 33, отличающаяся тем, что указанное генетическое изменение представляет собой нокаут гена.

35. Популяция Т-клеток по п.34, отличающаяся тем, что указанный нокаут гена представляет собой нокаут по рецептору Т-клеток (TCR).

36. Популяция Т-клеток по п.34, отличающаяся тем, что указанный нокаут гена представляет собой нокаут альфа-константы Т-клеточного рецептора (TRAC).

37. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 33-36, отличающаяся тем, что указанное дополнительное генетическое изменение осуществляется путем трансфекции, ретровирусной трансдукции или лентивирусной трансдукции.

38. Популяция Т-клеток по любому из п.п. 33-36, отличающаяся тем, что указанное дополнительное генетическое изменение осуществляется с использованием технологий CRISPR, TALEN или «цинковые пальцы».

39. Способ лечения рака или его симптома у пациента, нуждающегося в этом, способ включает стадию введения пациенту количества популяции Т-клеток по любому из п.п. 1-38, эффективных для облегчения рака или его симптома у пациента.

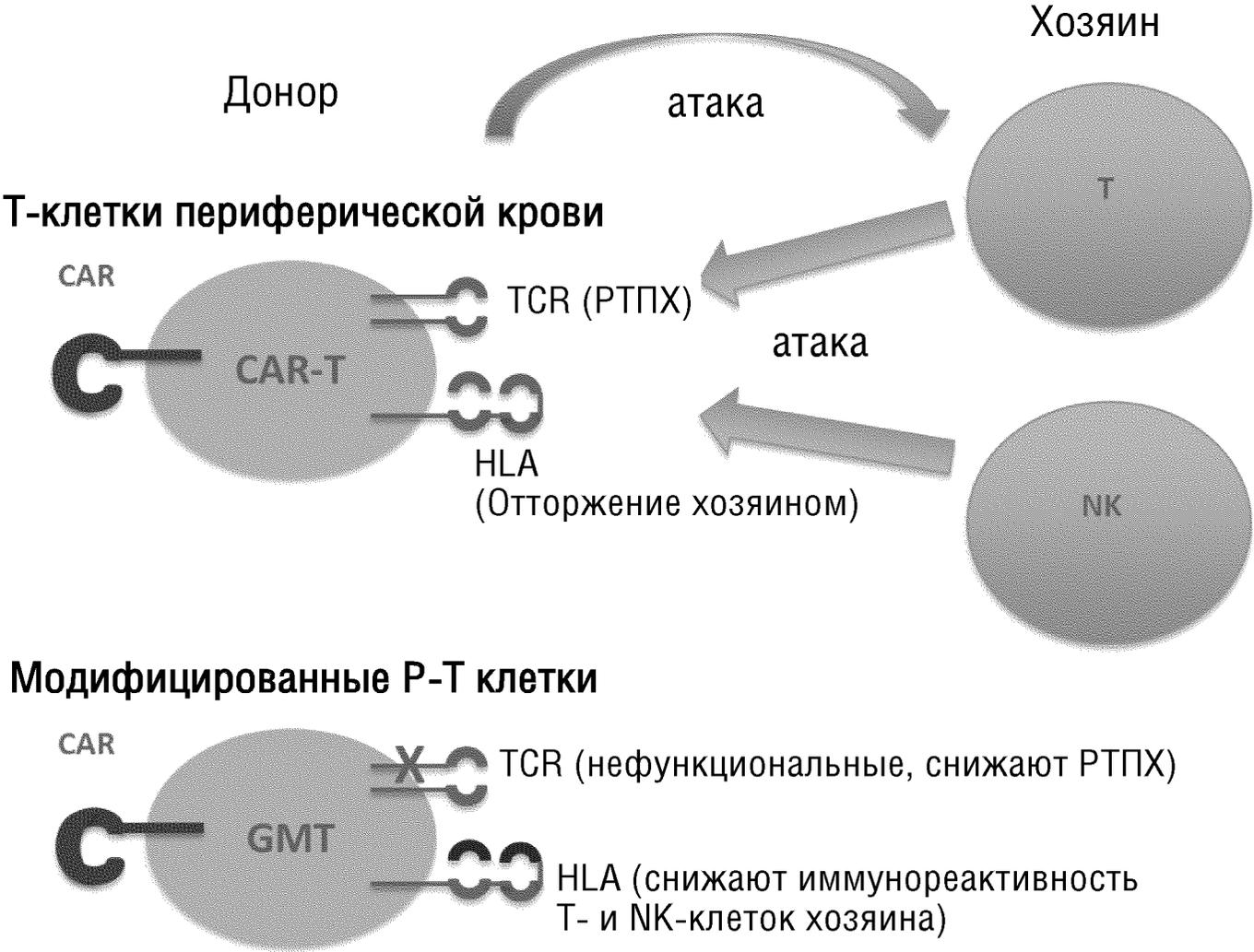
40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой гематологический рак.

41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что указанный гематологический рак представляет собой В-клеточный рак.

42. Способ по любому из п.п. 39-41, отличающийся тем, что популяция Т-клеток является аллогенной по отношению к указанному пациенту.

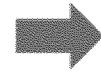
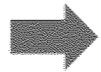
По доверенности

ФИГ.1

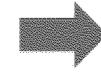
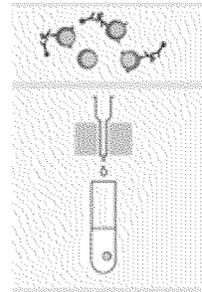


# ФИГ.2

## ОБРАБОТКА И ВЫДЕЛЕНИЕ Т-КЛЕТОК



Истощение CD26/  
Позитивная  
селекция CD4 и CD8



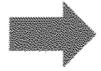
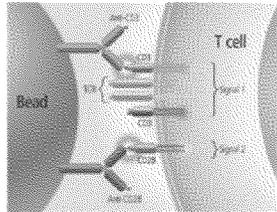
Криосохранение  
Т-клеток



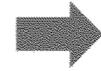
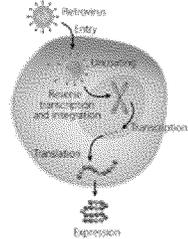
2/27

## РАЗМНОЖЕНИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ Р-Т

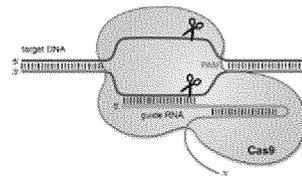
День 0:  
Размораживание/  
Активация UCB-T



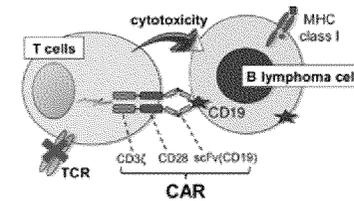
День 3:  
Трансдукция CAR  
(CD19 CAR)



День 6:  
Трансфекция CRISP  
(TRAC KO)

