

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192447** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.12.07

(51) Int. Cl. *C12N 5/0783* (2010.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.03.09

(54) **СПОСОБ РАЗМНОЖЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-ЛИМФОЦИТОВ И НК-КЛЕТОК В МЕТОДАХ ЛЕЧЕНИЯ С АДОПТИВНЫМ ПЕРЕНОСОМ**

(31) 2019-0021

(32) 2019.03.15

(33) CU

(86) PCT/CU2020/050002

(87) WO 2020/187340 2020.09.24

(88) 2021.04.15

(71) Заявитель:

**ЦЕНТРО ДЕ ИНМУНОЛОГИЯ
МОЛЕКУЛАР (СУ); ЛУДВИГ
ИНСТИТУТЕ ФОР КАНСЕР
РЕСЕАРЧ ЛТД; ЦЕНТРЕ
ХОСПИТАЛИЕР УНИВЕРСИТАИРЕ
ВАУДОИС; УНИВЕРСИТИ ОФ
ЛАУСАННЕ (СН)**

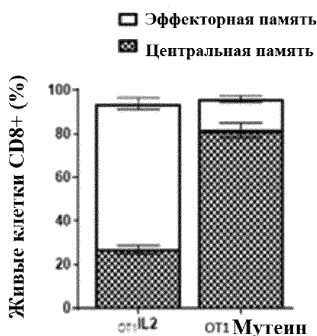
(72) Изобретатель:

**Леон Монзон Калет, Монталво
Береау Галиа Магела (СУ), Каукос
Георге, Ирвинг Мелита, Крибиоли
Элизабетта (СН), Ортис Миранда
Якелин (СУ), Коррия Осорио Ангел де
Жезус (СН)**

(74) Представитель:

Рыбина Н.А. (РУ)

(57) Изобретение описывает способ получения лимфоцитов с желаемым фенотипом для методов лечения с адоптивным переносом, пригодных для лечения рака. В частности, настоящее изобретение относится к стратегиям для индуцирования предпочтительного сигналинга через рецептор IL-2 с промежуточной аффинностью для размножения клеток с желаемым фенотипом центральной памяти. Способ настоящего изобретения пригоден для получения инфильтрующей опухоли лимфоцитов, TCR или химерного антигенного рецептора полученных методами инженерии Т-клеток для лечения рака.



202192447
A1

202192447

A1

СПОСОБ РАЗМНОЖЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-ЛИМФОЦИТОВ И НК-КЛЕТОК В МЕТОДАХ ЛЕЧЕНИЯ С АДОПТИВНЫМ ПЕРЕНОСОМ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Данное изобретение относится к области биотехнологии и иммуноонкологии. Оно относится к способам получения лимфоцитов с желаемым фенотипом центральной памяти и их применению для методов лечения с адоптивным переносом клеток у онкобольных.

10 ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Интерлейкин-2 (IL2) был первым из цитокинов, которые молекулярно охарактеризовали. Главным образом было показано, что он поддерживает рост и размножение Т- та НК-клеток (Morgan et. al., 1976, Science, 193 (4257):1007-1008). IL2 был одобрен для клинического использования в 1992 г., но точное описание биологии его рецептора все еще изучается (Rosenberg, 2014, J. Immunol., 15 192(12):5451-8; Smith, 2006, Medical Immunology, 1476 (9433):5-3). Введение IL2 в высоких дозах (ВД IL2) использовалось в качестве иммунотерапии рака. Системное лечение с помощью ВД IL2 дает длительные ответы у пациентов с меланомой и карциномой почек, но только у относительно небольшой части пациентов. Кроме того, системные методы лечения с помощью ВД IL2 индуцируют значительные токсичности, что дополнительно ограничивает его клиническую значимость (Atkins, 2006, Clin. Cancer Res., 12:2353-2358).

IL2 взаимодействует с тремя типами рецепторов (IL2R) на лимфоцитах: низкоаффинный рецептор ($K_d \sim 10^{-8}$ M), который содержит только субъединицу IL2R α (CD25); рецептор с промежуточной аффинностью ($K_d \sim 10^{-9}$ M), который образуется субъединицами IL2R β и IL2R γ (CD122 и CD132); и высокоаффинный рецептор ($K_d \sim 10^{-11}$ M), который содержит три субъединицы IL2R α , IL2R β и IL2R γ . Только рецепторы с промежуточной аффинностью (IL2R $\beta\gamma$) и высокой аффинностью (IL2R $\alpha\beta\gamma$) являются функциональными, способными переносить сигналы к клетке (Stauber et. al., 2005, PNAS, 103(8):2788-2793; Wang, 2005, Science, 310(18):1159-1163).

Субъединицы IL2R β и IL2R γ присутствуют на эффекторных лимфоцитах иммунной системы, но стойкая экспрессия субъединицы IL2R α дает регуляторным Т-клеткам (Treg) высокоаффинный рецептор и, таким образом, предпочтительное применение IL2 in vivo (Malek, 2008, Annu. Rev. Immunol., 26:453-79). В наше

время известно, что часть ограничений относительно эффективности системного метода лечения с помощью ВД IL2 у раковых пациентов происходит из-за предпочтительного размножения Treg, которое индуцируется IL2, что, в свою очередь, ослабляет противоопухолевый иммунитет (Choo Sim et. al., 2014, J. Clin. Invest., 124(1):99-110).

Множество попыток было сделано для улучшения эффективности системного метода лечения рака с помощью ВД IL2. Несколько исследований показали, что возможной является мутация нативного IL2, чтобы или повысить, или снизить некоторые из его биологических свойств на основе дифференциальной экспрессии субъединиц рецептора IL2 на лимфоцитах (Skrombolas and Frelinger, 2014, Expert. Rev. Clin. Immunol., 10(2):207-217)). Начальные исследования были сфокусированы на повышении аффинности IL2 к IL2R α (Rao et al., 2003, Protein Engineering, 16(12):1081-1087). Хотя не было очевидно в то время, теперь оценили, что эта стратегия фактически дезактивирует иммунный ответ *in vivo* вследствие масштабной стимуляции Treg. Совсем недавно Levin и соавт. в 1992 г. получили мутанты IL2 с повышенным связыванием с субъединицей IL2R β , что предпочтительно активирует эффекторные клетки, которые сверхпродуцируют рецептор IL2 с промежуточной аффинностью (Levin et. al., 2012, Nature, 484(7395):529-33). Этот мутант, который называют «суперкин Н9», показал улучшенное *in vivo* противоопухолевое действие и меньшую токсичность, чем нативный IL2. Carmenate и соавт. сообщили про введение четырех мутаций в IL2 человека, что эффективно снижало аффинность к IL2R α без влияния на взаимодействие с димерным рецептором с промежуточной аффинностью (IL2R $\beta\gamma$). Этот мутант избегал размножения Treg при введении *in vivo* и был более эффективным и менее токсичным, чем нативный IL2, в мышиных моделях (Carmenate et. al., 2013, J. Immunol., 190(12): 6230-8). Два других мутанта IL2, а именно F42K и R38A, также сильно снижали аффинность связывания IL2 с IL2R α и показали меньшую эффективность при стимуляции Treg *in vitro*, хотя эффективно размножали LAK-клетки (Heaton et. al., 1994, Ann. Surg. Oncol., 1(3):198-203).

В другой попытке улучшения системного метода лечения с помощью ВД IL2 несколько работ фокусировались на увеличении периода полураспада путем его ПЭГилирования или его слияния с частью Fc антител (Ab). Конечно, некоторые из этих стратегий давали эффективное повышение срока жизни IL2 *in vivo* с позитивным влиянием на общее противоопухолевое действие (Zhu et. al., 2015; Cancer Cell, 27:498-501; Charych et. al., 2016, Clin. Cancer Res., 22(3):680-90).

Адоптивный перенос клеток (АПК) определяется как способ лечения, в котором клетки берутся от донора, культивируются и/или обрабатываются *in vitro*, а потом вводятся пациенту для лечения заболевания. Для лечения рака АПК часто включает перенос лимфоцитов (Gattinoni et. al., 2006, Nat. Rev. Immun., 6:383-393).

5 Три основных метода лечения преобладают на сегодняшний день: а) использование *ex vivo* размноженных лимфоцитов, которые инфильтруют опухоли (TIL); б) использование Т- или НК-клеток, полученных методами генной инженерии для экспрессии рецептора Т-клеток (TCR) с высокой аффинностью/авидностью к полученным из опухолевых антигенов пептидов; и в) использование Т- или НК-клеток, полученных методами инженерии для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), специфического к опухолевым антигенам. Часто последние стратегии объединяют с дополнительной генной инженерией перенесенных лимфоцитов для повышения их эффекторных функций *in vivo*; например, инжиниринг секреции соответствующих цитокинов, таких как IL12 и другие
10 (Cassian Y., 2018, Curr. Opin. Immunol., 51:197-203).
15

Несмотря на его способность индуцировать противоопухолевый иммунитет, широкое применение АПК для лечения имеет несколько хорошо известных ограничений. Хотя перенос опухолево-реактивных эффекторных Т-клеток может вызывать реальные ответы, есть сильное доказательство как у людей, так и мышей, которое показывает, что Т-клетки с фенотипом центральной памяти являются прекрасными медиаторами противоопухолевых реакций (Klebanoff et al., 2005, PNAS, 102(27):9571-6). Т-клетки центральной памяти представляют клетки, которые уже встречались с антигеном (CD44+), которые экспрессируют молекулу CD62L, необходимую для миграции в периферические лимфоузлы (Ridell et. al.,
20 2014, Cancer J., 20(2):141-144). Они дольше сохраняются *in vivo*, наиболее вероятно из-за их большей способности к пролиферации и секреции цитокинов, таких как IL2, при повторной встрече с антигеном (TCF1+). Наоборот, эффекторные Т-клетки памяти являются клетками, которые уже встречались с антигеном, со значительной дезактивацией молекулы CD62L, повышенной регуляцией ингибирующих рецепторов (PD1, TIM3, LAG3) и ухудшенным высвобождением цитокинов. Они имеют склонность к постепенному истощению *in vivo* (Kishton et. al. 2017, Cell. Metab., 26(1):94-109; Klebanoff et. al., 2005, PNAS, 102(27):9571-6). Таким образом, условия культивирования, которые промотируют размножение клеток с фенотипом
30 центральной памяти, является более желательным для разработки лучших раковых
35 иммунотерапий с АПК.

IL2 промотирует активацию и размножение Т-клеток и НК-клеток *in vitro*, таким образом он был основным игроком в разработке методов лечения рака с АПК. В более ранних стратегиях IL2 использовали для образования лимфокинактивированных клеток-киллеров (LAK). Совместное введение LAK с системным ВД IL2 повышало клинический ответ системной монотерапии. В другом подходе высокая концентрация IL2 использовалась для первичного размножения лимфоцитов, которые инфильтруют опухоли (TIL), из экстрактов опухолей. TIL подвергают дальнейшему быстрому размножению в присутствии IL2 вместе со стимуляцией TCR *in vitro*. Размноженные TIL вводят раковым пациентам инфузией вместе с системным режимом ВД IL2. Системный режим ВД IL2 способствует поддержанию *in vivo* стойкости перенесенных клеток. В качестве общего результата лечение с помощью TIL + ВД IL2 давало некоторые внушительные регрессии больших опухолей, но оставались известные ограничения системного метода лечения с помощью ВД IL2 (Rosenberg, 2014, J. Immunol., 192 (12) 5451-8).

Более свежая попытка повышения эффективности системного ВД IL2 в качестве вспомогательного вещества для АПК дала способ на основе ортогонализации рецептор-лиганд, используя мутантный цитокин IL2 и мутантный рецептор IL2, которые специфически связываются один с другим, но не с их человеческими аналогами дикого типа. С помощью этой стратегии авторы перенаправили специфичность IL2 на полученные методами инженерии Т-клетки, используя ортогональные пары цитокин IL-2-рецептор, для селективного размножения полученных методами инженерии перенесенных Т-клеток, но с ограниченной нецелевой активностью и незначительной токсичностью. Т-клетки орто-IL2R, размноженные в орто-IL2, были эффективными при уменьшении объема опухолей и повышении выживаемости при использовании в мышинной модели рака с АПК (Sokolosky et. al., 2018, Science, 359 (6379):1037-1042).

Несмотря на уникальную и эффективную роль IL2 для модуляции ответов Т-клеток, связанных с АПК, точный эффект IL2 (положительный или отрицательный) на размножение/дифференцировку Т-клеток памяти понятен не полностью. Клетки, размноженные *in vitro* в присутствии IL2, проявляют сильную эффекторную способность, что также сокращает их длительную стойкость и выживание *in vivo*. IL2 промотирует активацию и пролиферацию Т-клеток уникальным способом, однако, также индуцирует вызванную активацией гибель клеток (Spolski et. al., 2018, Nat. Rev. Immunol., (18) 648-659). Исследования показали, что снижение сигналинга IL2 при *in vitro* подвергании первичному действию антигена, может

способствовать размножению CD8+ Т-клеток памяти. Снижение сигналинга IL2 главным образом достигалось путем уменьшения концентрации IL2 или снижения времени воздействия при культивировании *in vitro*. Другие авторы частично заменяли использование IL2 другими цитокинами из общего семейства γ -цепей.

