



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.30

(21) Номер заявки
201791381

(22) Дата подачи заявки
2016.01.22

(51) Int. Cl. **C12N 5/0783 (2010.01)**

(54) УНИВЕРСАЛЬНАЯ КЛЕТКА Т-КИЛЛЕР

(31) **1501175.2**

(32) **2015.01.23**

(33) **GB**

(43) **2018.02.28**

(86) **PCT/EP2016/051344**

(87) **WO 2016/116601 2016.07.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОСЛО УНИВЕРСИТЕТССЮКЕХУС
ХФ (NO)**

(72) Изобретатель:
**Волкли Себастьян, Суо Эльза
Марит Индерберг, Гаудернак Густав,
Квалхейм Гуннар (NO)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) V. RENARD ET AL.: "Normal development and function of natural killer cells in CD3 epsilon delta 5/delta 5 mutant mice.", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 92, no. 16, 1 August 1995 (1995-08-01), pages 7545-7549, XP055252808, US ISSN: 0027-8424,

DOI: 10.1073/pnas.92.16.7545, abstract, page 7545, left-hand column

P Lai ET AL.: "Alterations in expression and function of signal-transducing proteins in tumor-associated T and natural killer cells in patients with ovarian carcinoma", Clinical Cancer Research, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 161-173, XP055252904, UNITED STATES Retrieved from the Internet: URL: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/2/1/161.full.pdf> [retrieved on 2016-02-24] abstract, page 164, right-hand column, paragraph 1 page 165; figure 1

THOMAS SCHIRRMANN ET AL.: "Human natural killer cell line modified with a chimeric immunoglobulin T-cell receptor gene leads to tumor growth inhibition in vivo", CANCER GENE THERAPY, vol. 9, no. 4, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 390-398, XP055023107, ISSN: 0929-1903, DOI: 10.1038/sj.cgt.7700453 abstract

UHEREK C ET AL.: "Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 100, no. 4, 15 August 2002 (2002-08-15), pages 1265-1273, XP002614962, ISSN: 0006-4971 cited in the application abstract WO-A2-2006023148

(57) В настоящем изобретении предложена модифицированная клетка - естественный киллер (NK-клетка) и ее применение в персонализированной медицине. Модифицированные NK-клетки согласно настоящему изобретению неиммуногенны, что означает, что указанные клетки можно вводить любому субъекту-реципиенту, и при этом указанные клетки не отторгаются иммунной системой хозяина (указанные клетки являются "универсальными"). Согласно первому варианту реализации неиммуногенные NK-клетки модифицированы для экспрессии CD3 для обеспечения возможности экспрессии рецептора Т-лимфоцитов (TcR). Согласно дополнительному варианту реализации неиммуногенные NK-клетки дополнительно модифицированы для совместной экспрессии TcR и корецептора CD3. Коксэкспрессия CD3 со специфическим TcR приводит к тому, что модифицированные NK-клетки демонстрируют антиген-специфичную цитотоксичность в отношении клеток-мишеней. Таким образом, универсальные NK-клетки можно нацеливать на специфические антигены, и, таким образом, указанные клетки можно применять в персонализированной медицине, в частности в области онкологии.

В настоящем изобретении предложены клетки - естественные киллеры и их применение в терапии, в частности при лечении рака. В частности, была разработана модифицированная клетка - естественный киллер, которая была модифицирована для экспрессии CD3 и которая может быть дополнительно модифицирована для совместной экспрессии антигенного рецептора на основе рецептора Т-лимфоцитов, специфичного в отношении антигена раковых клеток или другого целевого антигена. Указанная модифицированная клетка - естественный киллер является неиммуногенной, например, экспрессирует ГКГС (главный комплекс гистосовместимости) на низком уровне или является ГКГС-негативной, что означает, что указанные клетки подходят для универсального применения вне зависимости от типа ГКГС субъекта. Таким образом, в настоящем изобретении эффективно сочетаются свойства универсальности и персонализации; рецептор Т-лимфоцитов может быть подобран как для патологического состояния (например, в зависимости от типа рака), так и для типа ГКГС субъекта, которого требуется лечить, что позволяет получить "универсальные клетки", которые можно применять при лечении, которое персонализировано для субъекта, которого требуется лечить.

Определенные клетки иммунной системы демонстрируют цитотоксическую активность в отношении конкретных клеток-мишеней. Цитотоксические Т-лимфоциты экспрессируют рецепторы Т-лимфоцитов (TcR), которые способны специфически распознавать полученные из антигена пептиды, связанные с молекулами ГКГС I класса. В отличие от этого, клетки-естественные киллеры (NK-клетки) не ограничены необходимостью задействовать ГКГС, и для проявления их цитотоксического действия им не требуется презентация антигена, осуществляемая молекулами ГКГС. Они способны распознавать подвергшиеся стрессу клетки в отсутствие нагруженного пептидом ГКГС и уничтожать клетки, не содержащие ГКГС. Таким образом, NK-клетки играют важную роль во врожденном иммунитете, поскольку никаким другим образом указанные "не-ГКГС" клетки не могут быть обнаружены и элиминированы другими клетками иммунной системы.