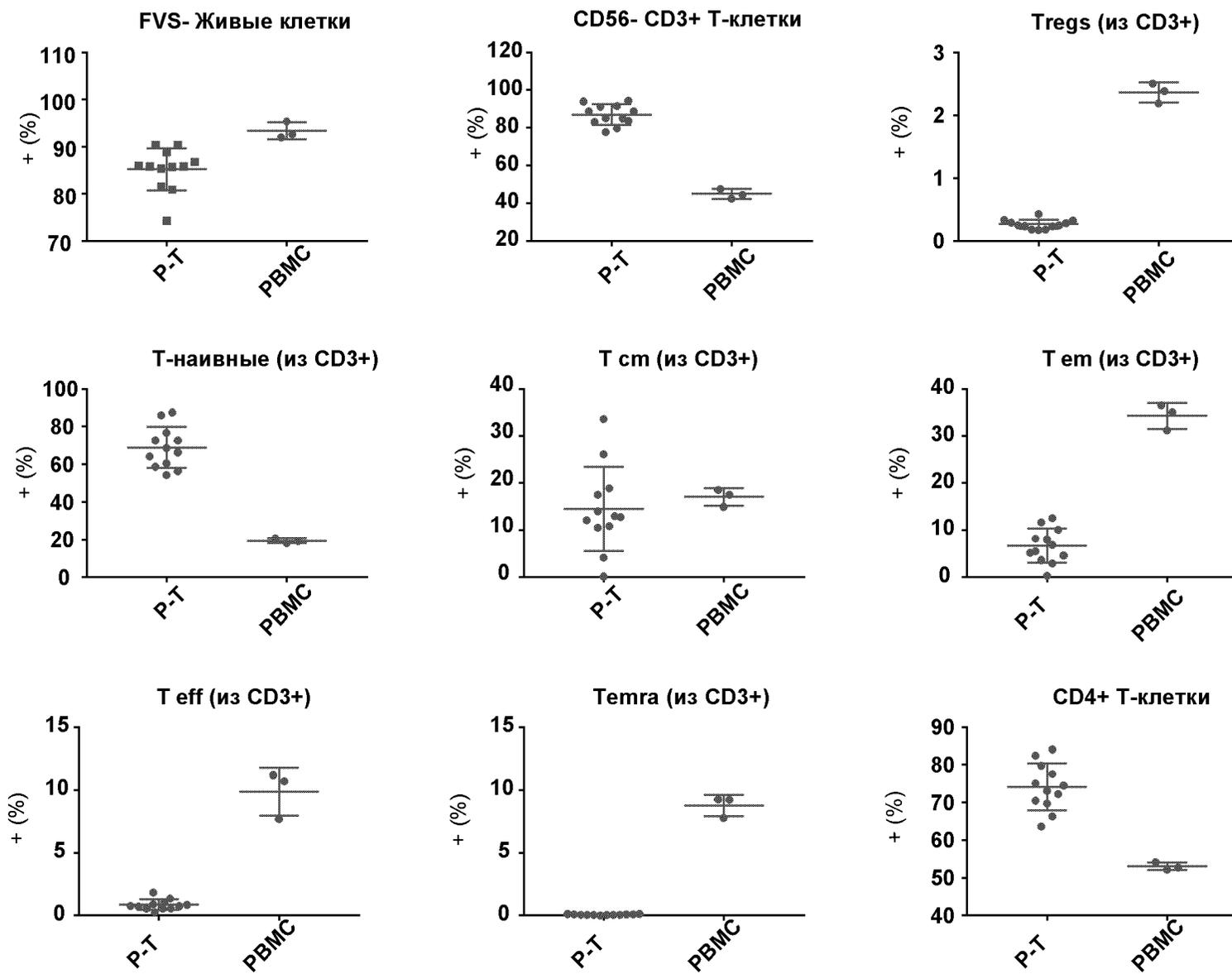


День 15:  
Оценка функции/  
Аллореактивности

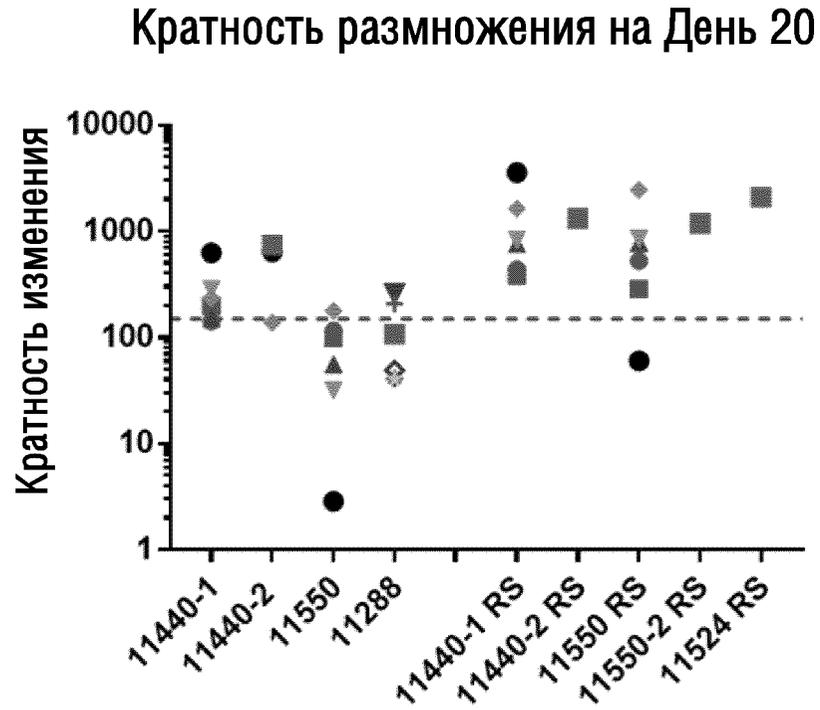


2/27

ФИГ.3

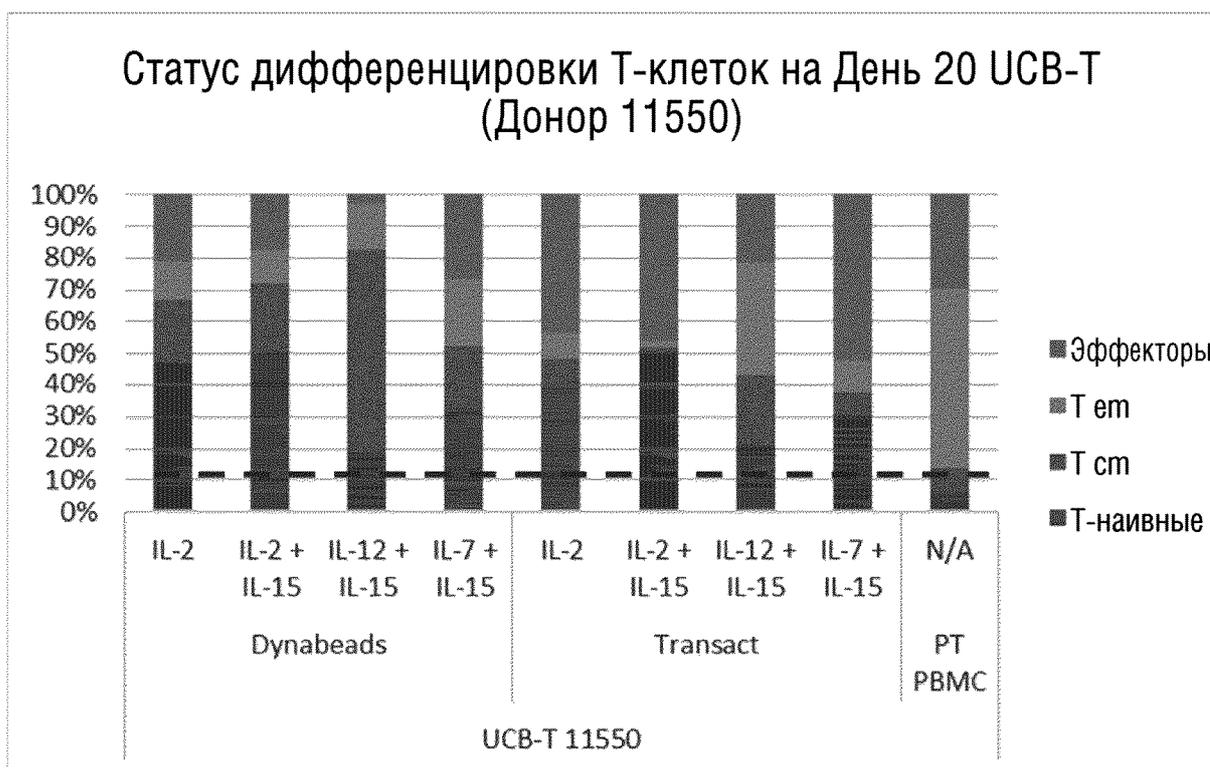
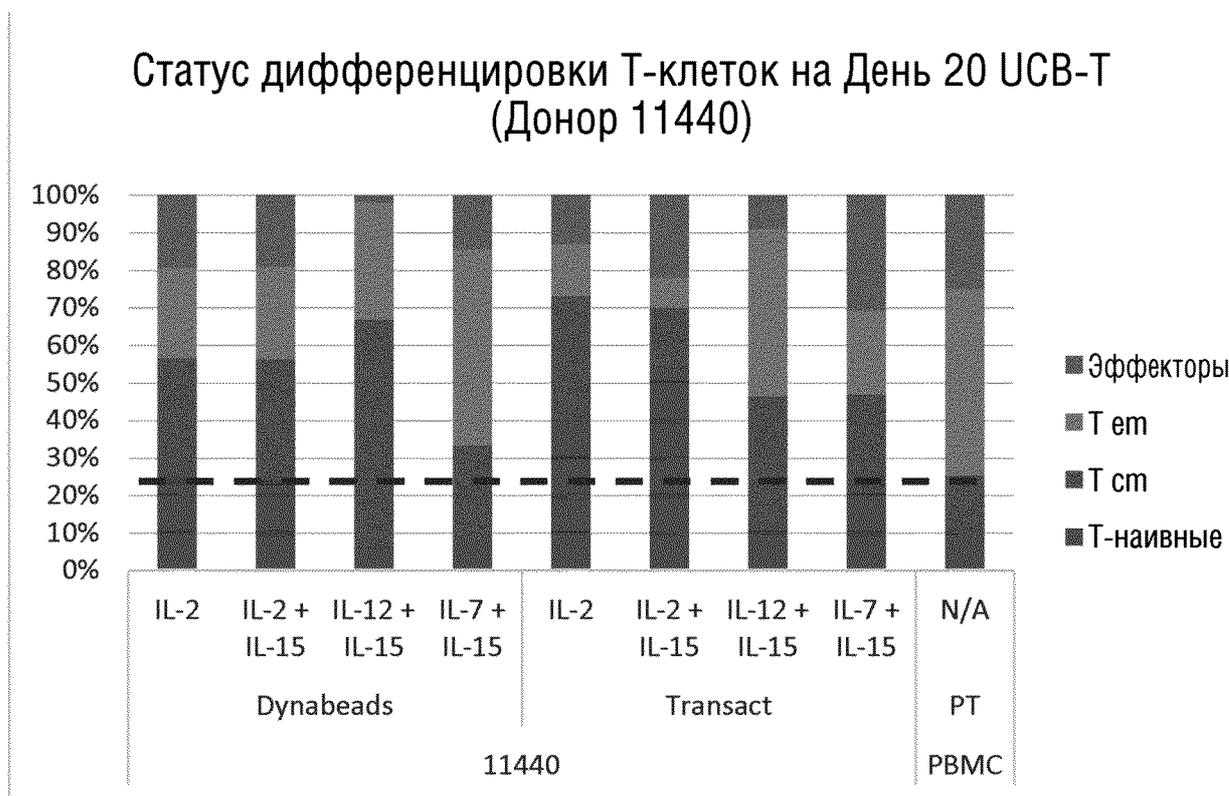


ФИГ.4

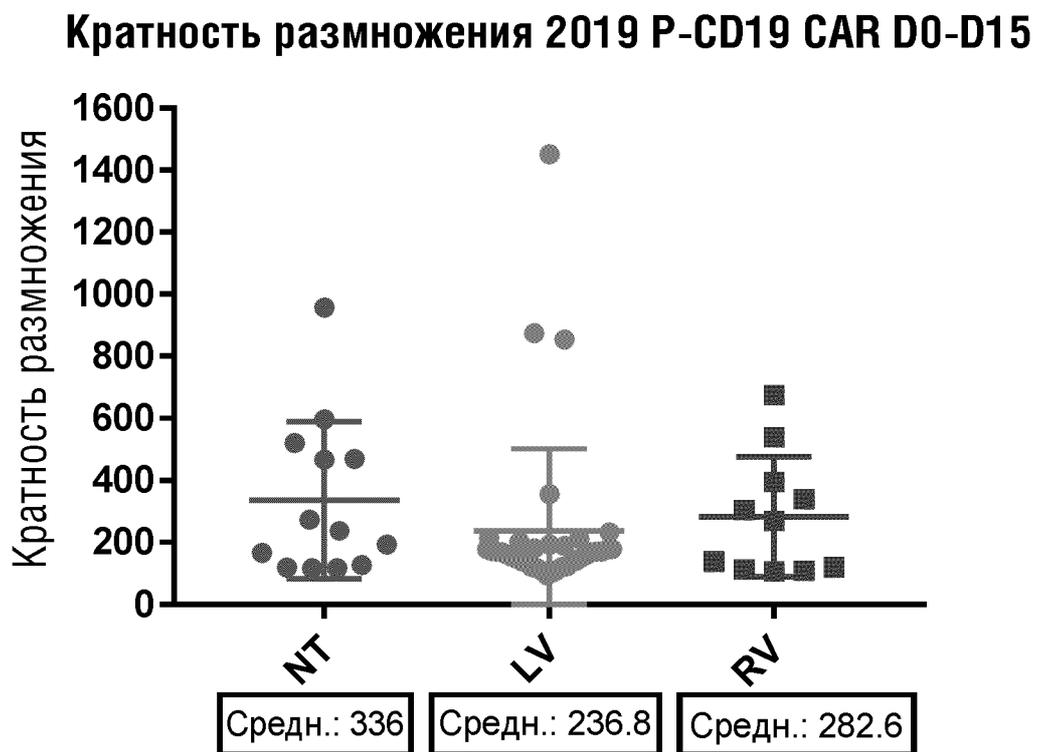


- TCT: Dyna + IL2
- TCT: Dyna + IL7/IL15
- ▲ TCT: Trans + IL-2
- ▼ TCT: Trans + IL7/IL15
  
- ◆ Grex: Dyna + IL2
- Grex: Dyna + IL2 с истощением по CD25
- ◇ Grex: Dyna + IL7/IL15 с истощением по CD25
- \* Grex: Dyna + IL2/IL7 с истощением по CD25
- Grex: Trans + IL2
- Grex: Trans + IL2 с истощением по CD25
- + Grex: Trans + IL7/IL15 с истощением по CD25
- ▼ Grex: Trans+ IL2/IL7 с истощением по CD25