5 Множество стратегий для *in vitro* активации и размножения Т-клеток используют IL7, IL15 или IL21 в разных протоколах, но обычно вместе с некоторыми IL2 (Hinrichs et al., 2008; Blood, 111(11) 5326-5333; Mueller et al., 2008, Eur. J. Immunol., 38(10) 2874-85; Zeng et al., 2005, J. Exp. Med., 201(1) 139-48; Markley and Sadelain, 2010, Blood, 115(17) 3508-3519; Zhang et al., 2015, Clin. Cancer Res.,
10 21(10): 2278-88). Таким образом, IL2 остается стандартом для активации и размножения Т-клеток в иммунотерапиях с АПК.

Интересно, что сложность взаимодействия IL2/IL2R и его последствия касательно дифференцировки Т-клеток остаются неясными. В частности, влияние предпочтительного сигналинга через разные IL2R (с высокой относительно
15 промежуточной аффинностью) на размножение/дифференцировку лимфоцитов *in vitro* все еще неизвестно. Ни один из вышеуказанных мутеинов IL2 не использовался для размножения и дифференцировки Т-клеток *in vitro* для АПК и не использовался в стратегиях рациональной модификации взаимодействия IL2/IL2R для предпочтительного прямого сигналинга IL2 через одну из хорошо известных
20 функциональных форм IL2R.

Авторы настоящей заявки неожиданно обнаружили значительное преимущество при использовании разных средств/стратегий, которые путем разрыва взаимодействия IL2/IL2R α при активации/размножении клеток *in vitro* предпочтительно направляют сигналинг IL2 через IL2R с промежуточной
25 аффинностью. Такие средства/стратегии индуцируют эффективное размножение опухолеспецифичных клеток с заметным фенотипом центральной памяти и большой способностью специфично убивать антиген по сравнению с традиционными стратегиями культивирования, которые используют сигналинг нативного IL2 в тот же момент. Настоящее изобретение обеспечивает значительное
30 улучшение существующих протоколов для размножения/дифференцировки клеток *in vitro* перед их использованием для методов лечения с адоптивным переносом у онкобольных.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение обеспечивает *in vitro* или *ex vivo* способ обогащения и размножения лимфоцитов с фенотипом центральной памяти, который включает размножение лимфоцитов в образце, полученном от субъекта, или лимфоцитов, выделенных из такого образца, причем размножение включает активацию β/γ димерного рецептора IL-2.

Настоящее изобретение обеспечивает *in vitro* или *ex vivo* способ обогащения и размножения лимфоцитов с фенотипом центральной памяти, который включает размножение лимфоцитов в образце, полученном от субъекта, или лимфоцитов, выделенных из такого образца, причем размножение включает активацию β/γ димерного рецептора IL-2.

Настоящее изобретение обеспечивает способ обогащения и размножения лимфоцитов с фенотипом центральной памяти для применения в методах лечения с адоптивным переносом клеток, причем размножение включает активацию β/γ димерного рецептора IL-2.

Настоящее изобретение связано со способом размножения и/или дифференцировки популяций лимфоцитов с фенотипом центральной памяти, пригодных в методах лечения с адоптивным переносом клеток, который включает три стадии. Указанные стадии включают:

- i) экстракцию лимфоцитов из субъекта,
- ii) *in vitro* размножение лимфоцитов или необязательно лимфоцитов, которые были дополнительно модифицированы методами генной инженерии, в то же время индуцируя предпочтительный сигналинг через рецептор IL-2 с промежуточной аффинностью (который ниже называется смещенный на IL2R β/γ сигналинг IL2), и
- iii) перенос активированных/размноженных клеток субъекту с раком.

В частности, настоящей способ использует разные стратегии для индуцирования предпочтительного сигналинга через рецептор IL2 с промежуточной аффинностью (обеспечивая смещенный на IL2R β/γ сигналинг IL2), в то же время активируя/размножая лимфоциты. Эти стратегии могут быть одними из следующих:

- культивация лимфоцитов с помощью растворимого мутеина IL-2, который предпочтительно сигнализирует через IL2R с промежуточной аффинностью,
- генная модификация лимфоцитов для секреции мутеинов IL2, которые предпочтительно сигнализируют через IL2R с промежуточной аффинностью,

- культивация лимфоцитов с нативным IL-2, но:

а) добавляя фармакологическое средство, которое блокирует взаимодействие IL2-IL2R α , или

б) модифицируя методами генной инженерии лимфоциты для секреции растворимого белка, который блокирует взаимодействие IL2-IL2R α , или

в) модифицируя методами генной инженерии лимфоциты для снижения экспрессии субъединицы рецептора IL2R α (CD25) на поверхности клеток, или

г) модифицируя методами генной инженерии лимфоциты для повышения экспрессии рецептора IL-2 с промежуточной аффинностью на поверхности клеток.

10 Более конкретно:

Мутеины IL-2, которые используются в способе, включают те, которые описаны в US 9206243, которые соответствуют SEQ ID NO 1-6 настоящего изобретения; суперкин H9, раскрытый Levin и соавт. в 2012 г., который соответствует SEQ ID NO 7 настоящей заявки, а также мутеин F42, описанный в

15 SEQ ID NO 1 WO 2017/202786, который соответствует SEQ ID NO 8 настоящего изобретения. Но без ограничения этими молекулами (Levin et al. у: Nature (2012). 48: 529-535).

Фармакологические средства, которые используются и блокируют взаимодействие IL2-IL2R α , выбирают из: антитела или фрагмента антитела,

20 который связывается или с IL2R α , или с IL2; пептида или химически определенной небольшой молекулы, которая связывается или с IL2R α , или с IL2; растворимой формы IL2R α (CD25) или ее модифицированного варианта. Но без ограничения ими.

На стадии ii способа смещенный на IL2R $\beta\gamma$ сигналинг IL2 можно обеспечивать в разные моменты культивирования/размножения лимфоцитов. Смещенный на IL2R $\beta\gamma$ сигналинг IL2 можно обеспечивать все время или только часть времени при культивировании *in vitro*. Кроме того, смещенный на IL2R $\beta\gamma$ сигналинг IL2 может или не может поддерживаться после *in vivo* переноса клеток.

На стадии ii размножение лимфоцитов может или не может проводиться в присутствии других цитокинов, например, IL12, IL17, IL15 и IL21.

30 На стадии iii перенос клеток можно проводить в субъекта-донора стадии i или в другого субъекта.

В некоторых вариантах осуществления размножение лимфоцитов с фенотипом центральной памяти включает применение дополнительных гормонов,

цитокинов и условий культивирования, оптимизированных для размножения лимфоцитов.

Лимфоциты, подвергнутые действию способов, могут быть любыми из следующего: смесь Т-клеток, очищенные CD4 или CD8 Т-клетки, NK-клетки, NKT-клетки. Лимфоциты можно получать на стадии *i* из мононуклеаров периферической крови, дренирующих опухоли лимфатических узлов или инфильтратов опухолей.

Лимфоциты в способах могут или не могут быть дополнительно подвергнуты инжинирингу для: экспрессии CAR; экспрессии TCR желательной специфичности; экспрессии других рецепторов, которые представляют интерес, в клеточную мембрану; секреции разных цитокинов или растворимых белков, которые представляют интерес.

В общем, способ настоящего изобретения позволяет продлить стойкость перенесенных клеток и большой противоопухолевый эффект *ex vivo*, *in vitro* и *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления образец получают из дренирующих лимфатических узлов. В других вариантах осуществления образец представляет собой необработанный фрагмент опухоли, ферментативно обработанный фрагмент опухоли, диссоциированные/суспендированные опухолевые клетки, образец лимфоузла или образец телесной жидкости (например, кровь, асциты или лимфу).

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

В другом аспекте описанными в настоящем документе являются способы лечения опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, которые включают введение субъекту эффективного количества лимфоцитов, полученных способами, раскрытыми в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой опухоль жидких тканей.

Другим объектом настоящего изобретения является применение способа в методах лечения с адоптивным переносом клеток, в частности при получении лимфоцитов, которые инфильтруют опухоль, или химерного антигенного рецептора Т, и более конкретно в лечении рака.

Клетки, полученные способом настоящего изобретения, также являются объектом настоящего изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение обеспечивает *ex vivo* способ обогащения и размножения лимфоцитов с фенотипом центральной памяти, который включает размножение лимфоцитов в образце, полученном от субъекта, или лимфоцитов, выделенных из такого образца, причем размножение включает активацию β/γ димерного рецептора IL-2.

Настоящее изобретение обеспечивает *in vitro* способ обогащения и размножения лимфоцитов с фенотипом центральной памяти, который включает размножение лимфоцитов в образце, полученном от субъекта, или лимфоцитов, выделенных из такого образца, причем размножение включает активацию β/γ димерного рецептора IL-2.

Настоящее изобретение обеспечивает способ обогащения и размножения лимфоцитов с фенотипом центральной памяти для применения в методах лечения с адоптивным переносом клеток, причем размножение включает активацию β/γ димерного рецептора IL-2.

Настоящее изобретение основано на изменении сигналинга через рецептор IL2 на Т-лимфоцитах *ex vivo*, *in vitro* и *in vivo* для его использования в методах лечения с АПК. Настоящее изобретение предлагает сначала заменять нативный IL2 (и его нативный полученный сигнал), который используется для *in vitro* активации и размножения лимфоцитов, перед их переносом *in vivo*, на подобные на IL2 альтернативы, которые индуцируют предпочтительный сигналинг через рецептор IL-2 с промежуточной аффинностью (индуцируют смещенный на IL2R $\beta\gamma$ сигналинг IL2). Другими словами, подобные на IL2 альтернативы направлены на предпочтительное взаимодействие с димерным рецептором IL2 (IL2R $\beta\gamma$) и сигналинг через него. Такие альтернативы включают, помимо прочего, следующее:

- культивирование лимфоцитов с помощью растворимого мутеина IL-2, который предпочтительно взаимодействует и сигнализирует через IL2R с промежуточной аффинностью (IL2R $\beta\gamma$),

- модификацию методами генной инженерии лимфоцитов для секреции мутеинов IL2, которые предпочтительно сигнализируют через IL2R с промежуточной аффинностью,

- культивирование лимфоцитов в присутствии нативного IL-2, но:

а) добавляя фармакологическое средство, которое блокирует взаимодействие IL2-IL2R α , или

б) модифицируя методами генной инженерии лимфоциты для секреции растворимого белка, который блокирует взаимодействие IL2-IL2R α , или

в) модифицируя методами генной инженерии лимфоциты для снижения экспрессии субъединицы рецептора IL2R α (CD25) на поверхности клеток, или

5 г) модифицируя методами генной инженерии лимфоциты для повышения экспрессии рецептора IL-2 с промежуточной аффинностью на поверхности клеток.

Способы, раскрытые в настоящем документе, обеспечивают стратегии для генерации/размножения активированных лимфоцитов с фенотипом центральной памяти, высокоэффективных для борьбы с опухолями при переносе *in vivo*.

10 Настоящее изобретение представляет значительное улучшение существующих стратегий для методов лечения с АПК.

Культивирование лимфоцитов согласно способам настоящего изобретения можно проводить, используя подходящую культуральную среду и при подходящих условиях окружающей среды для *in vitro* культивирования иммуноцитов.

15 Размножение лимфоцитов можно также проводить в присутствии других цитокинов, например, IL12, IL17, IL15 и IL21. Размножение лимфоцитов можно проводить, следуя любому из известных протоколов в контексте АПК. На фазах культивирования, где нативный IL2 используется в этих протоколах, любая из подобных на IL2 альтернатив, подробно описанных в настоящем документе, используется для замены сигнала, который обеспечивается нативным IL2.

20 Лимфоциты в способах могут или не могут быть дополнительно подвергнуты инжинирингу для: экспрессии CAR; экспрессии TCR желательной специфичности; экспрессии других рецепторов, которые представляют интерес, в клеточную мембрану; секреции разных цитокинов или растворимых белков, которые представляют интерес.

Лимфоциты, подвергнутые действию способов, могут быть любыми из следующего: смесь Т-клеток, очищенные CD4 или CD8 Т-клетки, NK-клетки, NKT-клетки. Лимфоциты можно получать из РВМС, дренирующих опухоли лимфатических узлов или инфильтратов опухолей.

30 Термины «мутеин IL2», « $\rho\alpha$ -мутеин», « $\rho\alpha$ мутеин IL2», «мутеин IL-2», «частичный агонист IL2» или «мутант IL2» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и касаются мутированного белка интерлейкина 2 или модифицированного белка интерлейкина 2, причем мутации индуцируют активацию β/γ димерного рецептора IL-2, предпочтительно взаимодействуют с димерным рецептором IL2 (IL2R $\beta\gamma$), индуцируют смещенный на IL2R $\beta\gamma$ сигнал

35

IL2, имеют сниженную аффинность к IL2R α или имеют более высокую аффинность к β/γ рецептору IL2. Неограничивающие примеры этих мутированных или модифицированных мутеинов IL2 представляют собой последовательности 1-7.

5 Термины «лимфоциты» или «лимфоцит» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и касаются любой клетки, которая опосредует иммунитет животного, включая лимфоциты, лимфобласты и плазмоциты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения термины касаются класса лейкоцитов, которые несут вариабельные рецепторы клеточной поверхности для антигена и отвечают за адаптивные иммунные ответы. Они могут опосредовать
10 врожденный и адаптивный иммунный ответ. Они могут опосредовать гуморальный и клеточный иммунитет.