Цитотоксические Т-клетки (также называемые цитотоксическими Т-лимфоцитами или клетками Т-киллерами) способны распознавать инфицированные или поврежденные клетки антиген-специфичным образом через TcR посредством связывания с антигенами (пептидами), презентируемыми на поверхности клетки молекулами ГКГС I класса. Связывание с пептидом-ГКГС I класса опосредуется корецептором CD8, который усиливает аффинность взаимодействия при связывании и усиливает передачу сигнала за счет TcR. TcR других типов Т-лимфоцитов, в особенности Т-хелперов, распознают антигенные пептиды, презентируемые молекулами ГКГС II класса, что опосредуется корецептором CD4. Для локализации TcR на поверхности клетки в Т-лимфоцитах требуется CD3 (Ahmadi et al. 2011. Blood 118, 3528-3537), и CD3 требуется для активации Т-лимфоцита при контакте с белком ГКГС, нагруженным соответствующим антигенным пептидом. CD3 представляет собой белковый комплекс, состоящий из четырех разных цепей: CD3 γ -цепи, CD3 δ -цепи, двух цепей CD3 ϵ и ζ -цепи, которые вместе с TcR образуют комплекс TcR.

NK-клетки (также называемые "большими гранулярными лимфоцитами") представляют собой линию клеток, дифференцирующуюся из общего лимфоидного предшественника (который также дает начало В-лимфоцитам и Т-лимфоцитам). В отличие от Т-лимфоцитов, NK-клетки в норме не содержат CD3 на своей плазматической мембране. Важно, что NK-клетки не экспрессируют рецепторы Т-лимфоцитов и обычно также лишены других антиген-специфичных поверхностных рецепторов клетки (кроме рецепторов Т-лимфоцитов и CD3, указанные клетки не экспрессируют иммуноглобулиновые рецепторы В-лимфоцитов, а вместо этого обычно экспрессируют CD16 и CD56). Таким образом, NK-клетки отличаются тем, что имеют CD3(-), CD56(+) фенотип. Цитотоксическая активность NK-клеток не требует сенсибилизации, но она усиливается при активации рядом цитокинов, включая ИЛ-2 (интерлейкин-2). Обычно предполагают, что NK-клетки лишены соответствующих сигнальных путей, необходимых для опосредуемой антигенными рецепторами передачи сигнала, или такие сигнальные пути у них не являются полноценными, и, следовательно, считается, что указанные клетки не способны к зависимым от антигенного рецептора передаче сигнала, активации и размножению.

NK-клетки являются цитотоксическими, и для модулирования своей цитотоксической активности указанные клетки обеспечивают баланс при передаче сигнала с активирующих и ингибиторных рецепторов. Например, NK-клетки, экспрессирующие CD16 (рецептор Fc γ RIII), могут связываться с доменом Fc антител, связанных с инфицированной клеткой, что приводит к активации NK-клеток. В отличие от этого, активность в отношении клеток, экспрессирующих белки ГКГС I класса на высоком уровне, снижается. При контакте с клетками-мишенями NK-клетки выделяют такие белки как перфорин и ферменты, такие как протеазы (гранзимы). Перфорин может образовывать поры в мембране клетки-мишени, вызывая апоптоз или лизис клетки.

Был разработан ряд способов лечения на основе Т-лимфоцитов для лечения рака, и указанные способы, называемые адоптивным переносом клеток (АСТ), стали весьма перспективными в последние годы. К настоящему времени было разработано три основных стратегии АСТ. Первая из них и наиболее проработанная основана на выделении собственных активных в отношении опухоли Т-лимфоцитов пациента из периферической крови или очагов опухоли (называемых опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (TIL)). Данные клетки размножают *ex vivo* и повторно вводят пациенту.

Однако данный способ может включать задержки в несколько недель, пока клетки размножат, и для его реализации требуются специальные учреждения и специалисты по получению клеток.

Существуют два альтернативных способа лечения, которые основаны на модификации собственных Т-лимфоцитов пациента, включающей введение рецепторов, которые способны распознавать опухоль. Согласно одному варианту, ТсR, обладающие активностью в отношении ракового антигена, можно изолировать и охарактеризовать, и ген, кодирующий ТсR, можно ввести в Т-лимфоциты и указанные Т-лимфоциты повторно ввести пациенту. Было показано, что данный способ лечения приводит к уменьшению размеров солидных опухолей у некоторых пациентов, но связан со значительным недостатком: применяемые ТсR должны подбираться под тип иммунной системы пациента. Соответственно, как альтернатива применению ТсR были предложены способы лечения, основанные на экспрессии химерных антигенных рецепторов (CAR) в Т-лимфоцитах. CAR представляют собой рекомбинантные белки, содержащие антитело, соединенное с сигнальным доменом комплекса ТсR, и могут применяться для нацеливания Т-лимфоцитов на опухоль, если будет выбрано соответствующее антитело. В отличие от ТсR, CAR не должен подбираться по типу ГКГС пациента. Однако к настоящему времени было идентифицировано очень мало специфических для раковых заболеваний поверхностных антигенов, которые можно применять в качестве подходящих мишеней для CAR, и, таким образом, применение CAR для лечения рака в настоящее время ограничено.

Все подходы с применением АСТ, основанные на модификации Т-лимфоцита с применением ТсR или CAR, требуют выделения и модификации Т-лимфоцитов из организма пациента или из организма гистосовместимого донора. Если применяются неаутологичные клетки, чтобы исключить риск отторжения, необходимо применять аутологичные Т-лимфоциты. Это увеличивает расходы, связанные с АСТ, а также может увеличивать время, которое требуется на получение Т-лимфоцитов для применения при АСТ.