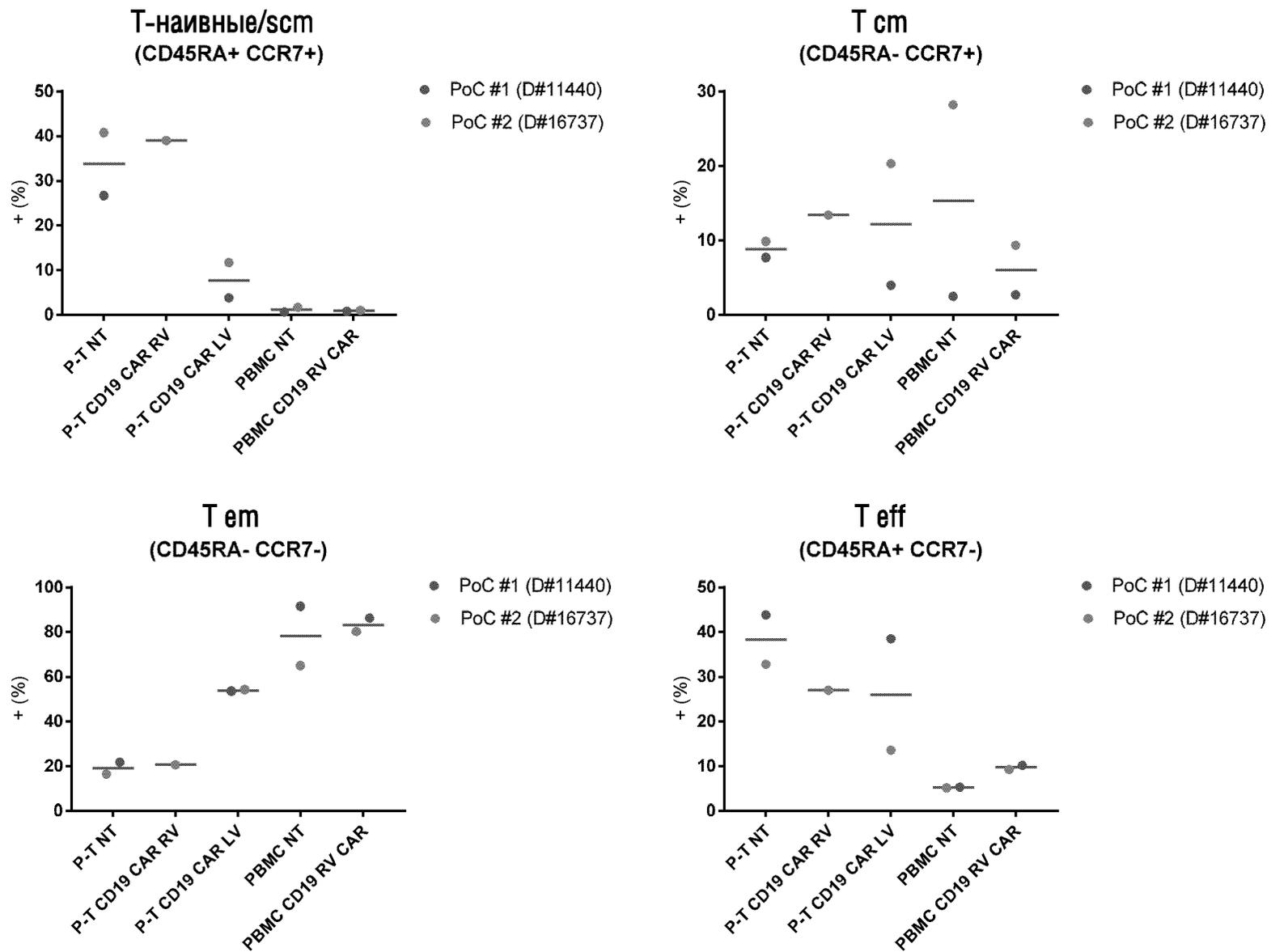
## ФИГ.5



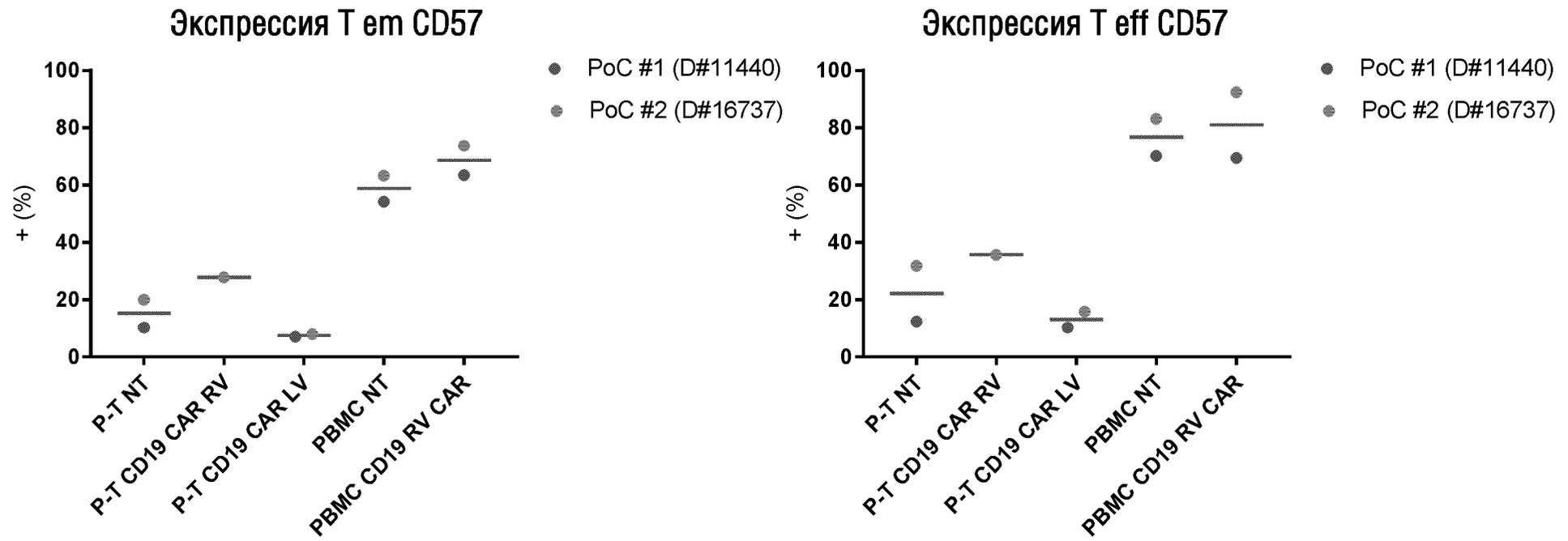
ФИГ.6



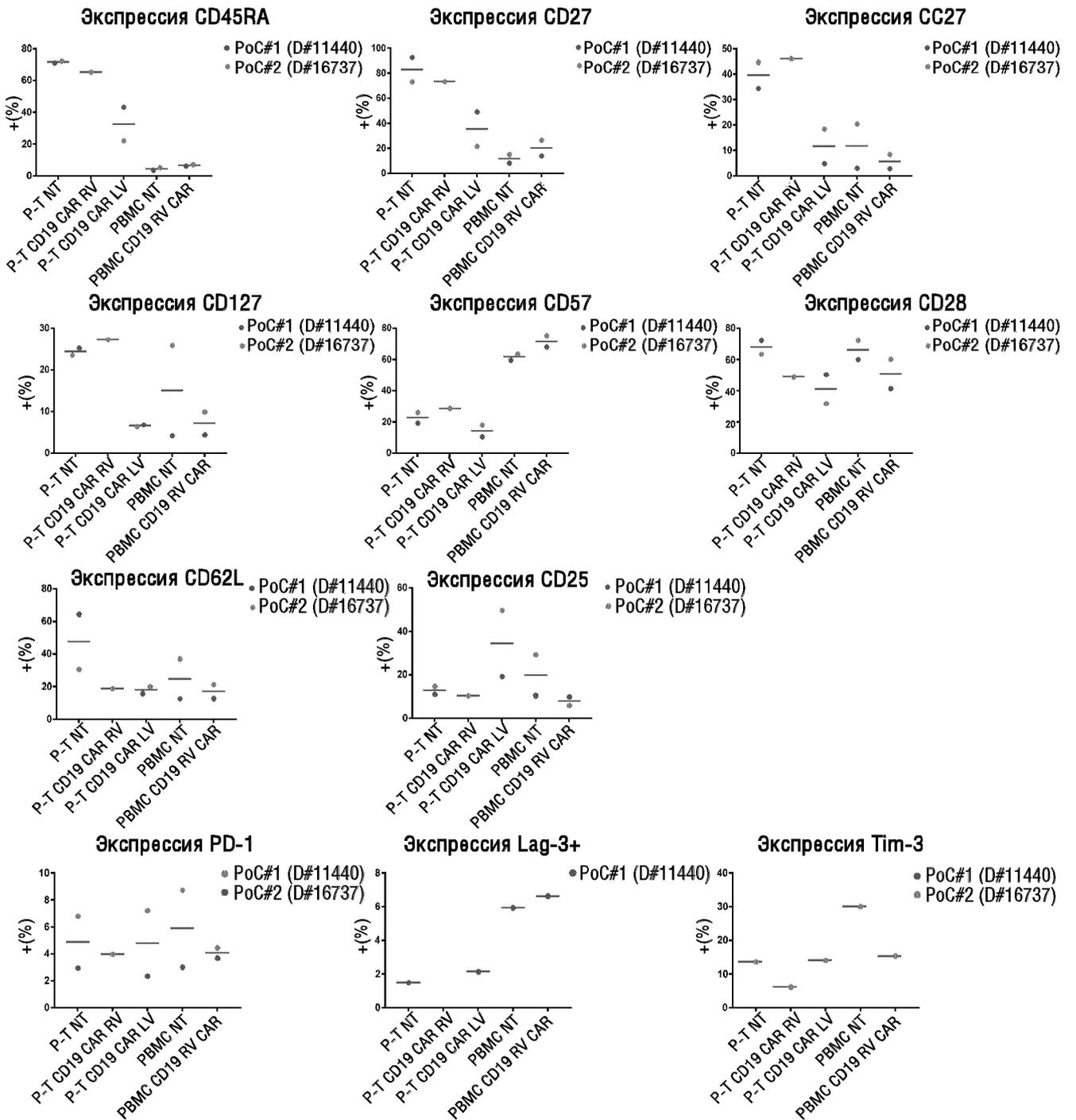
ФИГ.7



# ФИГ.8

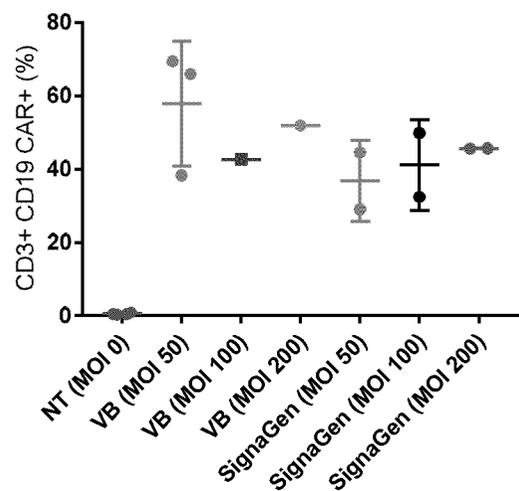


ФИГ.9

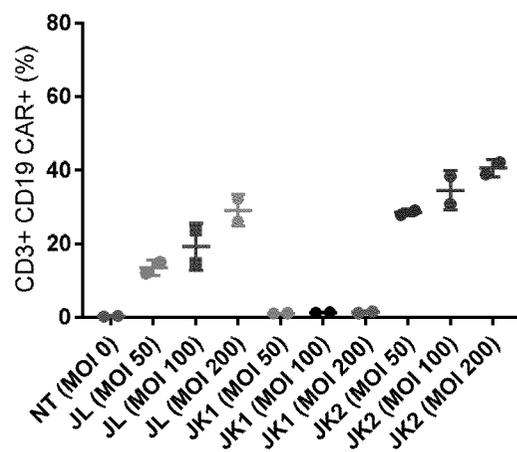


# ФИГ.10

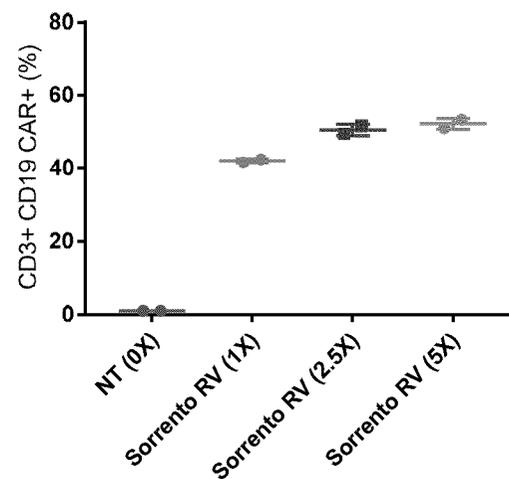
Экспрессия P-CD19 LV Ms scFv CD19 CAR



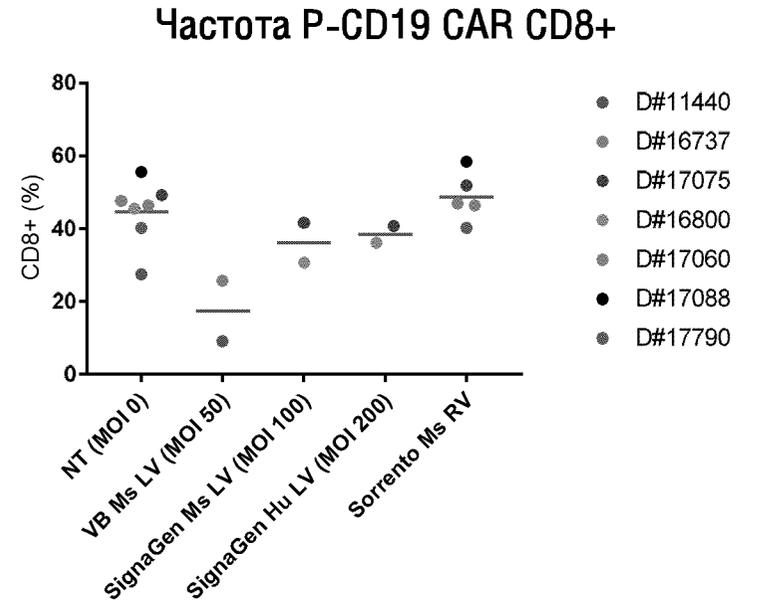