Стратегии, которые предлагаются в настоящем изобретении, можно использовать для терапевтических целей в методах лечения с АПК для лечения рака.

15 Настоящее изобретение обеспечивает способ лечения опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, который включает введение субъекту эффективного количества популяции лимфоцитов с фенотипом центральной памяти, полученных способами, раскрытыми в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой солидную опухоль (например, опухоль
20 яичника, меланому, опухоль легких, опухоль желудочно-кишечного тракта, опухоль груди). В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой опухоль жидких тканей (например, лейкоз или лимфому). В некоторых вариантах осуществления опухоль экспрессирует мутацию, которая соответствует по меньшей мере одному пептиду, который содержит опухолевый антиген. В
25 некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

Применение модифицированных методами инженерии цитокинов, полученных из IL2, которые предпочтительно взаимодействуют и, таким образом, сигнализируют через IL2R с промежуточной аффинностью (IL2R $\beta\gamma$)

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к
30 специфично направленному сигналингу IL2 через димерный рецептор IL2 с промежуточной аффинностью – IL2R $\beta\gamma$ – при протоколах активации и размножения Т-клеток, используя мутеины IL2. Мутеины IL2 включают, помимо прочего, варианты со сниженной аффинностью взаимодействия с IL2R α , например, описанные в US 9206243; варианты с повышенной аффинностью взаимодействия с
35 IL2R β , например, суперкин Н9, описанный у Levin и соавт., 2012 г.; или варианты с

комбинацией обоих (меньшая аффинность взаимодействия с IL2R α , большая с IL2R β). Лимфоциты активируются этими мутеинами в сочетании с конкретным сигналингом TCR, активацией CD3/CD28 и/или другими цитокинами выживания. Этот подобный IL2 сигнал можно поддерживать все время при культивировании или можно использовать на конкретных фазах культивирования, предпочтительно его можно обеспечивать в самый первый момент активации. Мутеины можно использовать в диапазоне концентрации от 1 нг/мл до 1 мг/мл.

Размножение лимфоцитов можно проводить, следуя любому из известных протоколов в контексте АПК. Но на фазах культивирования, где нативный IL2 используется в исходном протоколе, мутеин IL2 добавляется вместо этого. Например, это может быть протокол, который основан только на культивировании клетки с антителами против CD3/CD28 и мутеином IL2, или он может объединять мутеин IL2 с другими цитокинами, такими как IL7, IL15, IL12 и IL21.

Модифицирование методами генной инженерии лимфоцитов для секреции мутеинов IL2, которые предпочтительно сигнализируют через IL2R с промежуточной аффинностью (IL2R $\beta\gamma$)

Другие варианты осуществления настоящего изобретения относятся к генной модификации лимфоцита для секреции любых мутеинов IL2, указанных в настоящем изобретении. Модификация лимфоцитов может проводиться с помощью любых хорошо описанных способов трансфекции или трансдукции, которые широко используются в контексте технологии АПК. Например, этого можно достичь с помощью методик редактирования генома или вирусных векторов для введения на Т-клетки конструкта с геном для мутеина. Конструкты могут также содержать репортерный белок, чтобы легко выявлять эффективность трансдукции, и ген, стойкий к антибиотику, для обогащения трансдуцированной фракции.

Эффективность трансфекции/трансдукции будет высокой. По меньшей мере достаточно высокой для обеспечения того, что лимфоциты обеспечивают себе аутокринный смещенный на IL2R $\beta\gamma$ -IL2 сигналинг при *in vitro* размножении. Эта конкретная процедура может придавать лимфоцитам доступность смещенного на IL2R $\beta\gamma$ сигналинга IL2 после переноса *in vivo*, дополнительно способствуя стойкости и противоопухолевой способности клеток.

Размножение клеток модифицированных методами инженерии лимфоцитов может следовать любому из указанных протоколов в контексте АПК, но без добавления любого нативного IL2 к культуре. Например, лимфоциты можно

активировать конкретным сигналингом TCR, отдельно активацией CD3/CD28 и/или дополнять цитокинами выживания, такими как IL7, IL15 и IL21.

Добавление фармакологического средства, которое разрывает взаимодействие IL2-IL2R α , в культуры лимфоцитов

5 Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к разным путям фармакологического разрыва взаимодействия IL2/IL2R α , когда нативный IL2 используется при *in vitro* размножении лимфоцитов для АПК. Добавление такого фармакологического средства превращает сигнал нативного IL2 в смещенный на IL2R $\beta\gamma$ сигнал IL2 путем блокирования доступа IL2 к тримерному IL2R с высокой
10 аффинностью.

Протокол активации/размножения может объединять конкретный сигналинг TCR, активацию CD3/CD28 и другие цитокины, которые представляют интерес. Фармакологическое средство и IL2 будут использоваться всегда вместе и добавляться на культуру одновременно. Полученный смещенный на IL2R $\beta\gamma$ сигнал
15 IL2 можно поддерживать все время при культивировании или можно использовать на конкретных фазах культивирования, предпочтительно его можно обеспечивать в самом первом периоде активации. Фармакологическое средство следует использовать в избытке для усиления его блокирующей способности. Конкретные количества следует калибровать в индивидуальном порядке, проверяя способность
20 блокирования связывания IL2 с CD25.

Фармакологические средства, которые используются для блокирования взаимодействия IL2-IL2R α в настоящем изобретении, включают, помимо прочего: антитело или фрагмент антитела, который связывается или с IL2R α , или с IL2; пептид или химически определенную небольшую молекулу, которая связывается
25 или с IL2R α , или с IL2; растворимую форму IL2R α (CD25) или ее модифицированный вариант.

В случае фармакологических средств, которые связываются с IL2, их следует проверять на способность блокировать только взаимодействие с IL2R α , без влияния на связывание и сигналинг через IL2R $\beta\gamma$. Эти средства можно добавлять
30 отдельно в IL2 при культивировании, но их также можно смешивать с IL2 предварительно для облегчения образования желаемого комплекса.

Размножение лимфоцитов в этом варианте осуществления можно проводить, следуя любому из известных протоколов в контексте АПК. Но на фазах культивирования, где нативный IL2 используется в исходном протоколе, также
35 добавляется фармакологическое средство. Например, это может быть протокол,

который основан только на культивировании клеток с mAb против CD3/CD28 и блокирующим средством для IL2+, или он может объединять блокирующее средство для IL2+ с другими цитокинами, такими как IL7, IL15, IL12 и IL21.

5 Модифицирование методами инженерии лимфоцитов для секреции растворимого белка, который блокирует взаимодействие между IL2 и IL2R α

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к генной модификации лимфоцита для секреции растворимого белка, который специфически блокирует взаимодействие между IL2 и IL2R α . Модификация лимфоцитов может проводиться с помощью любых хорошо описанных способов трансфекции или
10 трансдукции, которые широко используются в контексте технологии АПК. Например, этого можно достичь с помощью методик редактирования генома или вирусных векторов для введения на Т-клетки конструкта с геном для желаемого белка. Эффективность трансфекции/трансдукции будет высокой. По меньшей мере, достаточно высокой для обеспечения того, что лимфоциты продуцируют
15 достаточно растворимого белка, чтобы в значительной степени блокировать взаимодействие IL2-IL2R α , обеспечивая для них самих смещенный на IL2R β γ сигналинг IL2 при *in vitro* размножении.

Белок, который можно использовать для блокирования взаимодействия IL2-IL2R α в настоящем изобретении, включает, помимо прочего: антитело или
20 фрагмент антитела, который связывается или с IL2R α , или с IL2; растворимую форму IL2R α (CD25) или любой модифицированный вариант.

Размножение лимфоцитов в этом варианте осуществления можно проводить, следуя любому из известных протоколов в контексте АПК. В этом случае без каких-либо изменений, помимо тех, которые жестко необходимы для получения
25 методами инженерии клеток. Например, при культивировании клеток с антителами против CD3/CD28 и IL2, или он может объединять IL2 с другими цитокинами, такими как IL7, IL15, IL12 и IL21.

30 Модифицирование методами генной инженерии лимфоцитов для снижения экспрессии субъединицы рецептора IL2R α (CD25) на поверхности клеток

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к генной модификации лимфоцитов для снижения экспрессии IL2R α на поверхности клеток. Для модифицирования методами генной инженерии клеток можно использовать несколько стратегий, включая, помимо прочего, интерференционную РНК,
35 методики редактирования генома и стратегии нокаута. Модификацию лимфоцитов

можно проводить с помощью любых хорошо описанных способов трансфекции или трансдукции, которые широко используются в контексте технологии АПК. Например, снижения или полного подавления экспрессии CD25 на лимфоцитах можно достичь с помощью вирусных векторов для введения на клетки конструкта с shRNA, которая нацелена на ген для CD25.

Размножение лимфоцитов в этом варианте осуществления можно проводить, следуя любому из известных протоколов в контексте АПК. В этом случае без каких-либо изменений, кроме тех, которые жестко необходимы для получения методами генной инженерии клеток. Например, полученные методами инженерии клетки можно культивировать с антителами против CD3/CD28 и IL2, или они могут объединять IL2 с другими цитокинами, такими как IL7, IL15, IL12 и IL21.

Модифицирование методами генной инженерии лимфоцитов для повышения экспрессии рецептора IL-2 с промежуточной аффинностью на поверхности клетки

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к генной модификации лимфоцитов для повышения экспрессии димерного рецептора IL2R $\beta\gamma$ на поверхности клеток. Этого можно достичь с помощью использования вирусных векторов для введения на Т-клетки конструктов с геном CD122 (цепь IL2R β) или геном CD132 (цепь IL2R γ) под действием промоторов конститутивной экспрессии. Альтернативно, для этой стратегии Т-клетки можно модифицировать для экспрессии мутированного CD122 (цепь IL2R β) с повышенной аффинностью к IL2 вместо нативного CD122. Этого можно достичь с помощью методик редактирования генома или вирусных векторов для введения на лимфоциты конструкта с геном для мутированного или дикого типа CD122.

Для описанных стратегий конструкты могут также содержать репортерный белок, чтобы легко выявлять эффективность трансдукции, и ген, стойкий к антибиотику, для обогащения трансдуцированной фракции.

Размножение лимфоцитов в этом варианте осуществления можно проводить, следуя любому из известных протоколов в контексте АПК. В этом случае без каких-либо изменений, помимо тех, которые жестко необходимы для получения методами генной инженерии клеток. Например, полученные методами инженерии клетки можно культивировать с антителами против CD3/CD28 и IL2, или они могут объединять IL2 с другими цитокинами, такими как IL7, IL15, IL12 и IL21.

Способы лечения

В родственном аспекте раскрытым в настоящем изобретении является способ лечения опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, который включает введение субъекту эффективного количества популяции лимфоцитов, которые продуцируются способами, раскрытыми в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления опухоли представляют собой солидные опухоли. В некоторых вариантах осуществления опухоли представляют собой опухоли жидких тканей (например, рак крови).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фиг. 1. Сравнение фенотипа Т-клеток, полученных при культивировании с нативным IL2 или с мутеином IL2, которые дают предпочтительный сигналинг через IL2R $\beta\gamma$. А) Выживание культур, Б) Процент клеток памяти и эффекторных клеток.

Фиг. 2. Сравнение фенотипов, выделенных на Т-клетках при культивировании с нативным IL2 или мутеином IL2, которые предпочтительно проводят сигнал через рецептор IL2R $\beta\gamma$ с промежуточной аффинностью в широком диапазоне доз. А) Выживание культур, Б) Процент PD1 положительных клеток и В) Процент клеток с фенотипом типа центральной памяти.

Фиг. 3. Сравнение фенотипов, выделенных на Т-клетках при культивировании с нативным IL2 или мутеином IL2, которые предпочтительно проводят сигнал через рецептор IL2R $\beta\gamma$ с промежуточной аффинностью, объединенный с цитокинами IL7 и IL15. А) Выживание культур, Б) Процент клеток памяти и эффекторных клеток.

Фиг. 4. Сравнение фенотипа, выделенных на Т-клетках при культивировании с нативным IL2 или мутеином IL2, которые предпочтительно проводят сигнал через рецептор IL2R $\beta\gamma$ с промежуточной аффинностью, в широком диапазоне доз, объединенный с IL7 и IL15. А) Выживание культур, Б) Процент PD1 положительных клеток и В) Процент клеток с фенотипом типа центральной памяти.

Фиг. 5. Сравнение фенотипов, выделенных на Т-клетках при стимуляции с помощью только IL2 или мутеина IL2 или с помощью IL2 или мутеина IL2, объединенного с IL7 и IL15.

Фиг. 6А. Гистограммы, которые показывают процент положительных клеток eGFP, что измеряет эффективность трансдукции для IL2 или мутеина IL2 в Т-клетках.

Фиг. 6В. Сравнение процента клеток с фенотипом центральной памяти и эффекторной памяти в культурах, когда Т-лимфоциты трансдуцировали для продуцирования нативного IL2 или мутеина IL2.

Фиг. 7А. Гистограммы, которые показывают эффективность дезактивации CD25 после трансдукции с разными конструктами shRNA.