Альтернативные способы, направленные на преодоление перечисленных выше ограничений АСТ, основаны на применении цитотоксических NK-клеток, как описано, например, в WO 98/49268. NK-клетки являются мощными клетками-киллерами и обладают высокой цитотоксичностью в отношении ряда клеток разных злокачественных опухолей. Поскольку NK-клетки будут распознавать клетки-мишени, которые экспрессируют молекулы чужого лимфоцитарного антигена человека (HLA), а не собственные антигены HLA, аутологичные NK-клетки обычно неэффективны, и необходимо применять аллогенные NK-клетки (для получения которых требуется тщательное удаление Т-лимфоцитов, чтобы избежать реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ)) или линии клеток. Способы лечения, основанные на облучении NK-клеток линии NK-92, дошли до стадии проведения клинических исследований по лечению лейкозов и других гематологических злокачественных опухолей. Облучение означает, что клетки не способны пролиферировать, и, следовательно, элиминирующее действие имеет ограниченную и заданную продолжительность. Также NK-клетки не атакуют здоровые ткани. Однако природный "диапазон" NK-клеток ограничен, и хотя клетки NK-92 имеют более широкий спектр, чем первичные NK-клетки, поскольку NK-клетки в норме не содержат рецепторов, подходящих для специфического нацеливания на антиген на клетке-мишени, требуется дополнительно модифицировать указанные клетки, чтобы расширить спектр онкологических заболеваний, которые можно лечить и на которые можно направленно действовать или перенаправить клетки на конкретное или избранное раковое заболевание. Конечно, такое перенаправление означает, что потребность в аллогенных NK-клетках отпадает, но линии NK-клеток могут все еще иметь преимущества, например, более высокую цитотоксичность по сравнению с первичными или аутологичными NK-клетками. С этой целью были разработаны NK-клетки, экспрессирующие CAR, для применения при лечении рака. CAR, которые распознают антигены на поверхности раковых клеток, вводили в постоянно растущую культуру NK-92, и было показано, что клетки NK-92, содержащие указанные CAR, обладают повышенной цитотоксичностью в отношении клеток опухоли по сравнению с исходными клетками NK-92 (Uherek et al. 2002. Blood 200, 1265-1273). В настоящее время проходят клинические исследования ранних фаз. Однако, как отмечалось выше, недостаток доступных антигенов в качестве мишеней для CAR в настоящее время ограничивает применение способов лечения на основе CAR.

Настоящее изобретение основано на альтернативном подходе к получению клеток-киллеров, специфичных для определенного ракового заболевания. Более конкретно, настоящее изобретение направлено на получение клеток-киллеров, специфичных для ракового заболевания, на основе NK-клеток, для универсального применения, что означает, что клетки могут не соответствовать иммунному типу субъекта, которого требуется лечить, как в настоящее время требуется для способов лечения на основе Т-лимфоцитов, но тем не менее указанные клетки могут быть модифицированы с учетом специфического иммунного типа и типа рака конкретного субъекта при необходимости. Таким образом, универсальные клетки-киллеры можно применять для персонализированной медицины.

Таким образом, согласно настоящему изобретению предложено преобразование NK-клетки в Т-лимфоцит и, следовательно, придание ей способности экспрессировать ТсR и уничтожать клетки специфически и направленно, как это делает Т-лимфоцит. В настоящем изобретении сочетается присущая NK-клетке мощь и способность к элиминации и специфическое нацеливание и активация клеток, обес-

печиваемые TcR. Хотя CAR ранее экспрессировали в NK-клетках, до настоящего момента считалось, что невозможно достичь того, чтобы NK-клетки обладали всеми необходимыми сигнальными путями и клеточным аппаратом для успешной экспрессии TcR, которая приводила бы к успешной активации и направленной элиминации, осуществляемой NK-клетками. Универсальность достигается благодаря применению NK-клеток, которые неиммуногенны, например, которые в норме экспрессируют низкий уровень ГКГС или которые обладают сниженной пролиферативной способностью, или указанные NK-клетки являются негативными по ГКГС (например, по HLA) таким образом, что данные клетки не распознаются иммунной системой реципиента как чужие. Таким образом, NK-клетка может не соответствовать иммунному типу (например, типу HLA) субъекта, которого требуется лечить, и ее можно вводить универсально, независимо от иммунного типа субъекта (т.е. субъекту с любым иммунным типом, например, любым профилем/типом HLA).

Таким образом, согласно настоящему изобретению предложены средства, которые позволяют экспрессировать функциональные, активные TcR в неиммуногенных NK-клетках. Таким образом, можно получать универсальный T-киллер, который не зависит от соответствия ГКГС клетки, но который обладает контролируемой специфичностью, диктуемой специфичностью TcR, введенного в такую клетку. Было показано, что совместной экспрессии CD3 и TcR в NK-клетке достаточно, чтобы TcR был локализован на поверхности NK-клетки, и неожиданно NK-клетка, экспрессирующая TcR, продемонстрировала антиген-специфичную цитотоксичность в отношении клеток-мишеней. Согласно другому рассматриваемому способу, согласно настоящему изобретению предложены способы превращения NK-клетки в цитотоксический T-лимфоцит с дополнительными преимуществами универсальности, просто посредством совместной экспрессии CD3 и TcR в неиммуногенной NK-клетке. Таким образом, согласно настоящему изобретению предложен "универсальный" T-киллер, который можно применять в персонализированной медицине.