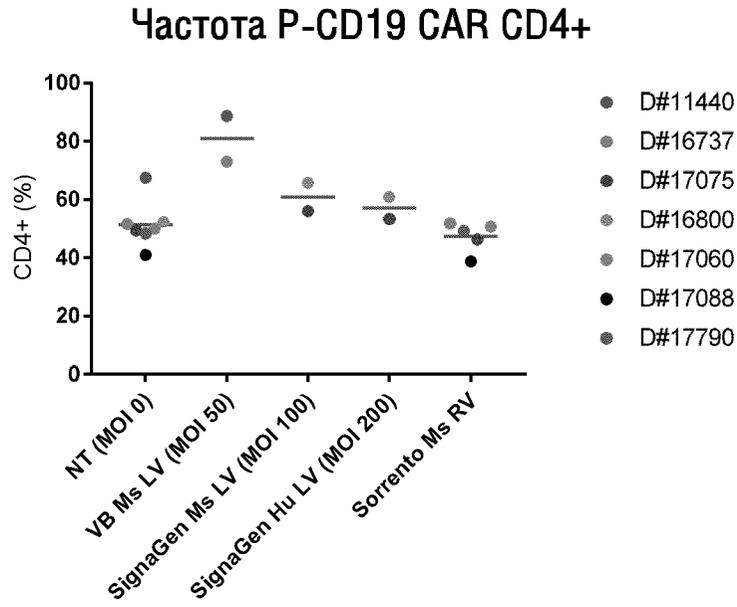
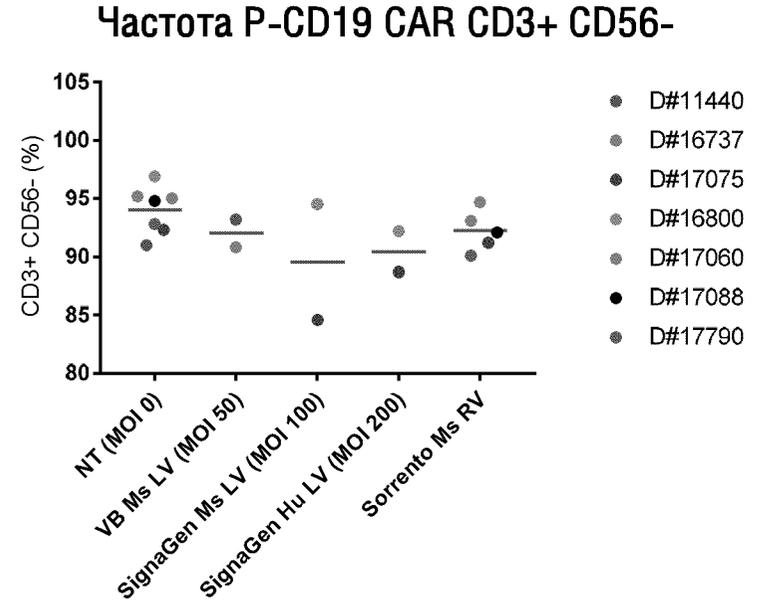
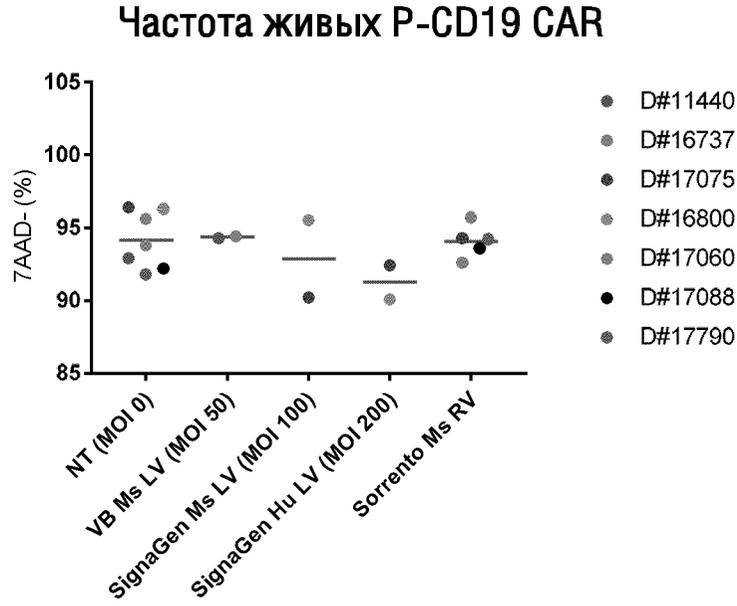
Экспрессия P-CD19 LV Hu scFv CD19 CAR



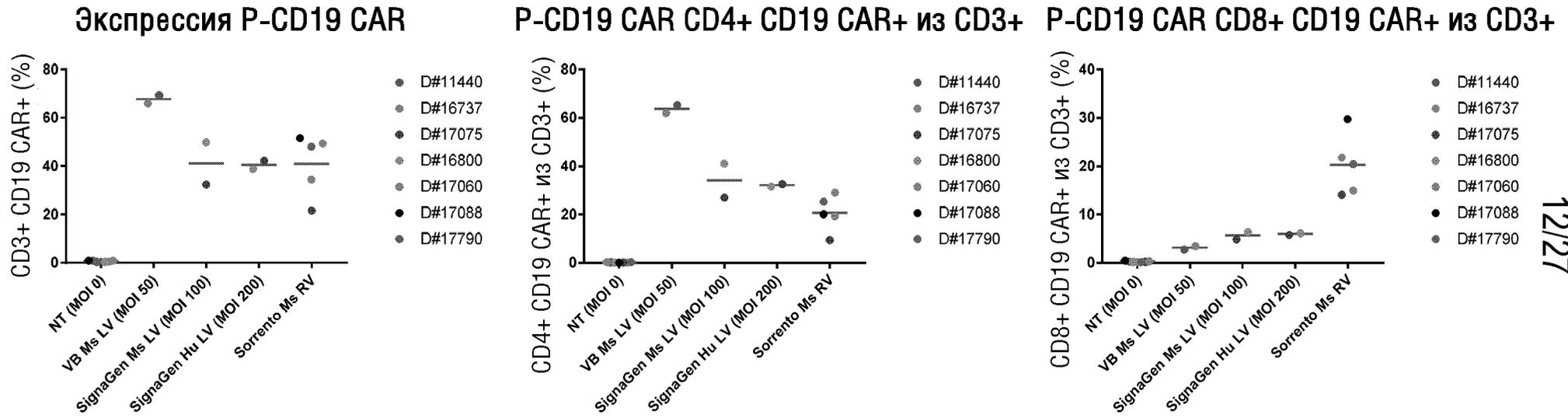
Экспрессия P-CD19 RV Ms scFv CD19 CAR



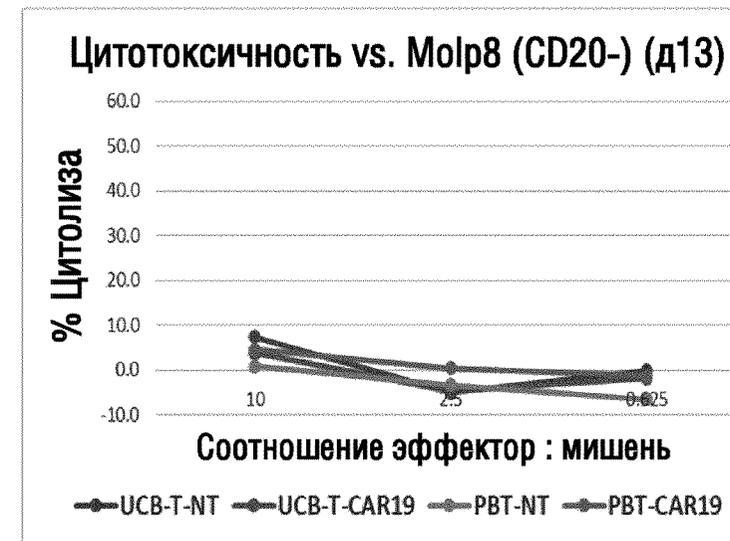
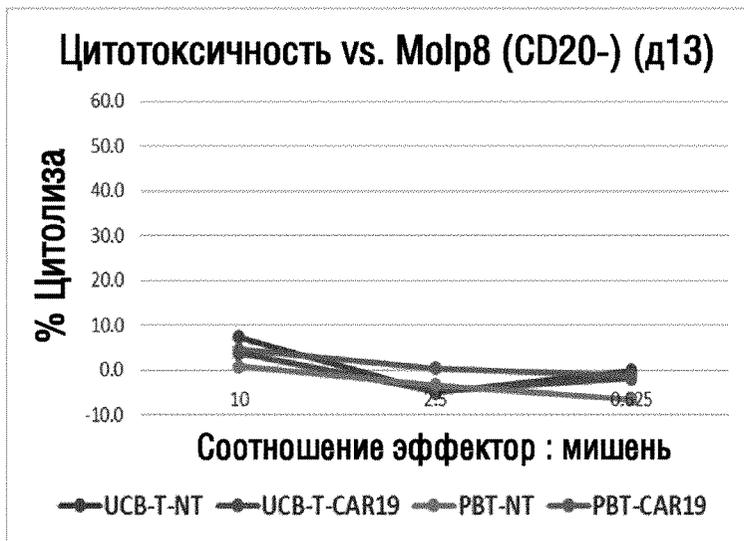
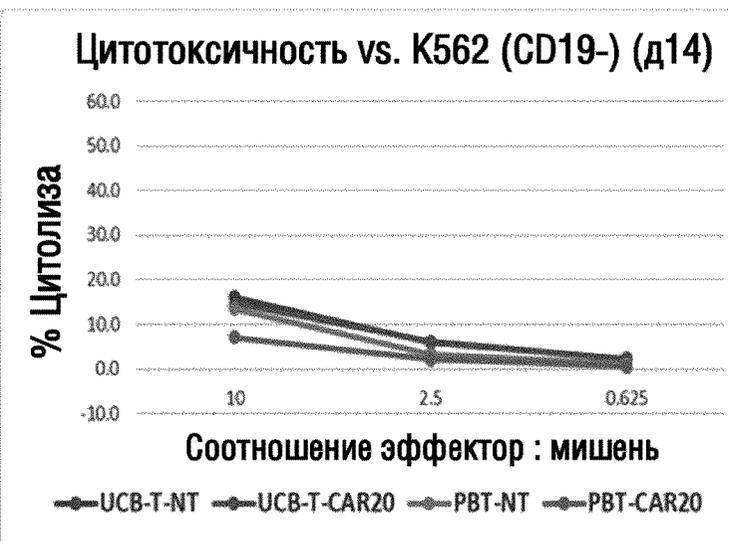
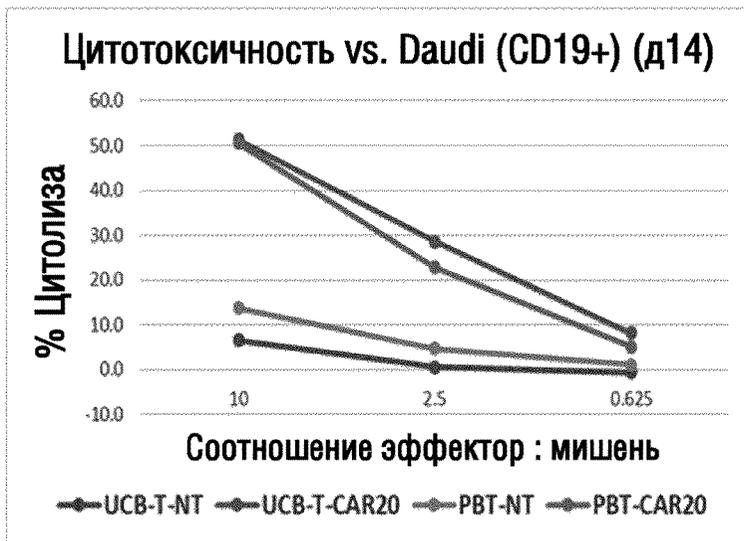
ФИГ.11