Фиг. 7В. Процент клеток с фенотипом центральной памяти и эффекторной памяти, когда Т-лимфоциты имеют сниженную экспрессию CD25.

Фиг. 8. Сравнение эффекта обеспечения смещенного на IL2R $\beta\gamma$ сигналинга IL2 при использовании антитела против CD25 на CD8⁺ Т-клетках А) Выживание культур, Б) Процент клеток памяти и эффекторных клеток.

Фиг. 9. Функциональная способность CD8⁺ Т-клеток с IL2 отдельно, IL2+IL15+IL7, мутеином IL2 отдельно или мутеином IL2+IL15+IL7. А) Продуцирование гранзима β OT1 CD8⁺ Т-клетками, повторно стимулированными пептидом SIINFEEKL, Б) Способность уничтожать опухоли против клеток B16-OVA клеток OT1, культивированных с IL2, мутеином IL2 отдельно или вместе с IL7 и IL15.

Фиг. 10. Измерение объема опухолей у животных, которые имеют опухоль MB16OVA, которые принимали клетки OT1, культивированные с нативным IL2 или мутеином IL2.

Фиг. 11. Сравнение противоопухолевого *in vivo* эффекта OT1 Т-клеток, трансдуцированных для продуцирования нативного IL2 или мутеина IL2, который предпочтительно сигнализирует через рецептор IL2R $\beta\gamma$ с промежуточной аффинностью. А) Объем опухолей, Б) Выживание с течением времени.

Фиг. 12. Определение характеристик CD8⁺ TIL перед и после культивирования с IL2 или мутеином IL2: А) Уровень размножения, Б) Процент экспрессии Ki-67 TIL и В) Распределение наивных Т-клеток (CD62L+CD44-), клеток центральной памяти (CD62L+CD44+) и (CD62L-CD44+).

Фиг. 13. Определение характеристик CD8⁺ TIL перед и после культивирования с IL2 или мутеином IL2: А) Процент экспрессии ингибирующих маркеров и Б) IFN γ , TNF α и гранзим β .

Фиг. 14. Размножение NK-клеток в TIL, культивированных с IL2 или мутеином IL2: А) Процент NK-клеток и Б) Количество NK-клеток.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Замещение нативного IL2 мутеином IL2, который предпочтительно сигнализирует через IL2R β , сохраняет жизнеспособность лимфоцитов и придает подобный центральной памяти фенотип

5 CD8⁺ Т-клетки выделяют из наивной OT1 селезенки мыши. Прокрытые антителами против CD3/против CD28 шарики используются в качестве стимуляции TCR в течение семи дней вместе с нативным IL2 или мутеином IL2 в течение 10 дней, последний получен в Центре молекулярной иммунологии (партия 1201602), который стал известным в SEQ ID NO 6 патента US 9206243. Каждые два дня культуру размножали для поддержания плотности 1×10^6 и цитокины добавляли со свежей средой. Наблюдали успешное размножение большого количества Т-клеток, которое достигалось как при условиях культивирования, так и подобного кратного увеличения количества клеток. Фиг. 1А показывает, что жизнеспособность в культуре улучшается при использовании мутеина IL2 по сравнению с нативным IL2 (p < 0,0001). Кроме того, количество клеток памяти и экспрессию ингибирующих маркеров измеряли цитометрией в потоке. Довольно высокий процент клеток с фенотипом типа центральной памяти (определенный с помощью CD62L⁺/CD44⁺) наблюдали в клетках при использовании мутеина IL2 по сравнению с нативным IL2 (фиг. 1Б). Фенотипический анализ маркеров PD-1, Lag-3, Tim-3 и Tigit показал, что клетки, активированные мутеином IL2, подавляли экспрессию лигандов контрольной точки иммунного ответа (PD-1, Lag-3, Tim-3, Tigit) (таблица 1).

Таблица 1. Экспрессия маркеров истощения (процент положительных клеток),

25 когда нативный IL2 или мутеин IL2 используют для *in vitro* активации/размножения Т-клеток

Маркер	Нативный IL-2	Мутеин IL-2
PD1	2,61	0,38
TIM3	17,0	0,42
Lag3	79,9	15,9
Klrg1	12,4	0,06

Описанный эффект относительно жизнеспособности (фиг. 2А), экспрессии PD1 (фиг. 2Б) и экспрессии CD62L (фиг. 2В) является соответствующим в широком диапазоне доз как для нативного IL2, так и мутеина IL2.

Взятые вместе эти результаты показывают, что замещение нативного IL2 мутеином IL2 с предпочтительной стимуляцией IL2R $\beta\gamma$ промотирует фенотип центральной памяти, а не хорошо описанный эффекторный фенотип, индуцированный нативным IL2. Мутеин IL2 больше, чем нативный IL2, придает потенциал для лимфоидной рециркуляции (большая экспрессия CD62L) и стойкость к истощению (меньшая экспрессия PD1), более желанный фенотип для *in vivo* переноса.

Пример 2. Замена нативного IL2 мутеином IL2, который предпочтительно сигнализирует через IL2R $\beta\gamma$, способствует фенотипу центральной памяти в объединенных протоколах культивирования с IL7 и IL15

Как было ранее описано другими авторами, комбинация IL7 и IL15 с IL2 улучшает состояние Т-клеток в сравнении с IL2 отдельно (Redeker and Arens, 2016, Front Immunol. 6(7): 345). В нашем эксперименте нативный IL2 или мутеин IL2 объединяли в культуре с IL7 и IL15 для протокола активации/размножения ОТ-I Т-клеток.

В этой стратегии использовали такую же стимуляцию TCR, как описано в примере 1. Нативный IL2 или мутеин IL2 добавляли в начале культивирования до 5^{ого} дня, затем клетки выдерживали в IL7/IL15 в течение 10 дней. В этом сценарии оба условия культивирования давали аналогичную плотность клеток в культуре, высокую жизнеспособность (фиг. 3А) и способствовали распространению клеток памяти, а не эффекторных клеток. Однако использование мутеина IL2 показало более высокую долю клеток центральной памяти в культуре по сравнению с нативными IL2 ($p < 0,0015$), как показано на фиг. 3Б.

В то же время клетки, которые культивировали с мутеином, показали более низкую экспрессию маркеров истощения, как показано в таблице 2.

Таблица 2. Экспрессия маркеров истощения (процент положительных клеток), когда нативный IL2 или мутеин IL2 используют для *in vitro* активации/размножения Т-клеток совместно с IL7 и IL15

Маркер	Нативный IL-2	Мутеин IL-2
--------	---------------	-------------

PD1	1,69	0,48
TIM3	10,3	0,18
Lag3	84,3	21,1
Klrg1	6,07	0,05

Оценка разных концентраций в культуре как для нативного IL2, так и мутеина IL2 совместно с IL7/IL15 показала, что описанные эффекты согласуются в широком диапазоне доз касательно жизнеспособности (фиг. 4А), экспрессии PD1 (фиг. 4Б) и подобного центральной памяти фенотипа (фиг. 4В).

Хотя комбинация нативного IL2 с IL7 и IL15 улучшает условия культивирования по сравнению с нативным IL2 отдельно, никакого улучшения не наблюдали для мутеина IL2 при использовании объединенных протоколов, поскольку мутеин IL2 отдельно является высокоэффективным в отношении сохранения жизнеспособности Т-клеток и индуцирования фенотипа центральной памяти. Кроме того, мутеин IL2 отдельно является настолько же эффективным, как комбинация IL2, IL7 и IL15, при индуцировании подобного центральной памяти фенотипа на активированных Т-клетках (фиг. 5).

Пример 3. Модифицированные методами генной инженерии Т-клетки, которые продуцируют мутеин IL2, который предпочтительно сигнализирует через IL2R $\beta\gamma$, приобретая фенотип центральной памяти

Для получения непрерывного источника поддержки цитокинов как *in vitro*, так и *in vivo* мы создавали методами генной инженерии Т-клетки для продуцирования мутеина IL2, который предпочтительно активирует рецептор IL2 с промежуточной аффинностью. Используют ретровирусные конструкции, которые кодируют повышенный зеленый флюоресцентный белок (eGFP) и нативный IL2 или мутеин IL2. Процедура трансдукции начинается путем стимуляции свежесыведенных наивных ОТ-I Т-клеток с покрытыми антителом против CD3/против CD28 шариками и нативным IL2 или мутеином IL2. Концентрированный супернатант ретровирусного вектора добавляют в 24 и 48 часов в покрытый ретронектином планшет с клетками. После трансдукции стимуляция TCR с покрытыми антителом против CD3/против CD28 шариками поддерживается в течение семи дней вместе с IL7 и IL15 в течение 10 дней. Эффективность трансдукции подтверждали экспрессией eGFP, и она была выше

80% для обоих конструктов (фиг. 6А). Секретированную молекулу выявляли с помощью иммуноферментного анализа (нативный IL2 или мутеин IL2).

Подобным образом относительно того, который наблюдали когда ОТ1 Т-клетки культивировали с растворимым мутеином IL2, клетки, которые получали методами инженерии для продуцирования мутеина IL2, имели фенотип памяти в 5 большем проценте по сравнению с клетками, которые получали методами инженерии для продуцирования нативного IL2, которые были главным образом эффекторными клетками ($p < 0,0001$) (фиг. 6Б). Также клетки, которые получали методами инженерии для продуцирования мутеина IL2, имели меньше маркеров истощения по сравнению с клетками, которые получали методами инженерии для 10 продуцирования нативного IL2 (таблица 3).

Таблица 3. Экспрессия маркеров истощения (процент положительных клеток), когда Т-клетки получали методами инженерии для продуцирования нативного IL2 15 или мутеина IL2

Маркер	Нативный IL-2	Мутеин IL-2
PD1	3,02	0,67
TIM3	17,0	0,35
Lag3	80,1	36,2

Взятые вместе эти результаты подтверждают гипотезу, что стимуляция через IL2R $\beta\gamma$ с помощью мутеина IL2 способствует дифференцировке центральной памяти с помощью этого нового способа культивирования, когда подобный на IL2 20 сигналинг является постоянным и поддержанным.

Пример 4. Генный инжиниринг для дезактивации экспрессии CD25 способствует фенотипу центральной памяти на Т-клетках, размноженных с нативным IL2

Использовали векторы, которые кодируют eGFP и малые РНК, которые образуют шпильки (shRNA), которые нацелены на *il2ra*, с целью блокирования 25 экспрессии гена альфа-цепи IL2 (CD25). Процедура трансдукции начинается путем стимуляции свежесыведенных наивных ОТ-I Т-клеток с покрытыми антителом против CD3/против CD28 шариками и нативным IL2. Три разные конструкции для shRNA использовали, получая переменные эффективности нокдауна на основе

поверхностной экспрессии CD25. Трансдукция с лентивирусом, который содержит scramble shRNA, использовалась в качестве контроля. После двух циклов трансдукции клетки сохранялись в культуре в течение 5 дней с нативным IL2 (50 ед./мл). Восстановление поверхностной экспрессии CD25 после трансдукции с 5 различными конструктами оценивали путем цитометрии в потоке (фиг. 7А). Процент клеток центральной памяти через пять дней стимуляции нативным IL2 был лучшим, когда достигалась лучшая дезактивация CD25 (фиг. 7Б).

Дезактивация CD25 на Т-клетках обеспечивает сценарий для предпочтительной стимуляции рецептора IL2R $\beta\gamma$ с промежуточной аффинностью, 10 используя при культивировании нативный IL2. При этих условиях дифференцировка CD8⁺ Т в подобный на центральную память фенотип является благоприятной.

Пример 5. Фенотип центральной памяти получают, когда клетки стимулируют нативным IL2, но взаимодействие CD25 блокируется фармацевтическим средством, добавленным одновременно на культуру 15

В другой попытке для предпочтительного прямого сигналинга нативного IL2 через рецептор IL2R $\beta\gamma$ с промежуточной аффинностью фармацевтическое средство добавляют на культуру вместе с нативным IL2 при *in vitro* активации Т-клеток. Фармакологическое средство добавляют в высокой концентрации для 20 гарантирования блокирующего эффекта. ОТ-I Т-клетки культивируют с покрытыми антителом против CD3/против CD28 шариками, 50 МЕ/мл IL2 и 10 мкг/мл моноклонального антитела против CD25 (клон 3С7 BioLegend). Антитело против CD25 добавляют с 0 дня и обновляют при добавлении свежей среды с нативным IL2 каждые два дня. Антитело с несоответствующей специфичностью используют в 25 качестве изотипного контроля. Определение фенотипа клеток после 10 дней культивирования открыли, что добавление антитела против CD25 в ходе активации нативного IL2 повышает жизнеспособность клеток (фиг. 8А) и популяцию типа центральной памяти (фиг. 8Б) ($p < 0,0001$) по сравнению с изотипным контролем. Кроме того, когда взаимодействие нативного IL2 с CD25 разрывается с помощью 30 антитела, получается меньшая экспрессия маркеров истощения (таблица 4).