Таким образом, согласно первому аспекту настоящего изобретения предложена модифицированная NK-клетка, причем указанная клетка является неиммуногенной и модифицирована для экспрессии CD3.

В частности, клетка модифицирована так, чтобы она была неиммуногенной, например, путем облучения с целью снизить пролиферативную способность, или при помощи других средств снижения пролиферации, так чтобы указанная клетка не выживала настолько долго, чтобы вызывать иммунный ответ, когда ее вводят субъекту, или путем модификации клетки, чтобы она стала ГКГС-негативной.

Клетки согласно настоящему изобретению можно дополнительно модифицировать для экспрессии TcR, обладающих специфичностью в отношении антигена на клетке-мишени (т.е. целевого антигена). Как будет более подробно определено ниже, в настоящем описании термин "TcR" применяют в его широком смысле, и он включает любой антигенный рецептор, который содержит или создан на основе областей распознавания антигена TcR, или получен из TcR. Таким образом, включены и природные, и синтетические TcR, например, варианты или производные TcR.

Согласно одному конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложена неиммуногенная NK-клетка, экспрессирующая CD3 и TcR, причем указанный TcR специфичен в отношении антигена на раковой клетке. Повторим, что согласно настоящему изобретению предложена специфическая для конкретного ракового заболевания NK-клетка, причем указанная клетка является неиммуногенной, и причем специфичность для конкретного ракового заболевания обеспечивается за счет коэкспрессии специфичного для конкретного ракового заболевания TcR и CD3. Как будет описано более подробно ниже, согласно одному предпочтительному варианту реализации TcR не зависит от корецептора, в частности не зависит от CD4 и/или CD8.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены такие клетки, как клетки, описанные выше в настоящем описании, для применения в терапии, более конкретно для применения в терапии рака или в более общем смысле для терапии на основе адоптивного переноса клеток (например, при лечении любого состояния, которое может отвечать на терапию T-лимфоцитами).

Согласно еще одному дополнительному аспекту предложено применение модифицированных NK-клеток, которые описаны выше в настоящем описании, при получении лекарственного средства для применения при терапии рака или для терапии на основе адоптивного переноса клеток.

Также предложена терапевтическая композиция, содержащая модифицированную NK-клетку, которая описана выше в настоящем описании, вместе по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом, и такая терапевтическая композиция для применения при терапии рака или при терапии на основе адоптивного переноса клеток.

Согласно еще одному дополнительному аспекту предложен способ лечения, более конкретно способ лечения рака, или способ терапии на основе адоптивного переноса клеток, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом (например, субъекту, страдающему раком, или которому диагностирован рак) эффективного количества модифицированных NK-клеток, описанных выше в настоящем описании.

Для применения в терапии модифицированные NK-клетки согласно настоящему изобретению должны быть модифицированы так, чтобы они совместно экспрессировали TcR и CD3. Таким образом, получение лекарственного средства или композиции для применения при терапии должно включать мо-

дификацию NK-клеток, такую, чтобы они экспрессировали TcR. TcR должны конструироваться или отбираться, во-первых, так, чтобы они соответствовали иммунному типу (т.е. типу ГКГС) субъекта, которого требуется лечить (т.е. реципиента модифицированных NK-клеток), и, во-вторых, так, чтобы они соответствовали или распознавали клетки в организме субъекта, которого требуется лечить указанными NK-клетками. То есть TcR конструируют или отбирают так, чтобы он распознавал желаемый целевой антиген в организме субъекта. Это может быть целевой антиген, экспрессируемый (или представляемый) раковой клеткой в организме субъекта или любой клеткой, которая должна быть устранена в ходе терапии на основе адоптивного переноса клеток, например, инфицированной клеткой, например, клеткой, экспрессирующей (или представляющей) вирусный антиген или антиген другого патогена. Таким образом, чтобы проводить противораковую терапию или терапию на основе адоптивного переноса клеток согласно настоящему изобретению или чтобы получить модифицированную NK-клетку для терапевтического применения, можно проводить следующие этапы:

(a) получение неиммуногенной NK-клетки, которая была модифицирована, чтобы экспрессировать CD3;

(b) определение типа ГКГС субъекта, которого требуется лечить;

(c) идентификацию целевого антигена у субъекта, причем такой антиген экспрессируется или представляется клетками в организме данного субъекта, например, путем идентификации или определения типа рака у субъекта, и/или экспрессии конкретного маркера рака (например, антигена), или присутствия конкретной мутации и т.д.;

(d) модификацию клетки, полученной на этапе (a), чтобы она экспрессировала TcR, обладающий специфичностью в отношении целевого антигена и соответствием по типу ГКГС указанного субъекта.

Как будет более подробно обсуждаться ниже, указанные этапы можно проводить по отдельности или одновременно. Таким образом, например, этапы (a) и (b) можно проводить одновременно, более конкретно указанную клетку можно модифицировать, чтобы она экспрессировала CD3 и TcR, в ходе одного или более одновременных этапов. Однако согласно другому варианту реализации клетку можно модифицировать, чтобы она экспрессировала CD3, в ходе отдельного этапа, до модификации, приводящей к экспрессии TcR.