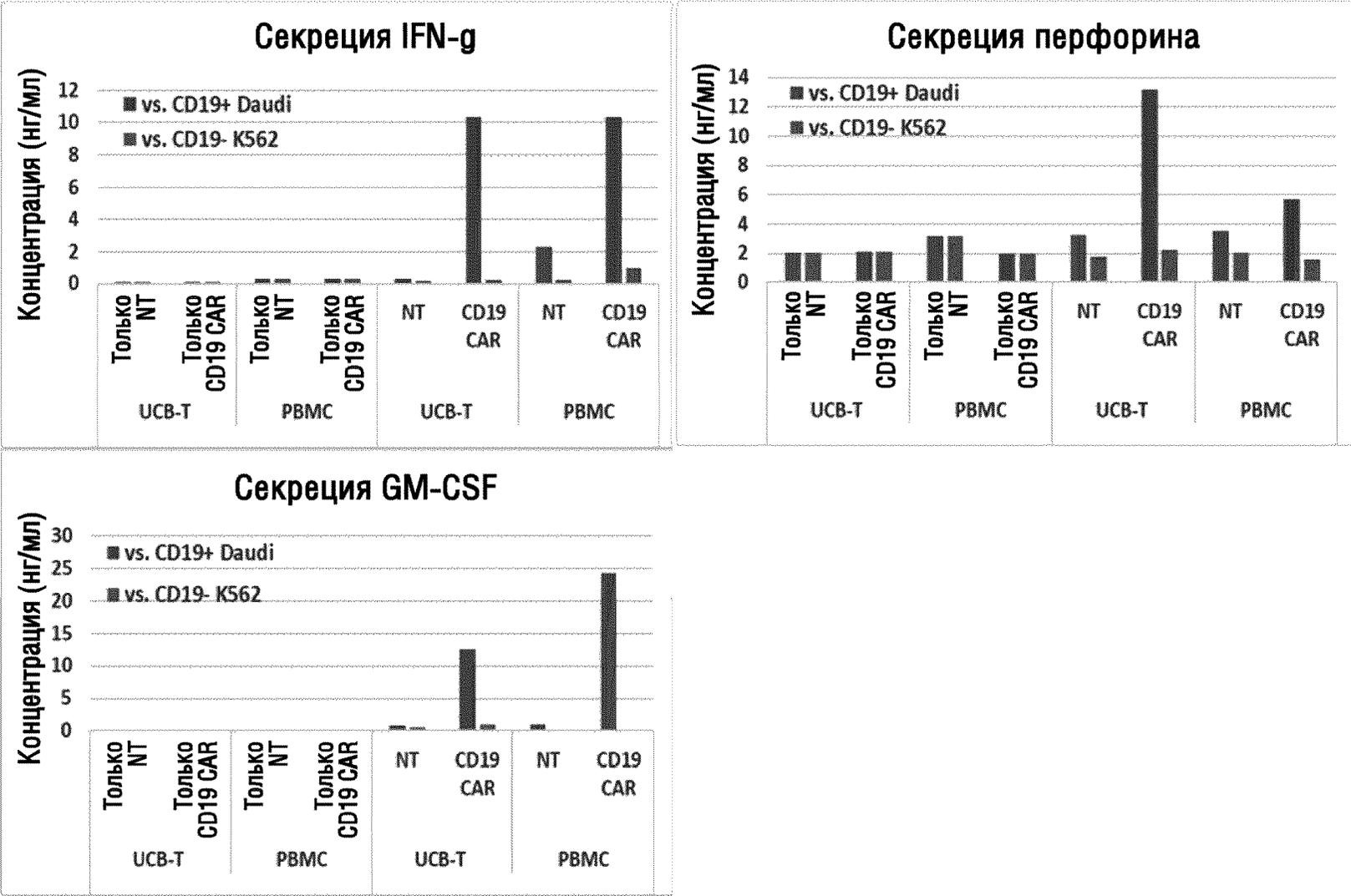
# ФИГ.12



ФИГ.13

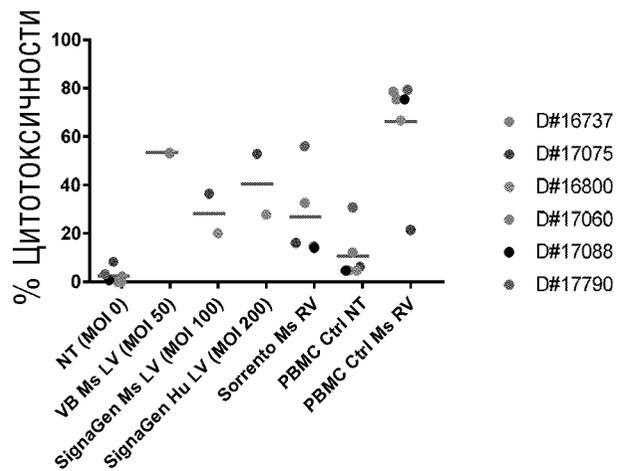


ФИГ.14

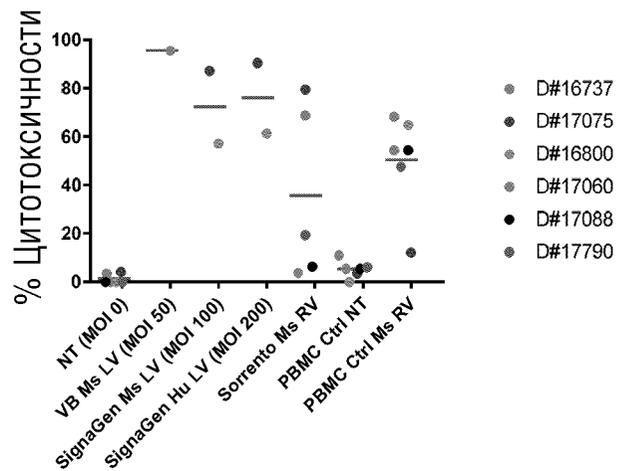


# ФИГ.15

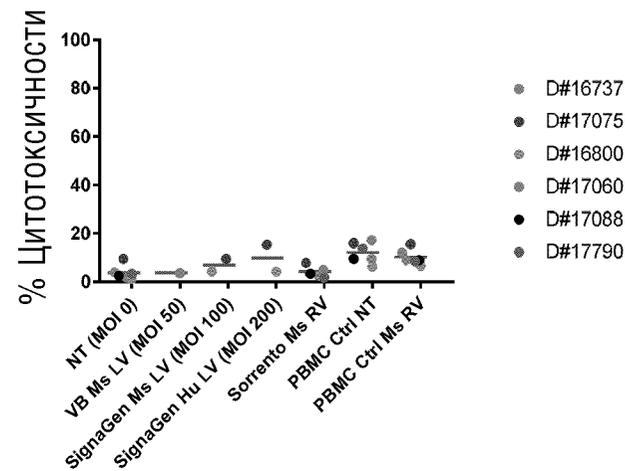
4-час. цитотоксичность P-CD19 CAR  
в отношении Daudi  
(E:T 10:1)



4-час. цитотоксичность P-CD19 CAR  
в отношении Nalm6  
(E:T 10:1)

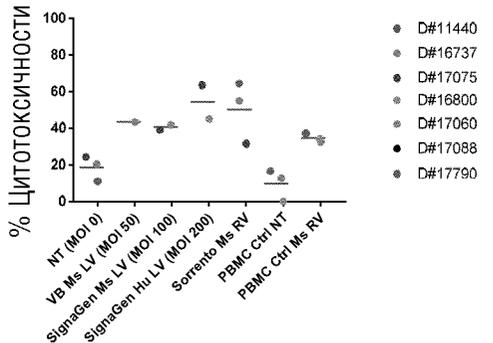


4-час. цитотоксичность P-CD19 CAR  
в отношении K562  
(E:T 10:1)

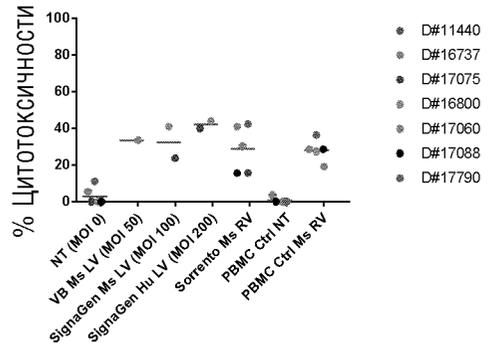


# ФИГ.16

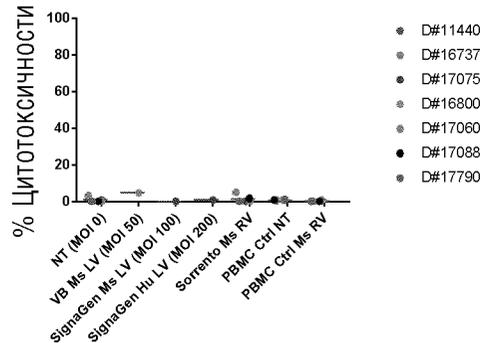
**4-час. ACEA цитотоксичность P-CD19 CAR в отношении Daudi (E:T 2.5:1)**



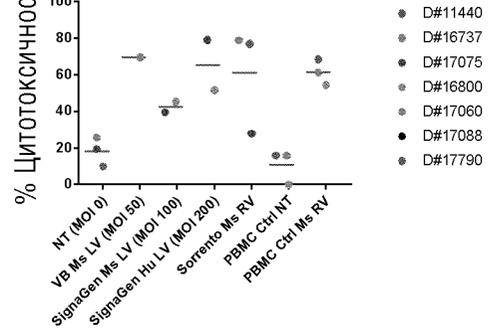
**4-час. ACEA цитотоксичность P-CD19 CAR в отношении Nalm6 (E:T 2.5:1)**



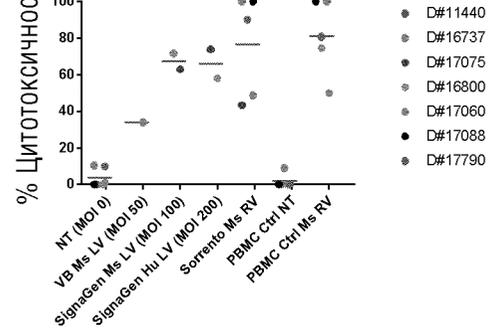
**4-час. ACEA цитотоксичность P-CD19 CAR в отношении K562 (E:T 2.5:1)**



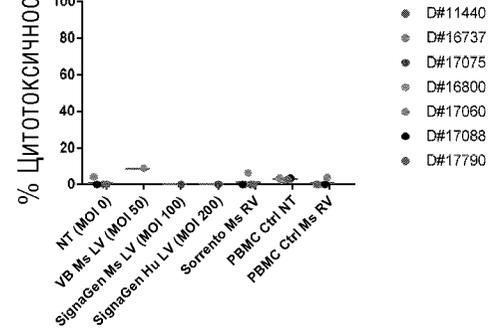
**12-час. ACEA цитотоксичность P-CD19 CAR в отношении Daudi (E:T 2.5:1)**



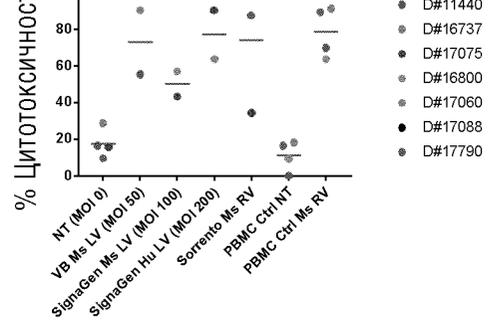
**12-час. ACEA цитотоксичность P-CD19 CAR в отношении Nalm6 (E:T 2.5:1)**



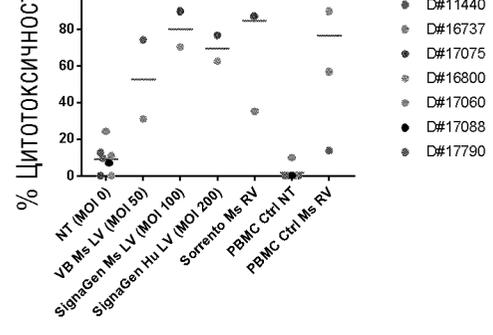
**12-час. ACEA цитотоксичность P-CD19 CAR в отношении K562 (E:T 2.5:1)**



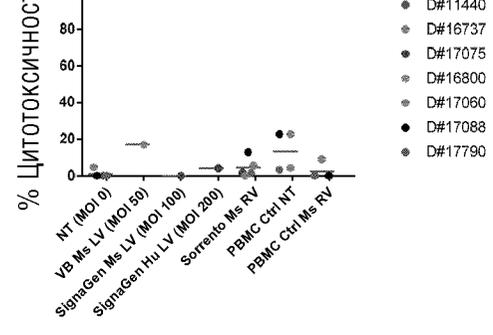
**24-час. ACEA цитотоксичность P-CD19 CAR в отношении Daudi (E:T 2.5:1)**



**24-час. ACEA цитотоксичность P-CD19 CAR в отношении Nalm6 (E:T 2.5:1)**

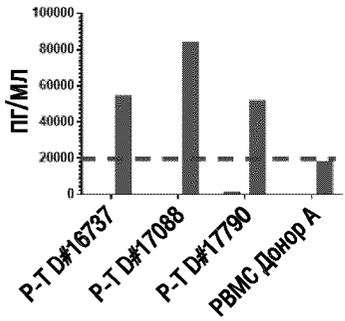


**24-час. ACEA цитотоксичность P-CD19 CAR в отношении K562 (E:T 2.5:1)**

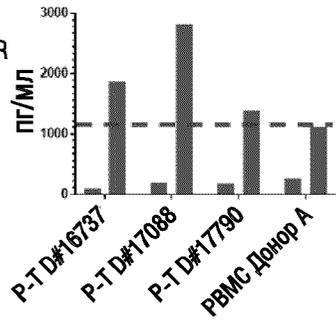


# ФИГ.17

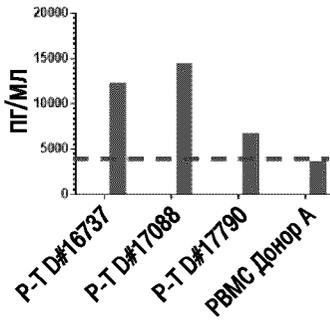
Секреция GM-CSF в ответ на Daudi (E:T 1:1)