Таблица 4. Экспрессия маркеров истощения (процент положительных клеток), когда Т-клетки стимулируют нативным IL2, но взаимодействие с CD25 разрывается антителом против CD25

Маркер	Изотипный контроль	Антитело против CD25
PD1	4,12	3,33
TIM3	18,5	0,54
Lag3	80,2	21,3

Вместе эти результаты показывают, что направляя сигналинг нативного IL2 через IL2R $\beta\gamma$ путем ухудшения взаимодействия с CD25 клетки направляются на фенотип центральной памяти, который является более пригодным для методов
5 лечения с адоптивным переносом клеток.

Приклад 6. OT-I Т-клетки, которые получают предпочтительную активацию через димерный рецептор IL2R $\beta\gamma$, являются полифункциональными и показывают эффективную специфическую к антигену цитотоксичность Т-клеток *in vitro*

10 Для оценки функциональной способности Т-клеток центральной памяти, активированных путем IL2R $\beta\gamma$, проводили анализ цитотоксичности. Клетки OT1, активированные, как описано в примерах 1, 3, стимулировали в течение 16 часов с родственным пептидом SIINFEEKL и проводили анализ цитометрией в потоке для определения продуцирования гранзима β . Для оценки способности к уничтожению
15 OT-I Т-клеток клетки вместе культивировали с клетками B16 меланомы, трансдуцированными для экспрессии псевдоантигена OVA на поверхности (B16-OVA) в пропорции 1:1. Нетрансдуцированные клетки B16 меланомы использовали в качестве контроля. Реагент IncuCyteCytotox добавляли и способность к уничтожению оценивали каждые два часа в течение 60 часов. Лизис целевых
20 клеток был антигенспецифическим из-за того, что лизис не наблюдали в контрольных клетках.

OT1 клетки, активированные мутеином IL2, который предпочтительно сигнализирует через IL2R $\beta\gamma$, показали *ex vivo* эффективную направленную активность лизиса, показывая, что когда сигнал проходит через IL2R $\beta\gamma$, клетки
25 дифференцируются в сильные клетки-киллеры (фиг. 9А и Б).

Пример 7. Т-клетки, которые принимают предпочтительную активацию через димерный рецептор IL2R $\beta\gamma$, показывают лучшую противоопухолевую активность, когда используются для АПК в модели меланомы

Модель OT1 вместе с клеточной линией опухоли B16/OVA является одной из наиболее используемых моделей и представляет релевантную доклиническую аппроксимацию АПК. Мыши-реципиенты C57BL/6 получали подкожную инъекцию 1×10^6 клеток меланомы, которые экспрессируют OVA, в 0 день и через десять дней после инокуляции клеток опухоли; мышей сублетально облучали (5Gy).

Группа 1: не получала лечение (контрольная группа).

Группа 2: получала OT1 Т-клетки, активированные нативным IL2 (как в примере 1).

Группа 3: получала OT1 Т-клетки, активированные мутеином IL2 (как в примере 1).

Группа 4: получала OT1 Т-клетки, активированные нативным IL2+IL7+IL15 (как в примере 2).

Как показано на фиг. 10, АПК с клетками, подвергнутыми первичному действию мутеина IL2, лучше контролировали рост опухоли по сравнению с активированными нативным IL2 клетками. Вместе эти результаты показывают, что изначально индуцированный фенотип памяти с низкими маркерами истощения, полученными с помощью активации мутеином IL2, был эффективной комбинацией для борьбы с опухолями *in vivo*.

Пример 8. Т-клетки, модифицированные методами инженерии для секреции мутеина IL2, который предпочтительно сигнализирует через IL2R $\beta\gamma$, показали сильную противоопухолевую активность при использовании для АПК

При попытке улучшить эффективность АПК мы получили методами инженерии Т-клетки для продуцирования мутеина IL2. Вставка гена позволяет непрерывный и длительный сигналинг мутеина IL2 на Т-клетках, не только *in vitro*, но и также *in vivo*. Мыши-реципиенты C57BL/6 получали подкожную инъекцию 1×10^6 клеток меланомы, которые экспрессируют OVA, в 0 день и через десять дней после инокуляции клеток опухоли; мышей сублетально облучали (5Gy). Животных делили на три группы лечения, и в 11 и 15 день они получали внутривенный перенос 1×10^6 Т-клеток от мышей OT1 следующим образом:

Группа 1: не получала лечение (контроль).

Группа 2: получала нативный IL2_полученные методами инженерии OT1 Т-клетки (как в протоколе трансдукции, описанном в примере 3).

Группа 3: получала мутеин IL2_полученные методами инженерии OT1 Т-клетки (как в протоколе трансдукции, описанном в примере 3).

Как показано на фиг. 11, мыши, которые получали OT1 Т-клетки, полученные методами инженерии для продуцирования мутеина IL2, испытывали хороший контроль над установленными опухолями (фиг. 11А) и более высокую выживаемость (фиг. 11Б).

5 **Пример 9. Образование ТИЛ с помощью мутеина IL2**

Поскольку методы лечения с АПК можно проводить, используя ТИЛ, мы оценили эффекты мутеина IL2 на размножение ТИЛ. Для изучения роли активации β/γ димерного рецептора IL2 в инфильтрующей опухоли лимфоцитах опухоли MC38 выделяли из мышей C57BL/6 между 19-21 днями после инокуляции клеток опухоли. Опухоли механически диссоциировали и культивировали в присутствии IL2 или мутеина IL2 в течение 14-16 дней. Мы выявили, что размножение ТИЛ было более высоким, когда мутеин IL2 использовали при условиях культивирования. Следовательно, мутеин IL2 повышал скорость пролиферации ТИЛ относительно маркера ki67 (фиг. 12А и Б). Кроме того, ТИЛ, культивированные *ex vivo* с мутеином IL2, показали значительное размножение подобных на центральную память Т-клеток по сравнению с контролями (фиг. 12В). В общем, эти данные показали, что мутеин IL2 индуцирует размножение CD8⁺ ТИЛ, способствуя дифференцировке фенотипа центральной памяти.

20 **Пример 10. ТИЛ, размноженные с мутантным IL-2, являются полифункциональными и показывают снижение активации и маркеров истощения**

ТИЛ, полученные с помощью методики примера 9, характеризовали функционально и фенотипически перед размножением, их стимулировали в течение 4 часов в присутствии антител против CD3 и против CD2.

25 Мы выявили, что ингибирующие рецепторы PD-1, Lag-3 и Tim-3 были существенно сниженными в ТИЛ при размножении с помощью мутеина IL2 по сравнению с ТИЛ, размноженными с нативным IL2 (фиг. 13А). ТИЛ также анализировали относительно их функциональности (фиг. 13Б). Вместе эти данные показывают способность мутеина IL2 размножать ТИЛ и обогащать их на фенотип типа центральной памяти без ухудшения их функциональности.

30 **Пример 11. Образование НК-клеток с ТИЛ, используя мутантный IL-2**

Для изучения роли активации β/γ димерного рецептора IL2 в доле НК-клеток среди всех размноженных ТИЛ, опухоли MC38 выделяли из мышей C57BL/6 между 19-21 днями после инокуляции клеток опухоли. Опухоли механически диссоциировали и культивировали в присутствии нативного IL2 или мутеина IL2 в

течение 14-16 дней. ТП, культивированные *ex vivo* с мутеином IL2, показали значительное размножение NK-клеток по сравнению с нативными IL2 относительно доли от общего количества (фиг. 14А) и относительно абсолютного количества (фиг. 14Б).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ дифференцировки и размножения Т-лимфоцитов и НК-клеток с фенотипом центральной памяти, пригодных в методах лечения с адоптивным переносом клеток, который включает три стадии:

i) экстракция лимфоцитов из субъекта,

ii) *in vitro* размножение и дифференцировка Т-лимфоцитов и НК-клеток, которые были дополнительно модифицированы методами генной инженерии, в то же время индуцируя предпочтительный сигналинг через рецептор IL-2 с промежуточной аффинностью (IL2R $\beta\gamma$), и

iii) перенос активированных клеток субъекту с раком.

2. Способ по п. 1, в котором стратегию индуцирования предпочтительного сигналинга через рецептор IL2 (IL2R $\beta\gamma$) с промежуточной аффинностью при размножении лимфоцитов выбирают из группы, которая содержит:

- культивирование лимфоцитов с помощью растворенного мутеина IL-2, который предпочтительно взаимодействует и сигнализирует через IL2R с промежуточной аффинностью (IL2R $\beta\gamma$),

- модифицирование методами генной инженерии лимфоцитов для секреции мутеинов IL2, которые предпочтительно взаимодействуют и сигнализируют через IL2R с промежуточной аффинностью,

- культивирование Т-лимфоцитов и НК-клеток в присутствии нативного IL-2 и фармакологического средства, которое блокирует взаимодействие IL2-IL2R α ,

- культивирование Т-лимфоцитов и НК-клеток в присутствии нативного IL-2 и модифицирование методами генной инженерии таких клеток для секреции растворимого белка, который блокирует взаимодействие IL2-IL2R α ,

- культивирование Т-лимфоцитов и НК-клеток в присутствии нативного IL-2 и модифицирование методами генной инженерии таких клеток для снижения экспрессии субъединицы рецептора IL2R α на поверхности клеток,

- культивирование Т-лимфоцитов та НК-клеток в присутствии нативного IL-2 и модифицирование методами генной инженерии таких клеток для повышения экспрессии рецептора IL-2 с промежуточной аффинностью на поверхности клеток.

3. Способ по п. 2, в котором мутеин IL-2 выбирают из группы, которая состоит из:

- SEQ ID NO 1,

- SEQ ID NO 2,
- SEQ ID NO 3,
- SEQ ID NO 4,
- SEQ ID N. 5,
- 5 - SEQ ID NO 6 и
- SEQ ID NO 7.

4. Способ по п. 2, в котором фармакологическое средство, которое блокирует взаимодействие IL2-IL2R α , выбирают из группы, которая состоит из:

- антитела или фрагмента антитела, который связывается или с IL2R α , или с 10 IL2,
- пептида или химически определенной малой молекулы, которая связывается или с IL2R α , или с IL2,
- растворимой формы IL2R α или его модифицированного варианта.

5. Способ по п. 1, в котором стадию (iii) можно проводить в том же доноре 15 или в другом.

6. Способ по п. 2, в котором сигналинг рецептором IL-2 с промежуточной аффинностью на стадии ii может происходить в разные моменты культивирования клеток, или указанный сигналинг может поддерживаться *in vitro* и *in vivo*.

7. Способ по пп. 1-6 для продления стойкости перенесенных клеток и более 20 высокого *in vitro* и *in vivo* противоопухолевого эффекта.

8. Способ по пп. 1-6 в комбинации с другими цитокинами, выбранными из группы, которая содержит:

- IL12,
- L17,
- 25 - IL15 и
- IL21.

9. Способ по п. 1, в котором лимфоциты, подвергнутые действию способа, могут быть любыми из следующего: смесь Т-клеток, очищенные CD4 или CD8 Т-клетки, НК-клетки, НКТ-клетки.

30 10. Способ по п. 1, в котором Т-лимфоциты и НК-клетки могут быть получены на стадии i или из мононуклеаров периферической крови, дренирующих опухоли лимфатических узлов или инфильтратов опухолей.

11. Способ по п. 1, в котором лимфоциты в способах могли быть 35 дополнительно подвергнуты инжинирингу для: экспрессии CAR; экспрессии TCR желаемой специфичности; экспрессии других рецепторов, которые представляют

интерес, в клеточную мембрану; секретиции разных цитокинов или растворимых белков, которые представляют интерес.

12. Применение способа по любому из пп. 1-11 для метода лечения с адоптивным переносом клеток.

5 13. Применение по п. 9 для получения инфильтрующей опухоли лимфоцитов или химерного антигенного рецептора Т-клеток.

14. Применение по пп. 11-12 для лечения рака.

15. Клетки, полученные способом по пп. 1-6.

10 16. Способ обогащения и размножения *ex vivo* лимфоцитов с фенотипом центральной памяти, который включает:

а. получение популяции лимфоцитов от субъекта,

б. размножение лимфоцитов, культивируя клетки при условиях, которые активируют β/γ димерный рецептор IL-2.

15 17. Способ по п. 16, в котором стадию (б) проводят с помощью по меньшей мере одного мутанта IL2.

18. Способ по п. 16, в котором стадию (б) проводят путем регуляции экспрессии по меньшей мере одной субъединицы рецептора IL-2.

19. Способ по п. 18, в котором субъединица рецептора IL-2 представляет собой альфа- (CD25), бета- или гама-субъединицу.

20 20. Способ по п. 16, в котором стадию (б) проводят путем ингибирования взаимодействия рецептора IL-2 с его родственным белком.

21. Способ по п. 20, в котором ингибирование взаимодействия рецептора IL-2 с его родственным белком проходит путем дезактивации альфа-субъединицы рецептора IL-2 или повышенной регуляции бета- и гама-субъединиц.

25 22. Способ по п. 20, в котором ингибирование взаимодействия рецептора IL-2 с его родственным белком проходит путем инкубирования клеток с антителом против CD25.

30 23. Способ по п. 16, в котором стадию (б) проводят путем трансдукции лимфоцитов с нуклеиновыми кислотами, которые кодируют экспрессию и секрецию мутантной последовательности IL-2.

24. Композиция клеток, полученных по любому из пп. 16-23.

25. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение лимфоцитов с фенотипом центральной памяти, который включает:

35 а. получение популяции лимфоцитов от субъекта;

б. размножение популяции лимфоцитов путем активации в указанных лимфоцитах β/γ димерного рецептора IL-2; и

в. введение терапевтически эффективной дозы лимфоцитов со стадии (b) субъекту.

5 26. Способ по п. 25, в котором активация β/γ димерного рецептора IL-2 включает инкубацию указанных лимфоцитов с мутантным IL-2.

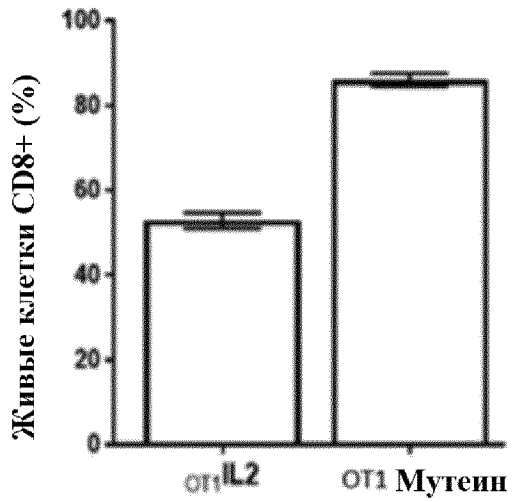
27. Способ по п. 25, в котором активация β/γ димерного рецептора IL-2 включает введение в указанные лимфоциты нуклеотидной последовательности, которая кодирует мутантный IL-2.

10 28. Способ по п. 25, в котором активация β/γ димерного рецептора IL-2 включает введение нуклеотидной последовательности для повышения регуляции экспрессии β/γ -субъединиц рецептора IL-2 в указанных лимфоцитах и инкубирование указанных лимфоцитов с IL-2 дикого типа.

15 29. Способ по п. 25, в котором активация β/γ димерного рецептора IL-2 включает введение нуклеотидной последовательности для дезактивации экспрессии альфа-субъединицы рецептора IL-2 в указанных лимфоцитах и инкубации указанных лимфоцитов с IL-2 дикого типа.

20 30. Способ по п. 25, в котором активация β/γ димерного рецептора IL-2 включает инкубацию указанных лимфоцитов с IL-2 дикого типа и антителами против CD25.