Кроме того, согласно способу лечения или терапевтического применения модифицированную клетку, полученную на этапе (d), можно вводить субъекту (например, в ходе дополнительного этапа (e)).

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ получения универсальной NK-клетки для применения при получении клетки для персонализированного терапевтического применения, а именно для терапии на основе адоптивного переноса клеток, причем указанный способ включает:

a) получение NK-клетки, которая является неиммуногенной, более конкретно, модификацию NK-клетки с целью сделать ее неиммуногенной; и

b) модификацию указанной клетки, такую, чтобы она экспрессировала CD3.

Дополнительно, чтобы получить модифицированную NK-клетку для применения в терапии на основе адоптивного переноса клеток, указанную клетку дополнительно модифицируют на этапе (c), чтобы она экспрессировала TcR, и, в частности, для персонализированной терапии, TcR, который соответствует по типу ГКГС субъекту, которого требуется лечить и который распознает целевой антиген, экспрессируемый или представляемый клеткой-мишенью, на которую должна быть нацелена модифицированная NK-клетка.

Согласно предпочтительному варианту реализации предложен способ получения NK-клетки, специфичной в отношении конкретного ракового заболевания, причем указанный способ включает:

a) получение NK-клетки, которая является неиммуногенной, например, модификацию NK-клетки с целью сделать ее неиммуногенной;

b) модификацию указанной клетки, такую, чтобы она экспрессировала CD3;

c) модификацию указанной клетки, такую, чтобы она экспрессировала TcR, специфичный в отношении конкретного ракового заболевания.

Этапы (b) и (c) можно проводить совместно (одновременно) или по отдельности, например, последовательно. Однако согласно предпочтительным вариантам реализации, как будет описано более подробно ниже, можно получить универсальную NK-клетку, экспрессирующую CD3, причем указанную клетку можно впоследствии применять на отдельных этапах для получения персонализированных клеток для терапии на основе адоптивного переноса клеток, путем дальнейшей модификации указанных клеток, такой, чтобы они экспрессировали TcR, который выбирают на основании диагноза и типа ГКГС субъекта. Таким образом, может быть получен банк или библиотека рецепторов TcR, включающие разные TcR (более конкретно, молекулы нуклеиновых кислот или векторы, кодирующие TcR) в соответствии со специфичностью ГКГС (т.е. его типом) и специфичностью в отношении целевого антигена (например, для ряда разных известных или ранее идентифицированных целевых антигенов, например, раковых антигенов). В зависимости от диагноза субъекта (например, конкретный тип рака, или рак, о котором известно, что он экспрессирует конкретный антиген, или идентифицированный при помощи специфического анализа рака у указанного субъекта) может быть выбран конкретный TcR и может быть применен для модификации NK-клетки согласно настоящему изобретению. В качестве альтернативы можно получить

банк или панель модифицированных НК-клеток, экспрессирующих и CD3, и TcR с разной специфичностью, из которых можно выбирать соответствующую НК-клетку в зависимости от диагноза и типа ГКГС субъекта.

Соответственно, согласно еще одному дополнительному аспекту настоящего изобретения предложен комбинированный продукт, или набор, в частности такой как продукт или набор для применения в терапии на основе адоптивного переноса клеток, или в терапии рака, причем указанный продукт или набор содержит:

(а) модифицированную универсальную НК-клетку, которая неиммуногенна и экспрессирует CD3, более конкретно НК-клетку, которая модифицирована так, чтобы она была неиммуногенна и экспрессировала CD3; и

(б) панель молекул нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует TcR; причем указанные TcR обладают разной антигенной специфичностью и/или разной специфичностью в отношении ГКГС.

Традиционно молекулы кодирующих нуклеиновых кислот могут быть предложены в виде векторов, например, векторов, готовых для введения (т.е. трансфекции или трансдукции и т.п.) в модифицированную НК-клетку. Согласно предпочтительному варианту реализации TcR обладает специфичностью в отношении ракового антигена или в отношении антигена, экспрессируемого (например, предпочтительно или специфически) на раковых клетках.

Согласно еще одному дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложена панель, или библиотека, модифицированных НК-клеток, причем каждая НК-клетка неиммуногенна и экспрессирует CD3, например, НК-клетка, модифицированная таким образом, чтобы она была неиммуногенна и экспрессировала CD3, и экспрессирует (т.е. модифицирована так, чтобы она экспрессировала) TcR, причем TcR разных НК-клеток обладают разной антигенной специфичностью и/или разной специфичностью в отношении ГКГС. Будет понятно, что согласно таким аспектам может быть несколько TcR, распознающих один и тот же антиген, но они могут отличаться по специфичности в отношении ГКГС и наоборот.

Настоящее изобретение основано на применении цитотоксических клеток иммунной системы при лечении рака. Более конкретно, настоящее изобретение относится к экспрессии TcR в цитотоксических клетках иммунной системы, которые в ином случае могут не экспрессировать TcR, и к способам, которые позволяют вызвать экспрессию активных, функциональных TcR в таких клетках.

Термин "цитолитический" и "цитотоксический" применяются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к клетке, способной вызывать гибель клеток-мишеней путем лизиса или апоптоза.