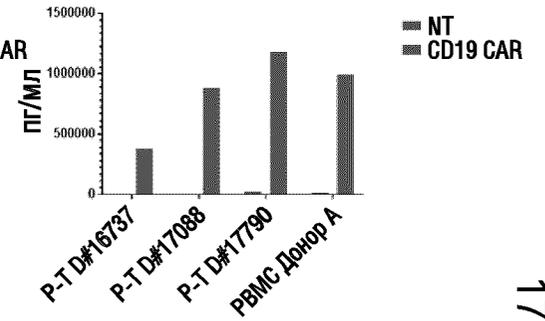
Секреция перфорины в ответ на Daudi (E:T 1:1)



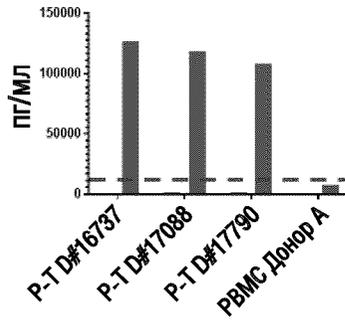
Секреция TNF-α в ответ на Daudi (E:T 1:1)



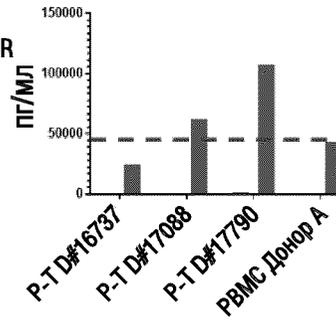
Секреция IFN-γ в ответ на Daudi (E:T 1:1)



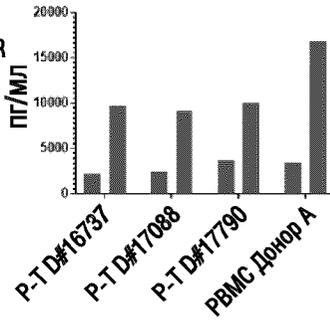
Секреция IL-2 в ответ на Daudi (E:T 1:1)



Секреция гранзима В в ответ на Daudi (E:T 1:1)

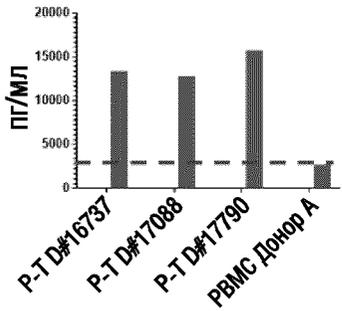


Секреция гранзима А в ответ на Daudi (E:T 1:1)

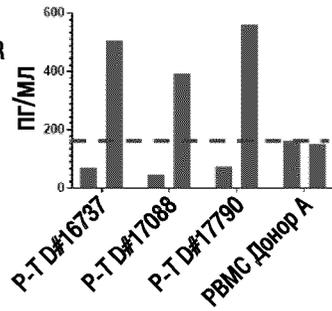


# ФИГ.18

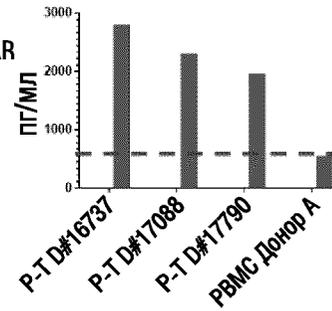
Секреция GM-CSF в ответ на Nalm6 (E:T 1:1)



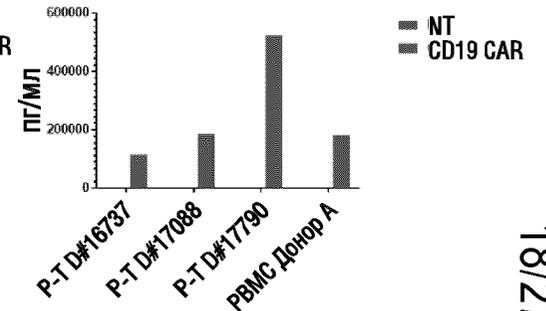
Секреция перфорины в ответ на Nalm6 (E:T 1:1)



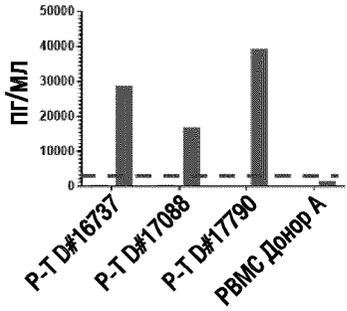
Секреция TNF-α в ответ на Nalm6 (E:T 1:1)



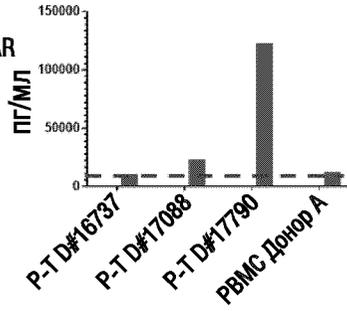
Секреция IFN-γ в ответ на Nalm6 (E:T 1:1)



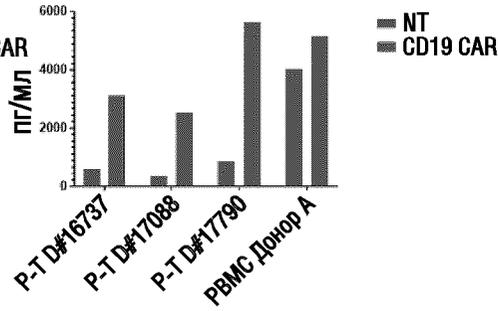
Секреция IL-2 в ответ на Nalm6 (E:T 1:1)



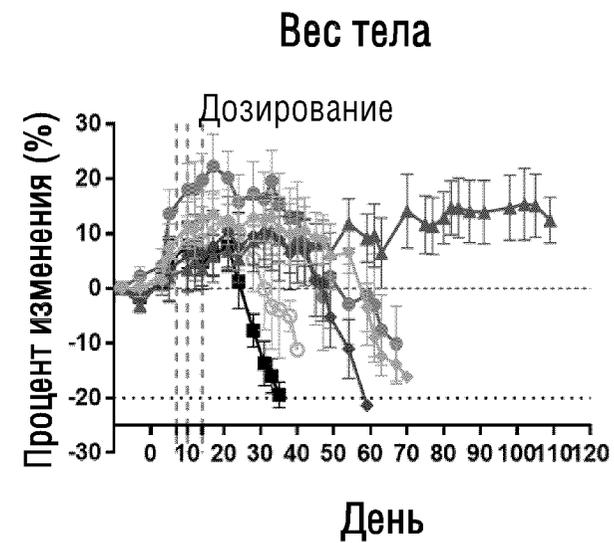
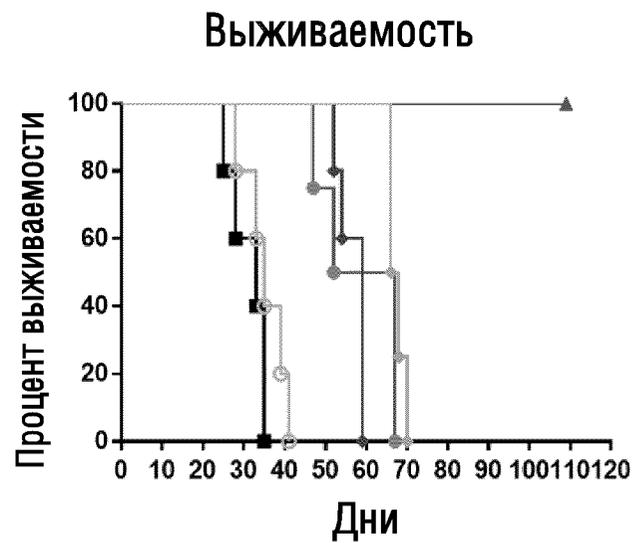
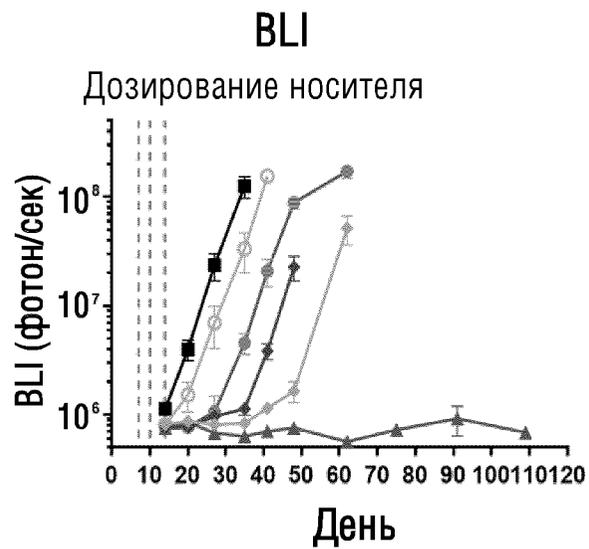
Секреция гранзима В в ответ на Nalm6 (E:T 1:1)



Секреция гранзима А в ответ на Nalm6 (E:T 1:1)

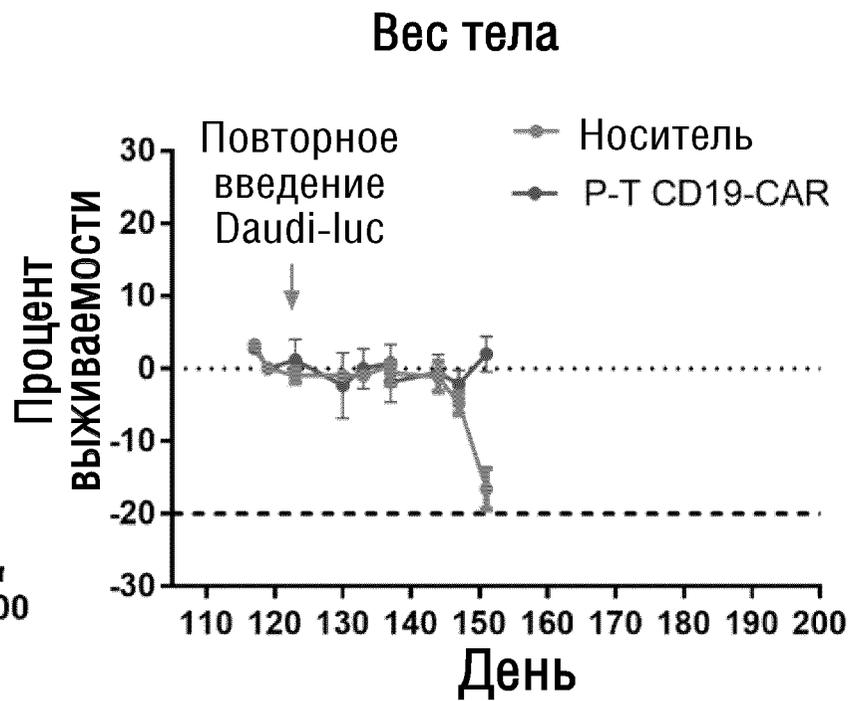
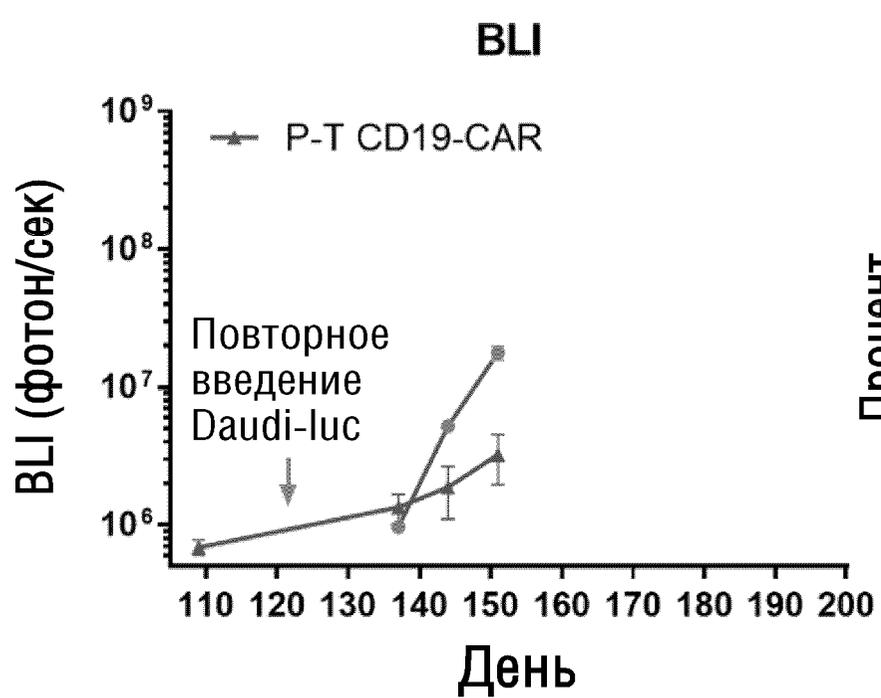