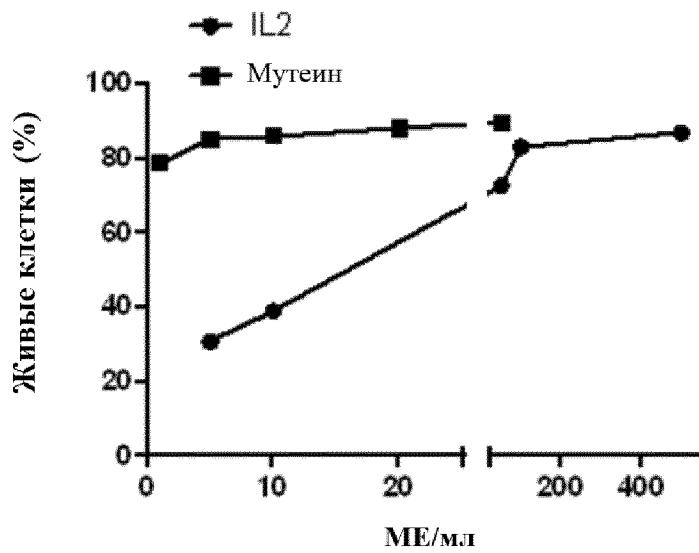
Фиг. 1А



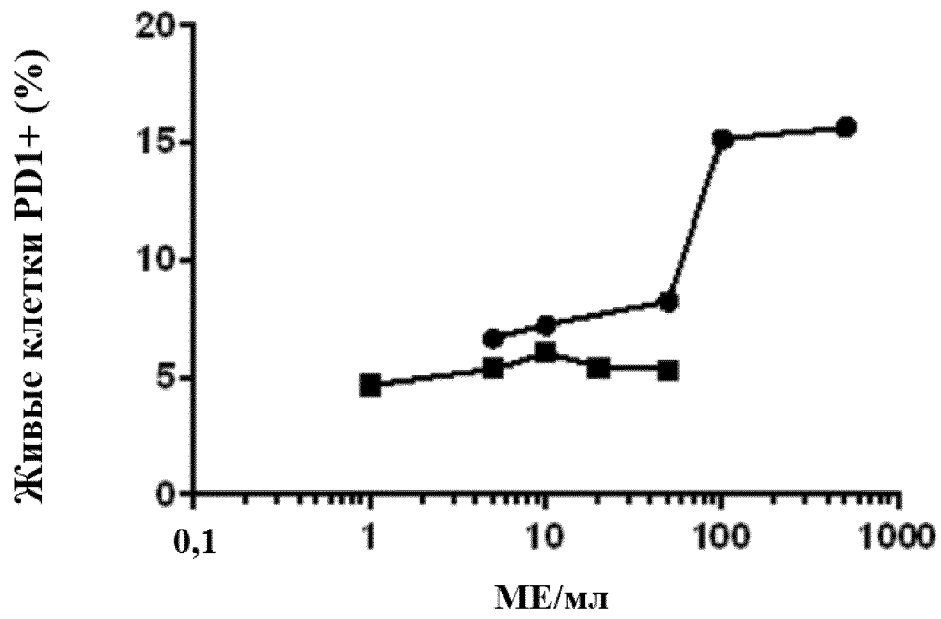
Фиг. 1Б



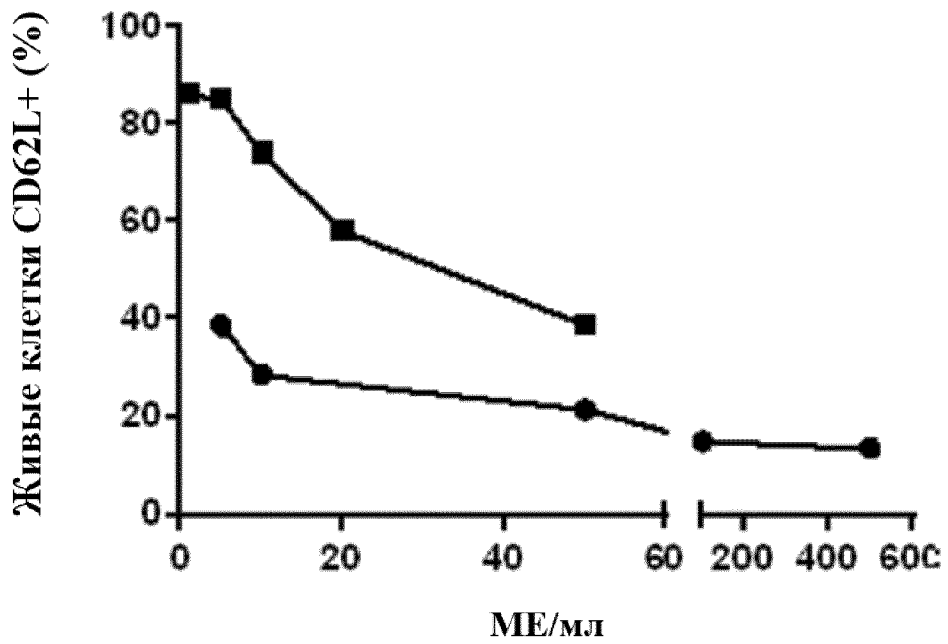
Фиг. 2А



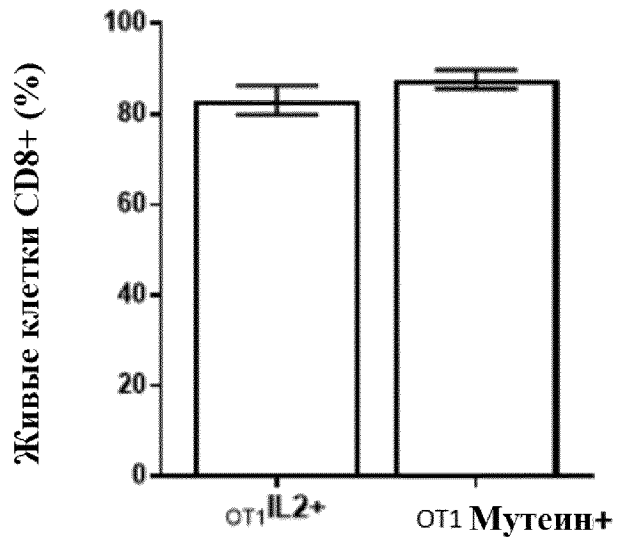
Фиг. 2Б



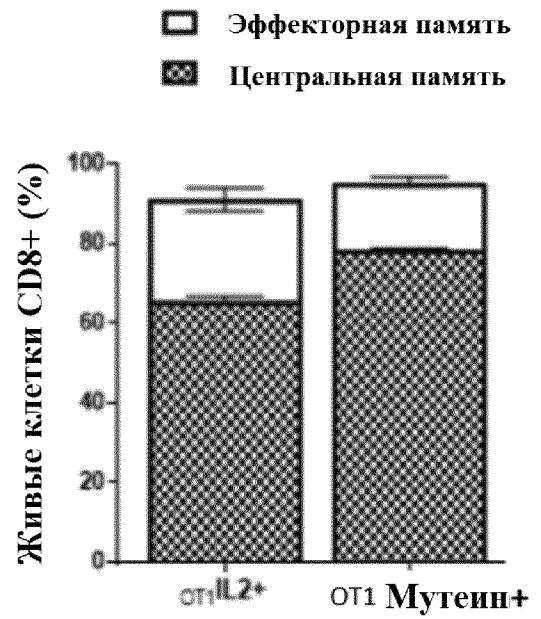
Фиг. 2В



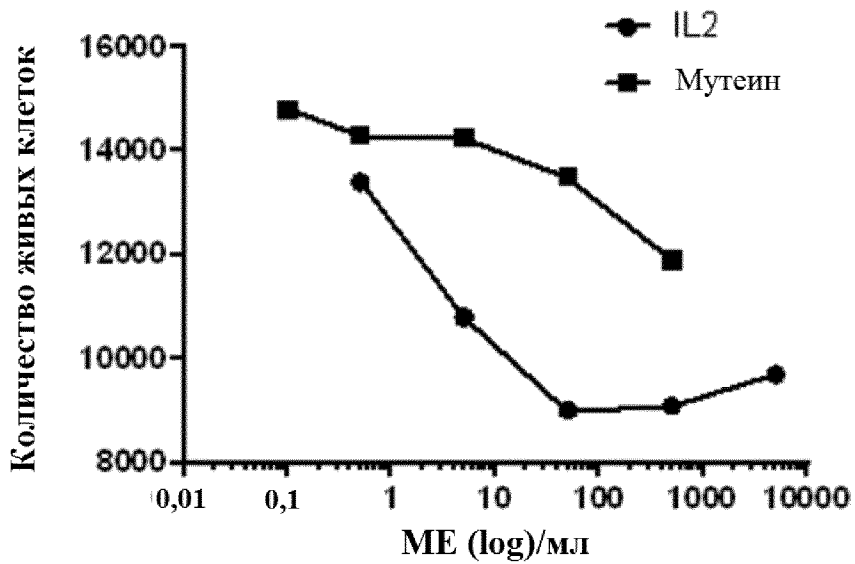
Фиг. 3А



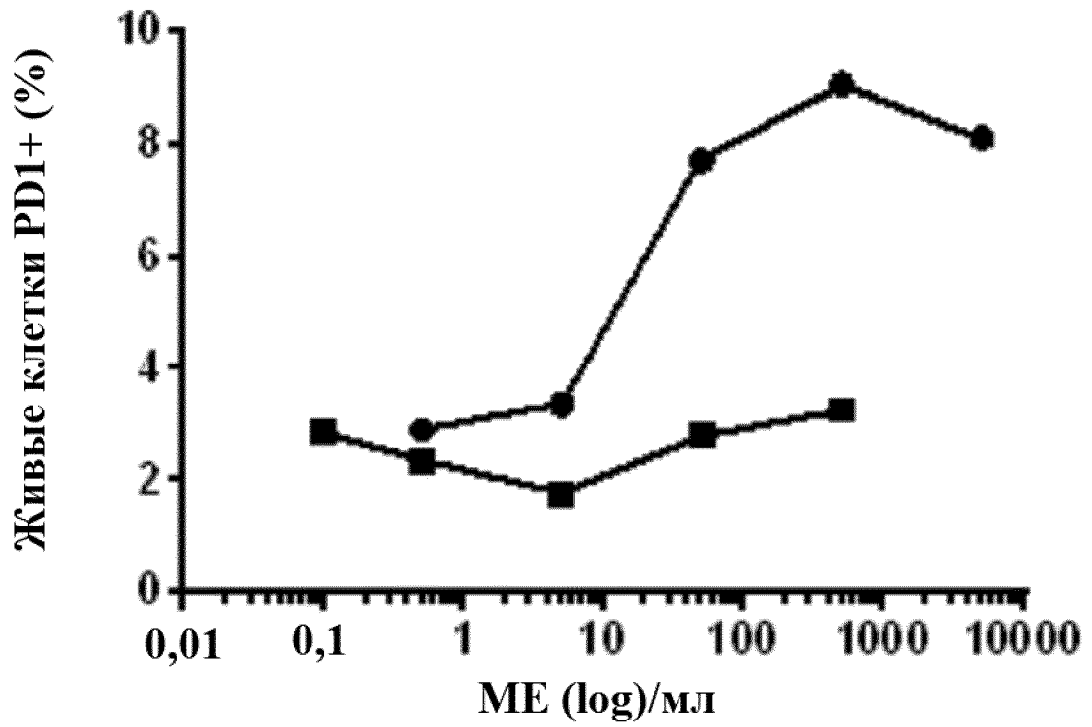
Фиг. 3Б



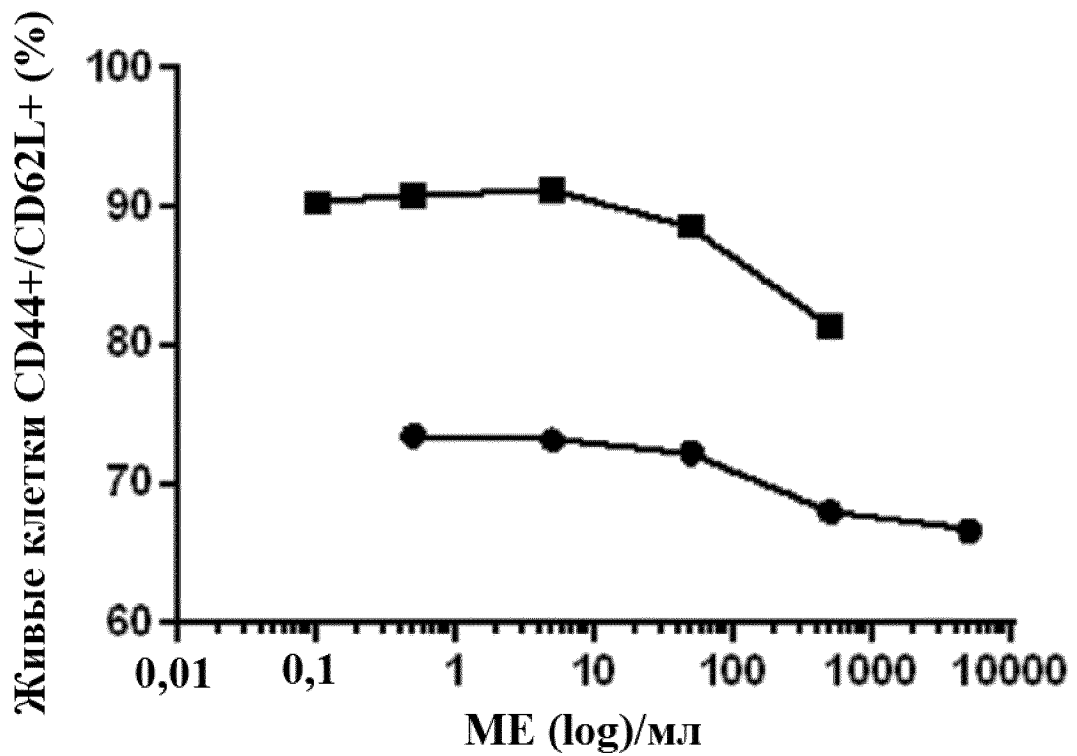
Фиг. 4А



Фиг. 4Б



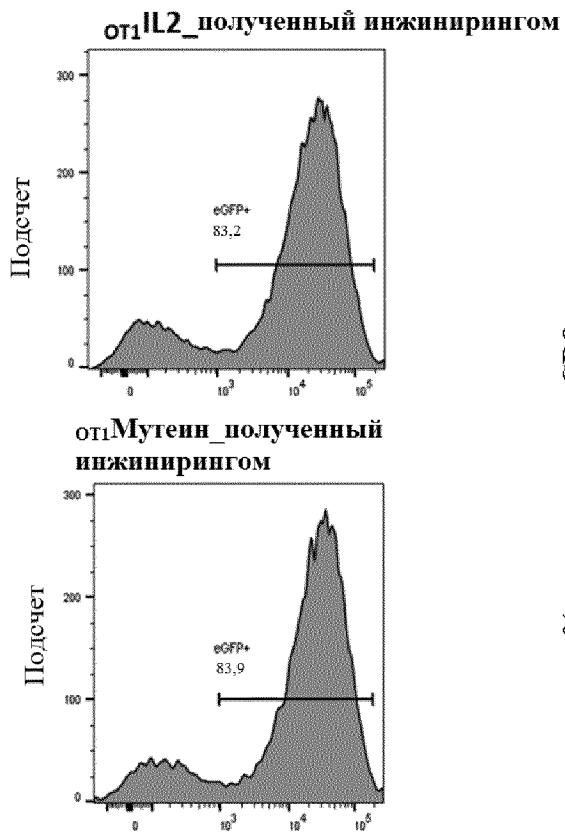
Фиг. 4В



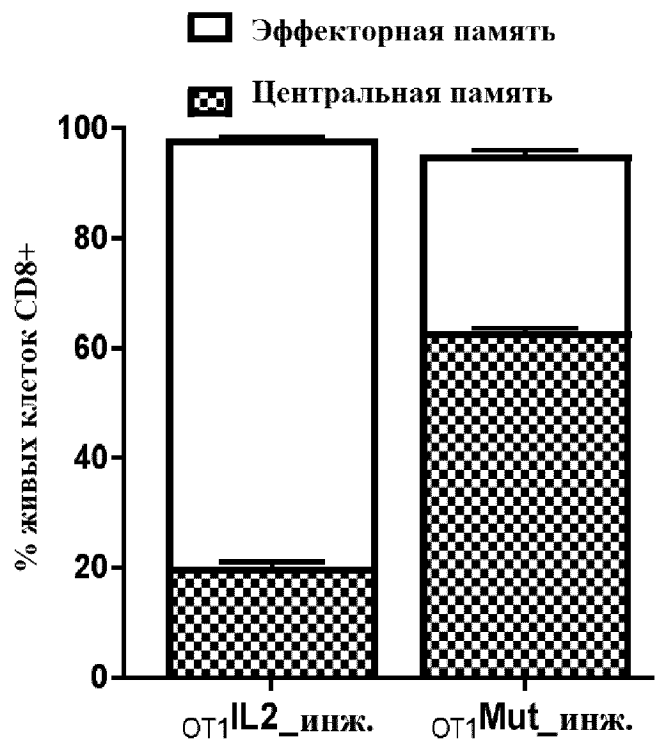
Фиг. 5



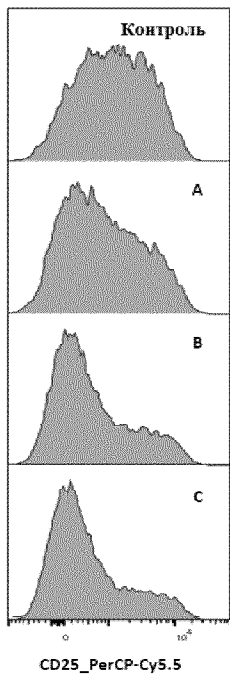
Фиг. 6А



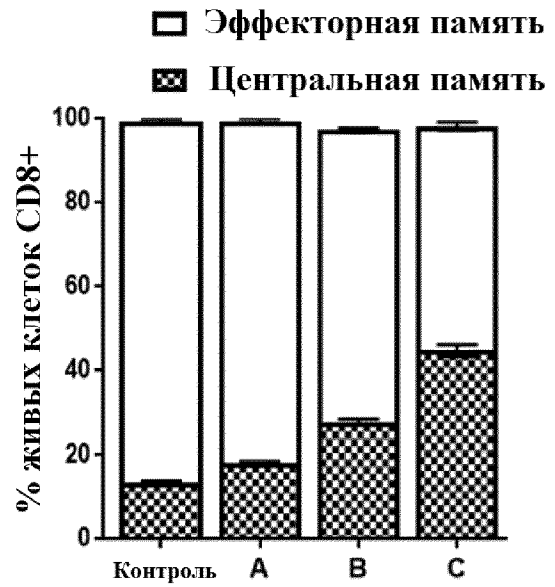
Фиг. 6Б



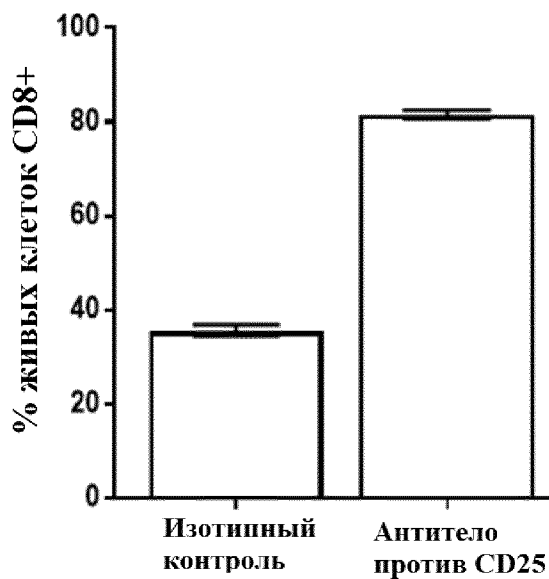
Фиг. 7А



Фиг. 7Б



Фиг. 8А



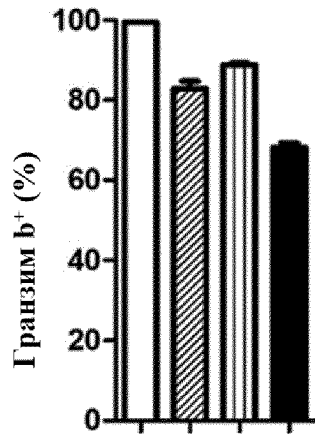
Фиг. 8Б



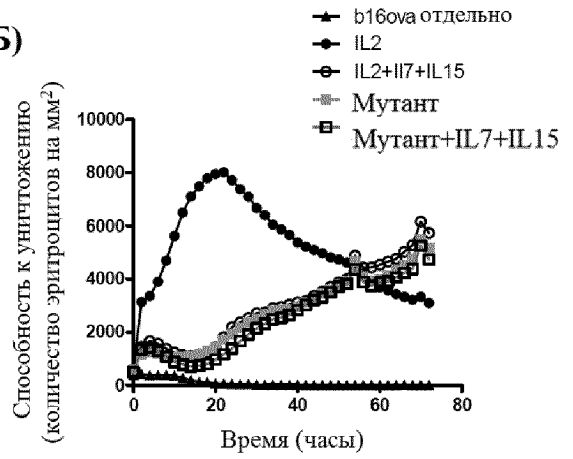
Фиг. 9

А)

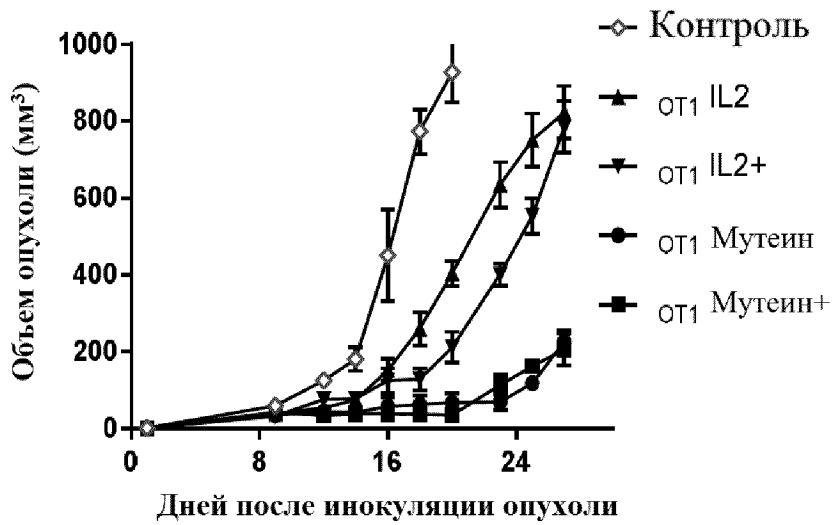
□ OT-I_{дл}IL2 ▨ OT-I_{мутант}IL2
 ▩ OT-I_{дл}IL2/IL15+IL7 ■ OT-I_{мутант}IL2/IL15+IL7



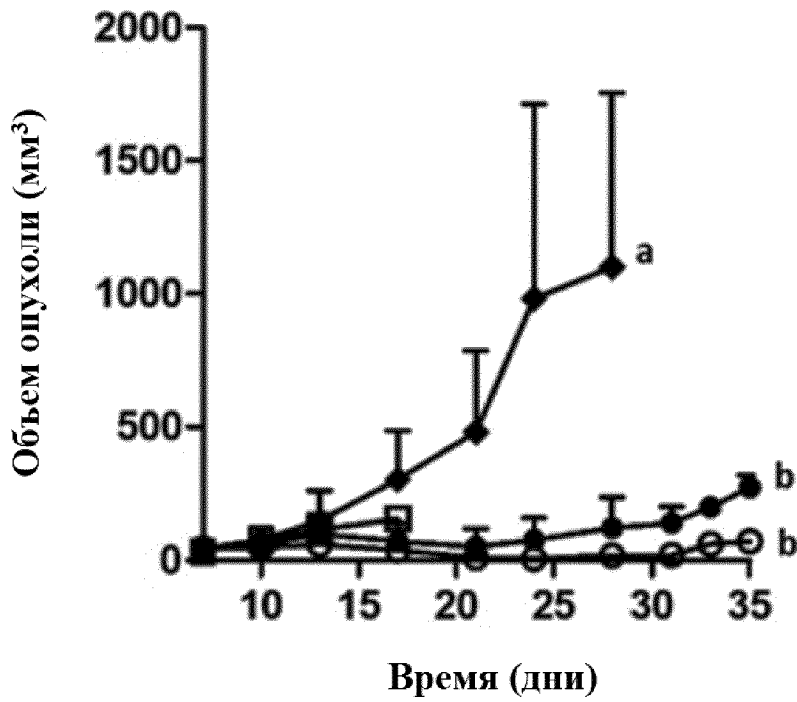
Б)