Термин "клетка-мишень" относится к любой клетке, которая уничтожается цитотоксическими клетками согласно настоящему изобретению. Более конкретно, клеткой-мишенью является клетка, на которую нацелены НК-клетки, и, следовательно, клетка, которая экспрессирует или представляет антиген, распознаваемый TcR (целевой антиген). Указанные клетки могут включать клетки любого типа, и клетки согласно настоящему изобретению нацеливаются на них благодаря антигену, присутствующему на поверхности клетки-мишени.

Таким образом, клеткой-мишенью может быть любая клетка организма субъекта от которой желательно избавиться, например, удалить, уничтожить, инактивировать и т.д. Предпочтительной клеткой-мишенью является раковая клетка, но это может быть любая клетка, возникающая в результате заболевания или клинического состояния. Таким образом, указанное заболевание или состояние могут быть любым состоянием, при котором полезна терапия на основе адоптивного переноса клеток, или, более конкретно, терапия Т-лимфоцитами, нацеленная на клетки для их уничтожения или удаления и т.д. Помимо раковых клеток, другие клетки, которые может быть желательно удалять с клинической точки зрения, включают инфицированные клетки, то есть клетки, инфицированные патогеном. Обычно такие клетки будут включать инфицированные вирусом клетки, но они могут быть также инфицированы и другим патогенным организмом, например, микроорганизмом, например, бактерией, грибом, микоплазмой, простейшим, прионами. В качестве альтернативы клеткой-мишенью может быть апоптотическая или преапоптотическая клетка, или клетка в состоянии стресса (т.е. которая экспрессирует связанные со стрессом маркеры на своей поверхности), или может быть мутантная клетка, например, экспрессирующая конкретную мутацию.

"Целевой антиген" является (или более конкретно представляет собой или содержит) молекулой, которая распознается TcR, когда он представлен на поверхности клетки-мишени. Таким образом, целевой антиген, или, более конкретно, пептид, полученный из целевого антигена, представляется на поверхности клетки-мишени характерным для ГКГС-I или ГКГС-II образом, как это требуется для его распознавания TcR. Соответственно, как обсуждалось выше, указанным целевым антигеном может быть раковый антиген, то есть антиген, который экспрессируется специфически, селективно или предпочтительно раковой клеткой, или который характерен для раковой клетки, или который известен или применяется в качестве маркера раковых клеток. Указанным раковым антигеном может быть указанный раковый антиген, т.е. антиген, часто обнаруживаемый при широком спектре разных раковых заболеваний, или может быть специфичен для конкретного типа рака. В качестве альтернативы это может быть антиген из патогена-возбудителя инфекции, который представлен на поверхности клетки-мишени, или любой другой

антиген, экспрессируемый или представляемый любой другой клеткой, которую желательно упразднить.

Термин "ГКГС" относится к белку главного комплекса гистосовместимости и включает белки и ГКГС I, и ГКГС II. Белки ГКГС II обычно обнаруживаются только на поверхности антиген-представляющих клеток, таких как дендритные клетки, мононуклеарные фагоциты, некоторые эндотелиальные клетки и эпителиальные клетки тимуса. Белки ГКГС II также экспрессируются В-лимфоцитами и, следовательно, могут экспрессироваться злокачественными опухолями из В-лимфоцитов. Также белки ГКГС II часто экспрессируются клетками меланомы. Термин "ГКГС" охватывает лимфоцитарный антиген человека (HLA), и, таким образом, в тех случаях, когда субъектом является человек, указанные термины могут применяться взаимозаменяемо.

Согласно настоящему изобретению можно применять любую НК-клетку. Термин "НК-клетка" относится к большому гранулярному лимфоциту, который является цитотоксическим лимфоцитом, происходящим из общего лимфоидного предшественника, который по своей природе не содержит антиген-специфического рецептора (например, рецептора Т-лимфоцитов или рецептора В-лимфоцитов). НК-клетки можно отличать по их CD3⁺, CD56⁺-фенотипу. Таким образом, в настоящем описании указанный термин включает любую известную НК-клетку, или любую НК-подобную клетку, или любую клетку с характеристиками НК-клетки.

Согласно одному варианту реализации НК-клетки могут быть получены из организма субъекта и выращены *in vitro* для получения популяции НК-клеток для применения согласно настоящему изобретению. НК-клетки могут быть аутологичными (т.е. полученными из организма субъекта, которого требуется лечить при помощи указанных клеток и способов согласно настоящему изобретению), или могут быть гетерологичными (т.е. клетки могут быть получены из организма субъекта-донора и могут предназначаться для лечения второго субъекта (т.е. они могут быть аллогенными, изогенными или ксеногенными)). Таким образом, можно применять первичные НК-клетки. Согласно альтернативному варианту реализации согласно настоящему изобретению можно применять НК-клетку, известную в данной области техники, которая предварительно была изолирована и культивирована. Таким образом, можно применять линию НК-клеток. Известен и в литературе описан ряд разных НК-клеток, и применять можно любые из них, или из первичной НК-клетки можно получить культуру, например, путем вирусной трансформации (Vogel B et al. 2014 Leukemia 28:192-195). Линии клеток могут иметь ряд преимуществ по сравнению с первичными НК-клетками, например, их может быть легче выращивать и поддерживать в культуре, легче размножать, и они более доступны при необходимости со стандартизированным качеством для терапии на основе адоптивного переноса клеток. Определенные линии клеток, например, линия NK-92, могут также проявлять более высокую цитотоксическую активность, и в своем немодифицированном состоянии (т.е. будучи не модифицированными согласно настоящему изобретению) они могут обладать более широким спектром клеток-мишеней, например, раковых клеток-мишеней (это может быть связано с отсутствием или сокращением количества ингибиторных рецепторов). Помимо NK-92, подходящие НК-клетки включают (но никоим образом не ограничиваются) линии клеток NK-YS, NK-YT, MOTN-1, NKL, KHYG-1, HANK-1 или NKG.