ФИГ.19



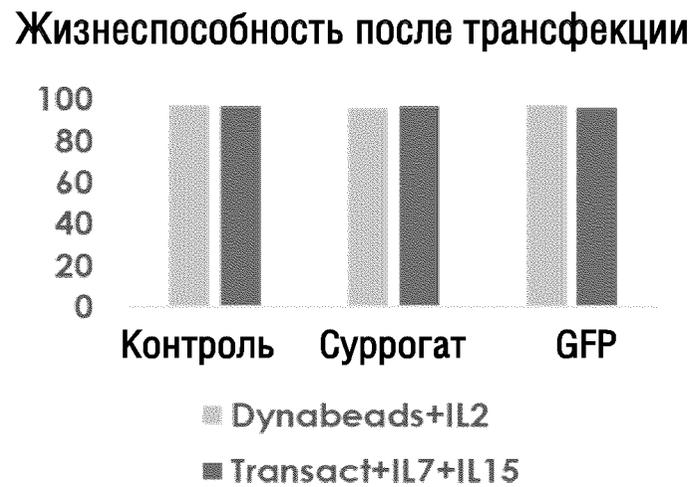
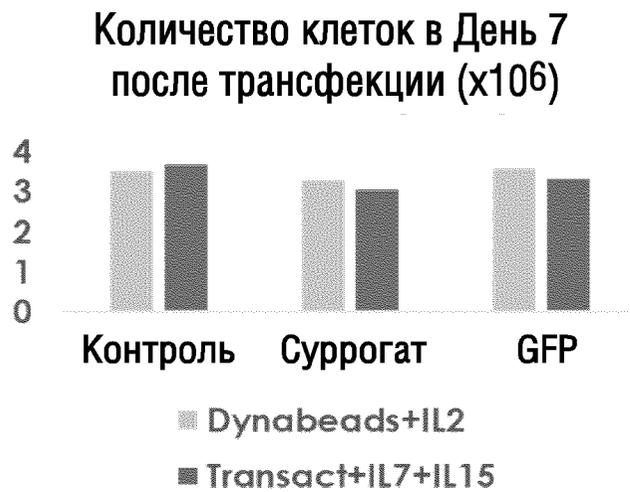
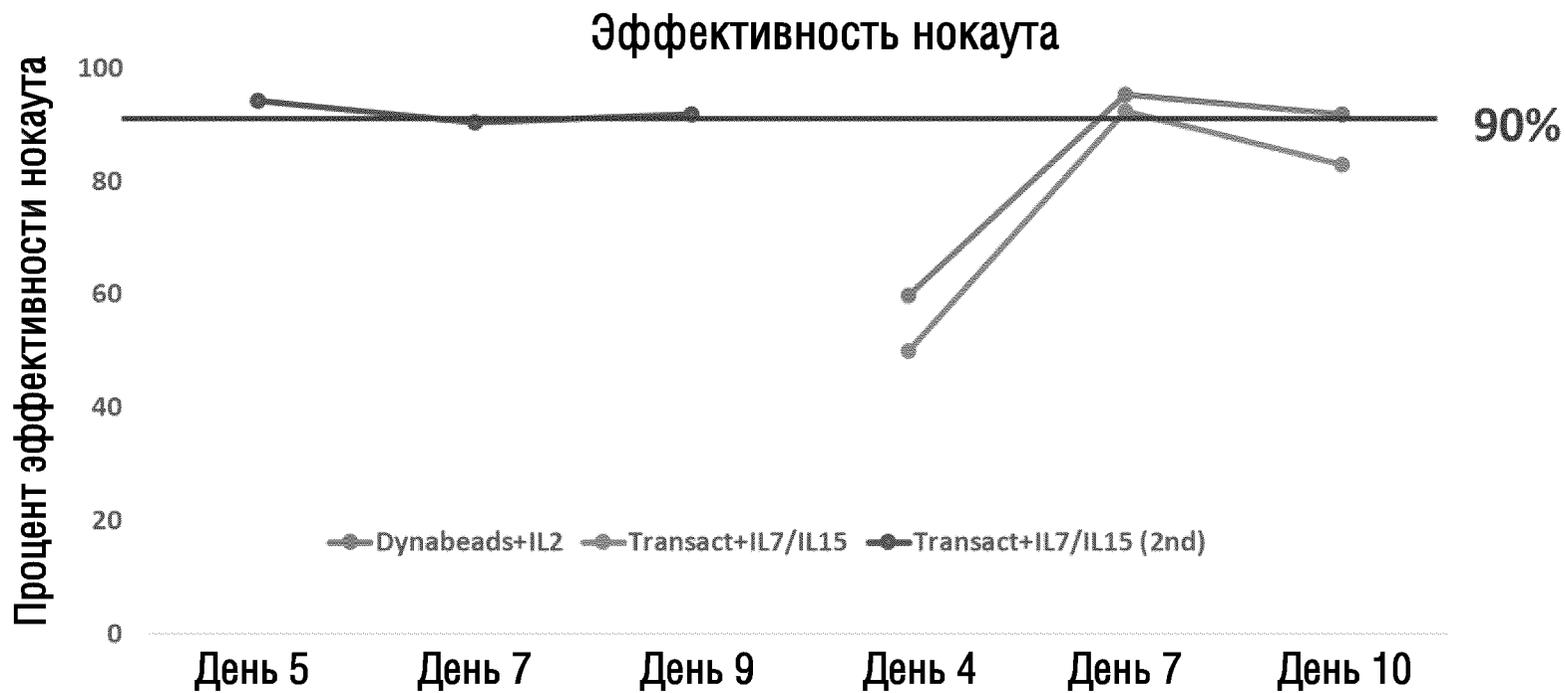
- G1: Носитель
- G2: PBMC CD19-CAR (7MM)
- G3: PBMC CD19-CAR RV (2MM)
- ▲ G4: P-T CD19-CAR RV
- ◆ G5: P-T CD19-CAR LV TRAC
- ◇ G6: P-T CD19-CAR LV PC (мультидоза)