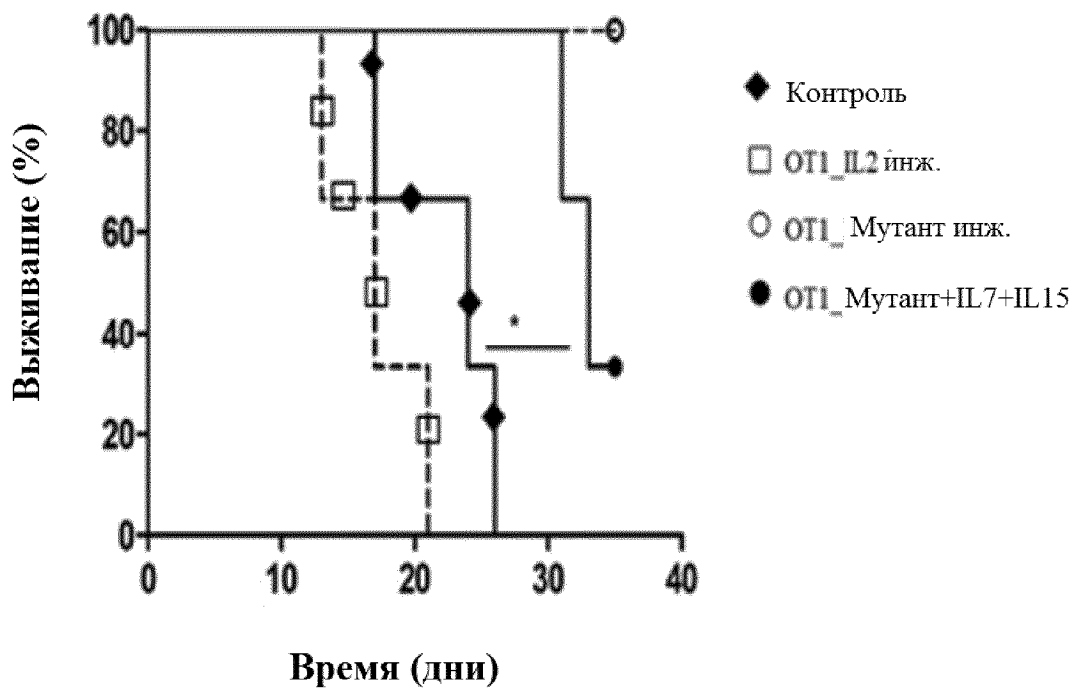
Фиг. 10



Фиг. 11А

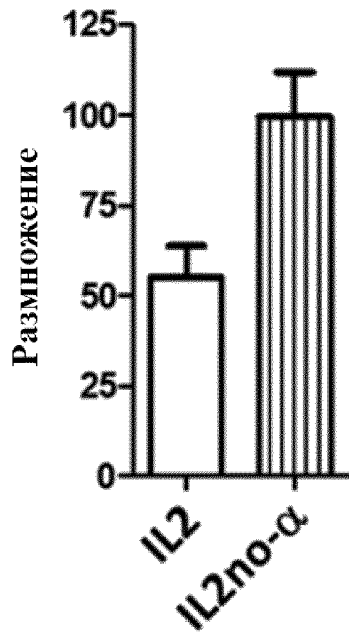


Фиг. 11Б

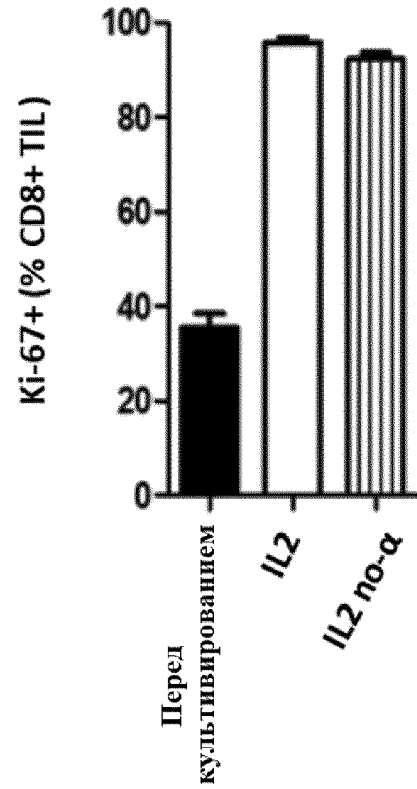


Фиг. 12

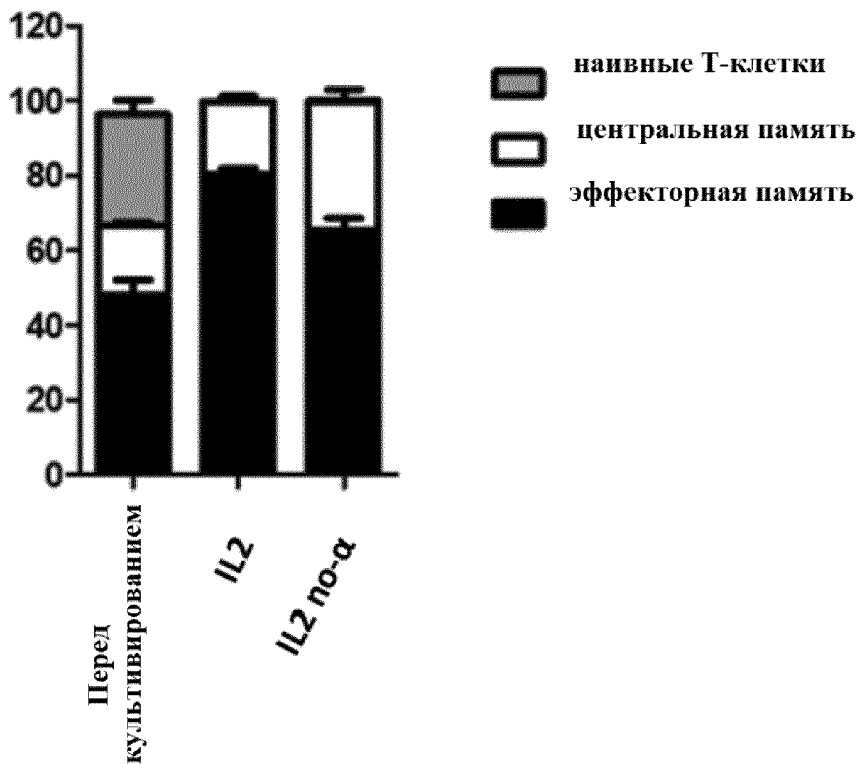
А)



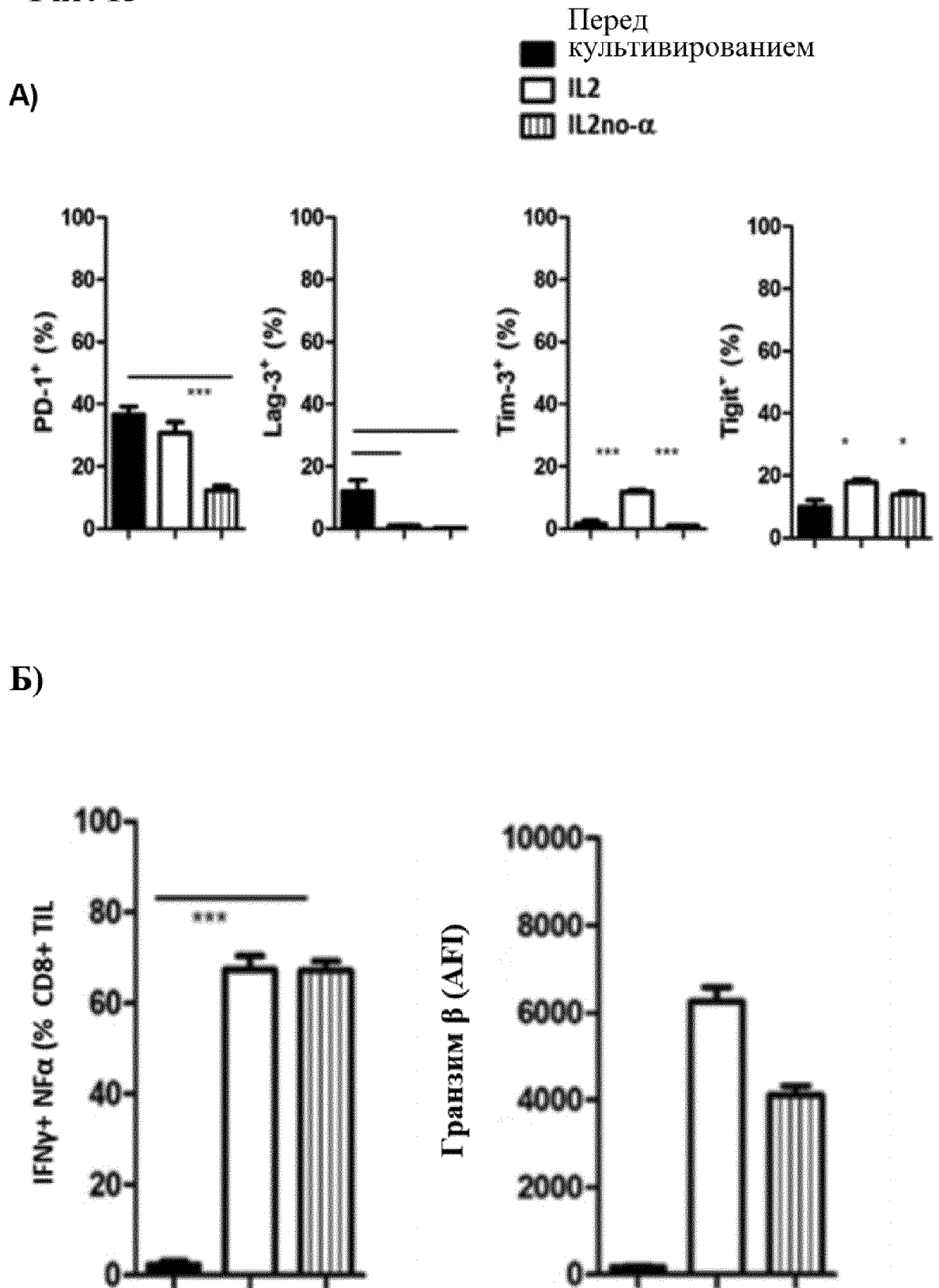
Б)



В)

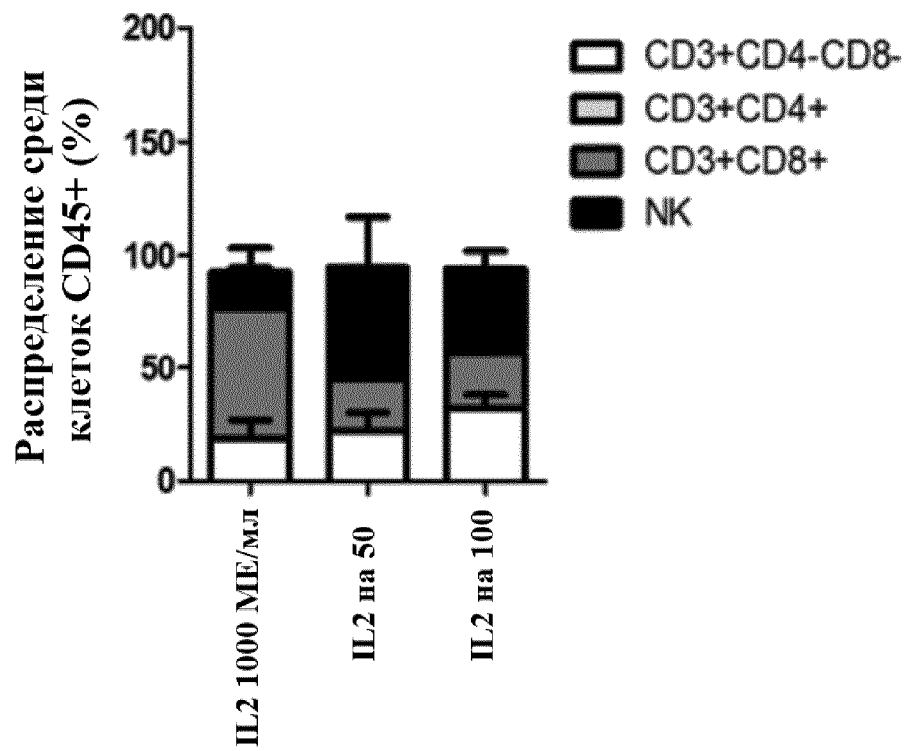


Фиг. 13



Фиг. 14

А)



Б)