Согласно предпочтительному варианту реализации клеткой является NK-92 (Gong et al., 1994, Leukemia 8, 652-658) или ее вариант. Был получен, описан или доступен ряд разных вариантов исходных NK-92, которые неиммуногенны. Можно применять любые такие варианты, и они включены в термин "NK-92". Однако любой NK-92 или в действительности любая НК-клетка для применения согласно настоящему изобретению не должна быть модифицирована так, чтобы она экспрессировала любой антиген-специфичный рецептор помимо TcR, который вводится или предназначен для введения в НК-клетку, модифицированную согласно настоящему изобретению. Например, клетка не должна экспрессировать CAR (моноклональное антитело, соединенное с внутриклеточным сигнальным доменом из комплекса TcR). В более широком смысле модифицированная НК-клетка согласно настоящему изобретению не экспрессирует антиген-специфического рецептора на основе распознающих участков антитела или содержащего такие участки. В норме НК-клетка не содержит антиген-специфичных рецепторов, и, таким образом, единственным антиген-специфичным рецептором, присутствующим в клетках согласно настоящему изобретению, является TcR, который вводится или предназначен для введения в указанную НК-клетку.

Согласно настоящему изобретению модифицированная НК-клетка неиммуногенна. С функциональной точки зрения это означает, что указанная клетка не распознается иммунной системой любого субъекта, в организм которого ее вводят - она проходит незамеченной для системы иммунологической защиты и не отторгается или не распознается организмом субъекта-реципиента как чужеродная. Иначе говоря, на модифицированные НК-клетки не возникает никакого клинически значимого иммунологического ответа со стороны иммунной системы субъекта, которому вводят указанные модифицированные НК-клетки. Так, клетка может быть неиммуногенной, когда она, будучи введенной субъекту, не генерирует иммунного ответа, который нарушает, мешает или препятствует применению указанных клеток в терапии.

Таким образом, в настоящем описании термин "неиммуногенный" применяется в широком смысле и означает, что, когда клетку вводят субъекту путем инъекции или другим путем, по существу не возни-

кает или не возникает клинически значимого иммунного ответа на указанную клетку. Более конкретно, клетка не вызывает (или не способна вызывать) иммунного ответа, достаточного для того, чтобы привести к отторжению указанной клетки и/или нарушить функцию указанных клеток, например, иммунного ответа недостаточно, чтобы упразднить или существенно или значимо снизить функцию или действие (например, пользу) указанных клеток. Таким образом, клетки сохраняют цитотоксическую активность в отношении клетки-мишени. Согласно конкретному варианту реализации, клетка не отторгается как чужеродная. Как и для любой биологической системы, отсутствие иммунного ответа может не быть абсолютным (или 100%). Небольшой (или легкий, или незначительный) иммунный ответ на НК-клетку (например, незначительный иммунный ответ) может быть переносимым, если функция или польза от указанных клеток существенно не нарушена (т.е. если указанные клетки все еще выполняют свою функцию).

Следовательно, можно увидеть, что аутологичная клетка (которая является клеткой, которая вводится или предназначена для введения тому же субъекту, из организма которого она получена) будет неиммуногенной (потому что она "своя"). Аналогично неаутологичная соответствующая по ГКГС НК-клетка будет неиммуногенной или по существу неиммуногенной. Таким образом, термин "неиммуногенный" включает функциональную неиммуногенность. Однако согласно определенным вариантам реализации, и как отмечалось выше, неиммуногенная НК-клетка согласно настоящему изобретению является неиммуногенной независимо от реципиента указанной клетки, т.е. независимо от субъекта, в организм которого она вводится или предназначена для введения (т.е. она не должна вызывать клинически значимого иммунного ответа, если ее вводят неаутологичному субъекту). Согласно конкретным вариантам реализации НК-клетку можно подвергать обработке, чтобы она стала неиммуногенной (т.е. она может быть модифицирована так, чтобы она стала неиммуногенной). Например, обработка может быть физической, химической или биологической, или может представлять собой структурную или физико-химическую модификацию клеток (например, обработка, которая вызывает структурное или физическое изменение или модификацию клеток), например облучение, или генетическую модификацию, например для уменьшения или исключения экспрессии ГКГС клеткой. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации НК-клетка не просто не является функционально иммуногенной, а обладает или содержит модификацию, которая делает ее неиммуногенной.