ФИГ.20

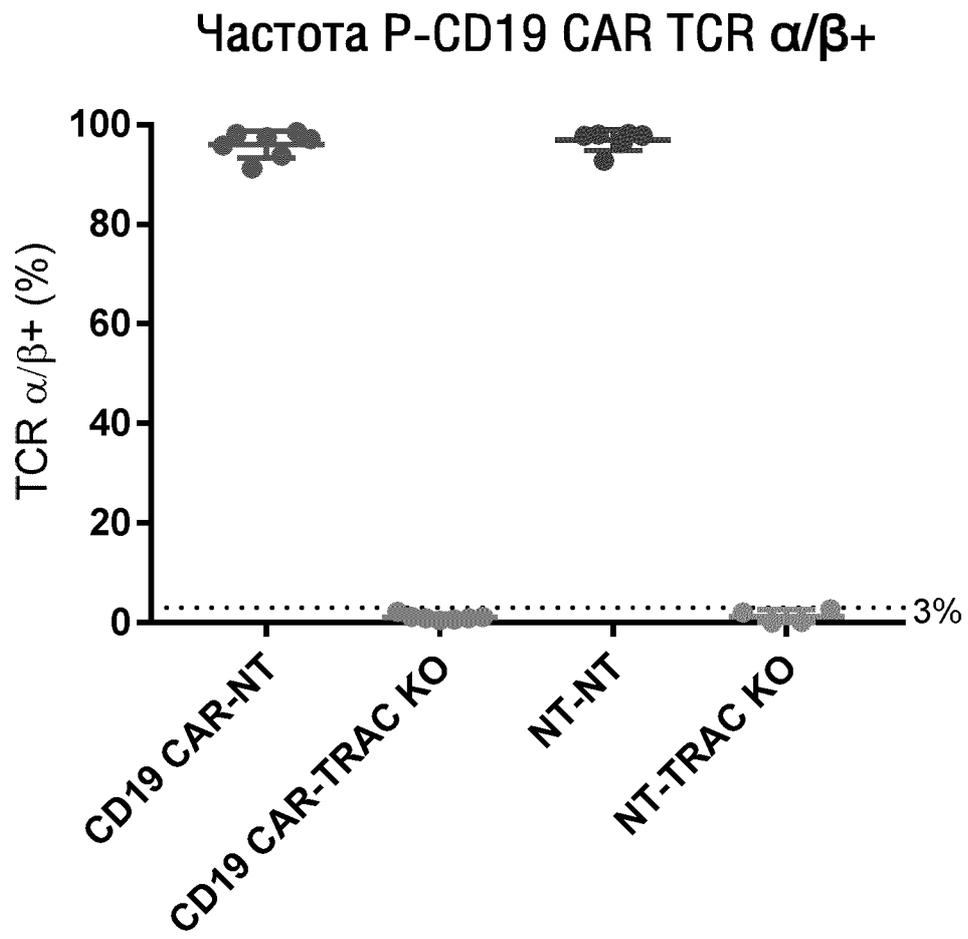


20/27

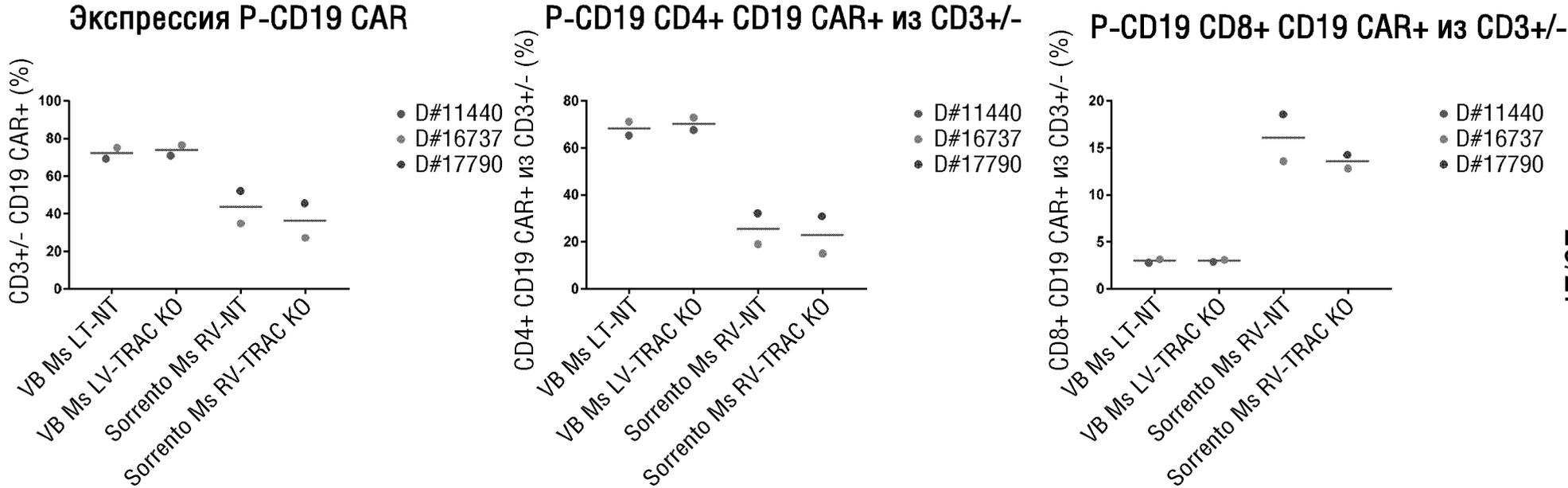
ФИГ.21



ФИГ.22

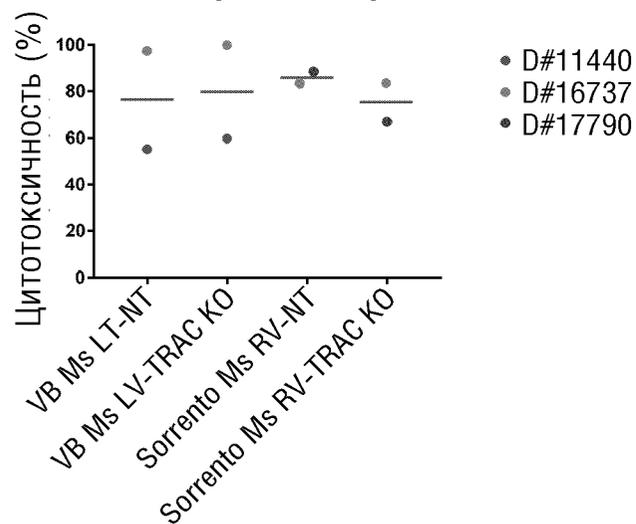


# ФИГ.23

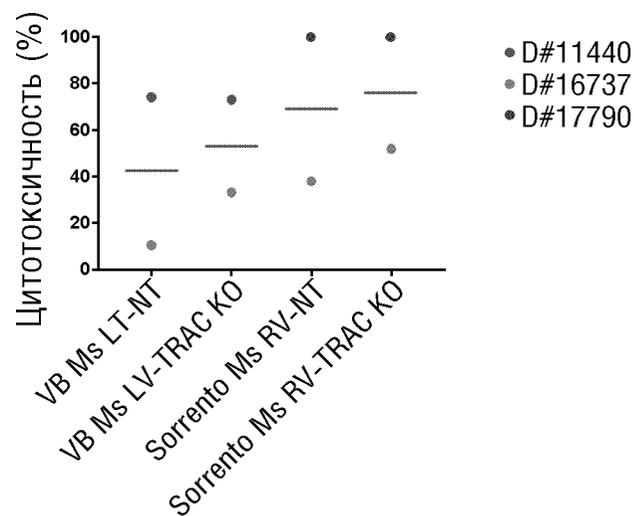


# ФИГ.24

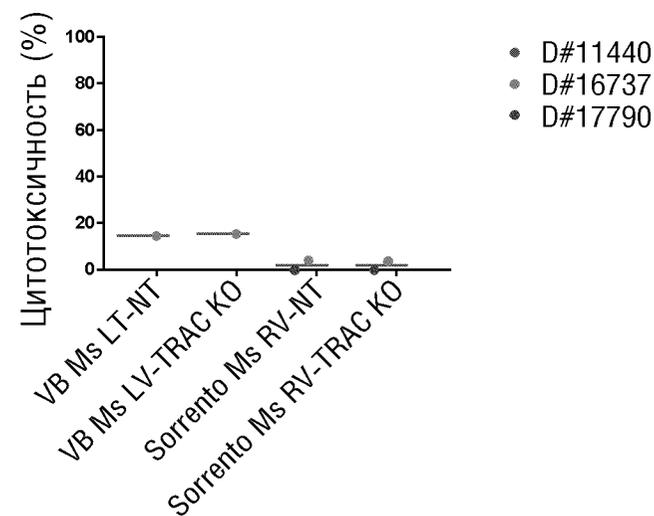
24 час. ACEA цитотоксичность  
P-CD19 CAR в отношении Daudi  
(E:T 2.5:1)



24 час. ACEA цитотоксичность  
P-CD19 CAR в отношении Nalm6  
(E:T 2.5:1)

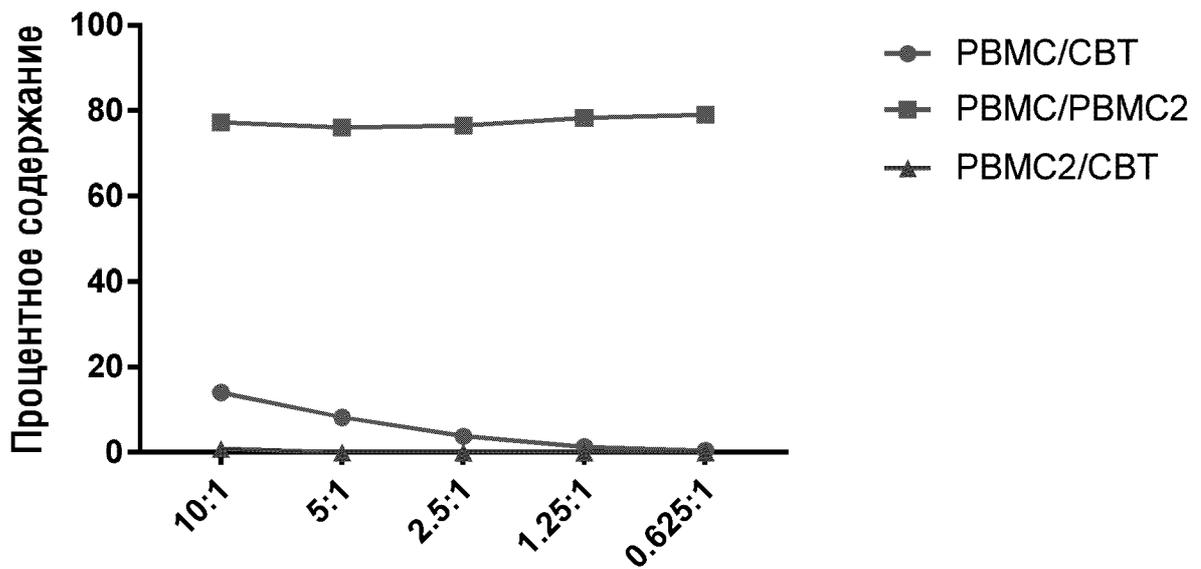


24 час. ACEA цитотоксичность  
P-CD19 CAR в отношении K562  
(E:T 2.5:1)

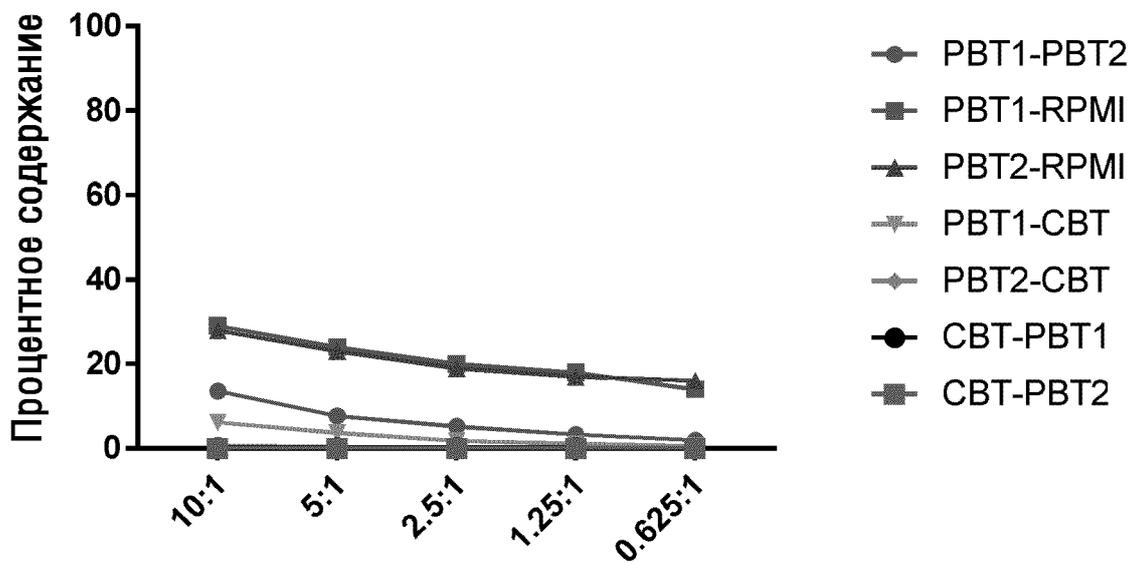


ФИГ.25

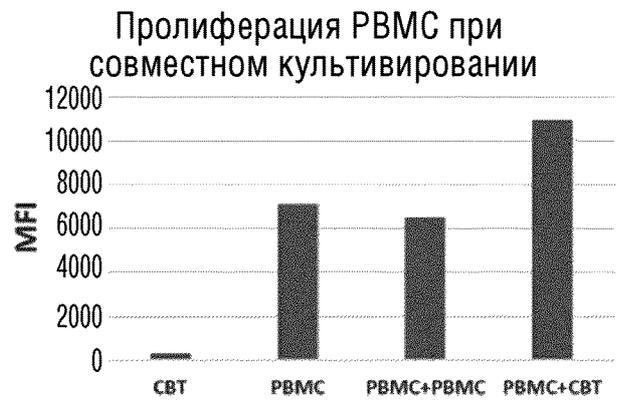
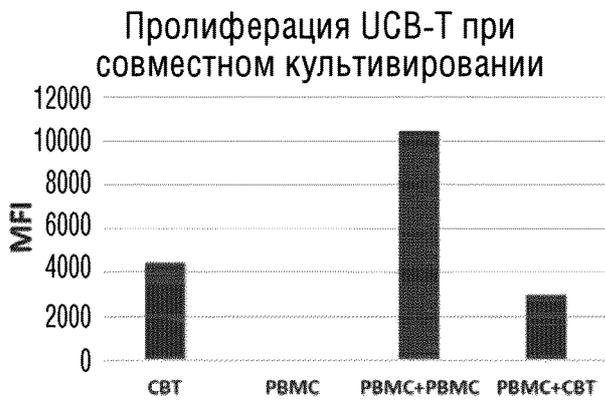
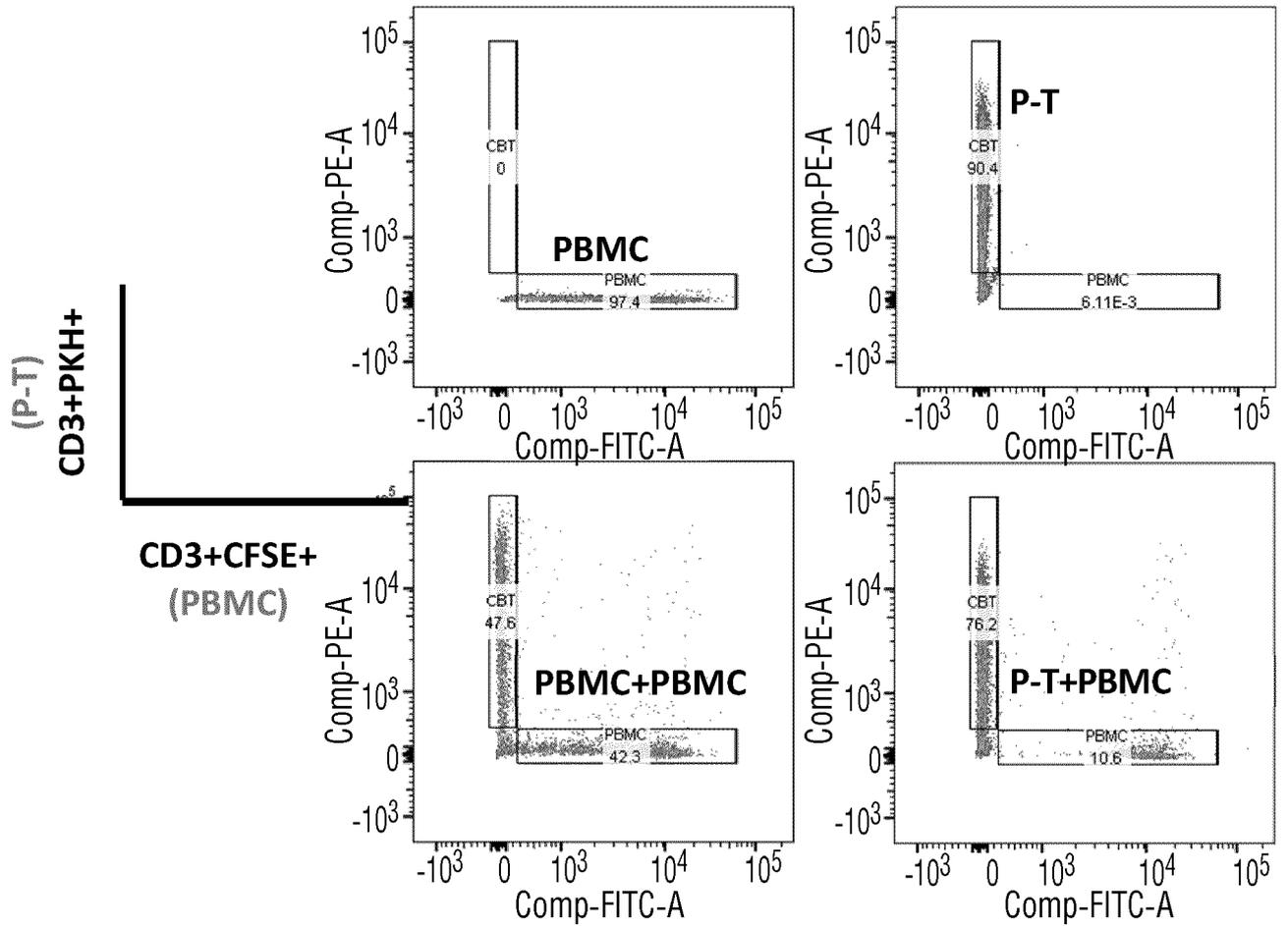
## Анализ цитотоксичности



4 час. инкубация



ФИГ.26



# ФИГ.27