Соответственно, НК-клетки могут быть по своей природе неиммуногенными или могут быть модифицированы так, чтобы они стали неиммуногенными. Неиммуногенные по своей природе НК-клетки не будут экспрессировать молекулу ГКГС или демонстрировать лишь слабую экспрессию молекулы ГКГС, или могут экспрессировать нефункциональную молекулу ГКГС, которая не может стимулировать иммунологический ответ. НК-клетки, которые могут быть иммуногенными, можно модифицировать так, чтобы исключить экспрессию молекулы ГКГС или чтобы молекула ГКГС лишь экспрессировалась на их поверхности на низком уровне. В качестве альтернативы такие клетки можно модифицировать так, чтобы они экспрессировали нефункциональную молекулу ГКГС.

Любые такие клетки (неиммуногенные по своей природе или некоторым образом модифицированные) не содержат на своей поверхности ГКГС в достаточном количестве, чтобы запускать клинически значимый иммунологический ответ за счет иммунного ответа субъекта, и могут считаться ГКГС-негативными. Иными словами, ГКГС-негативная клетка не экспрессирует на своей поверхности молекулу ГКГС, которая иммунологически функциональна, или не демонстрирует значимо высокого уровня экспрессии молекулы ГКГС на своей поверхности, чтобы она могла распознаваться другой иммунной клеткой, в частности не своей иммунной клеткой или иммунной клеткой из организма предполагаемого субъекта-реципиента. Клетка может не содержать молекулы ГКГС, или может не экспрессировать ГКГС на своей поверхности, или экспрессировать ГКГС на своей поверхности лишь в слабой степени, или любая молекула ГКГС, которая экспрессируется, может быть нефункциональной, например, она может быть мутирована или модифицирована иным образом так, чтобы она стала нефункциональной. Включены любые способы, которые нарушают экспрессию функциональной молекулы ГКГС. Следовательно, они могут включать инактивацию (нокадаун) или устранение "нокауте" гена молекулы из комплекса ГКГС и/или они могут включать модификацию, которая препятствует адекватному транспорту и/или корректной экспрессии молекулы ГКГС, или всего комплекса, на поверхности клетки.

В частности, может быть нарушена экспрессия одного или более белков ГКГС I класса на поверхности клетки согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации указанные клетки могут быть клетками человека, которые HLA-негативны, и, соответственно, клетками, в которых нарушена экспрессия одной или более молекул HLA (например, инактивирована), например, молекул комплекса ГКГС I класса HLA.

Согласно предпочтительному варианту реализации, нарушение экспрессии ГКГС I класса можно осуществить путем инактивации гена, кодирующего β_2 -микроглобулин - компонент зрелого комплекса ГКГС I класса. Экспрессию β_2 m можно исключить посредством направленного разрушения гена β_2 -микроглобулина (β_2 m), например, посредством сайт-направленного мутагенеза промотора β_2 m (с целью инактивации промотора), или в гене, кодирующем белок β_2 m для введения инактивирующей мутации, которая препятствует экспрессии белка β_2 m, например, мутация со сдвигом рамки или введение прежде-

временного "СТОП"-кодона в указанный ген. В качестве альтернативы можно применять сайт-направленный мутагенез, чтобы сгенерировать нефункциональный белок β_2m , который неспособен образовывать активный белок ГКГС на поверхности клетки. Таким путем белок β_2m ГКГС может оставаться внутри клетки или может появляться на поверхности, но быть нефункциональным.

В качестве альтернативы НК-клетку перед введением субъекту можно облучить. Было показано, что НК-92, которые были облучены, были неиммуногенными в клинических исследованиях, и было получено разрешение на их применение в иммунотерапии (Ton T. et al. 2013 Cytotherapy 15 1563-70).

Без привлечения теории следует отметить, что предполагается, что облучение клеток приводит к тому, что такие клетки присутствуют в организме субъекта лишь временно, и, таким образом, уменьшается время, в течение которого иммунная система субъекта генерирует иммунологический ответ на модифицированные НК-клетки. Хотя такие клетки могут экспрессировать на своей поверхности функциональную молекулу ГКГС, они могут также считаться неиммуногенными.

Так, НК-клетка согласно настоящему изобретению может быть модифицирована так, чтобы она была неиммуногенной, путем снижения ее способности или потенциала к пролиферации, то есть путем снижения ее пролиферативной способности.

НК-клетка согласно настоящему изобретению может быть модифицирована так, чтобы она экспрессировала CD3. Как упоминалось выше, НК-клетка согласно настоящему изобретению не экспрессирует CAR, или в действительности любого антиген-специфичного рецептора, кроме TcR. Так, в частности, за исключением случая гибрида TcR-CD3, CD3 не экспрессируется как часть химерного рецептора. Более конкретно, CD3 не экспрессируется как часть химерного антигенного рецептора (CAR), или любого химерного рецептора на основе (или содержащего) антиген-связывающего участка(ов), полученного из антитела, или связывающего домена, полученного из любой связывающей молекулы или компонента, которые не являются TcR, например, из любого другого партнера по аффинному связыванию, например, из лиганда или рецептора, отличного от TcR. Таким образом, CD3 не экспрессируется как часть химерного рецептора, который содержит антиген-связывающий домен (т.е., связывающую часть или компонент) или любой связывающий домен или лиганд, который не является TcR, или который не получен из TcR. Иными словами, CD3 экспрессируется независимо (т.е. как отдельная молекула или цепь, или как часть химерного белка с компонентом, который не является цепью CD3 или ее частью, или молекула линкера или спейсера), и/или он экспрессируется как часть (или в составе) гибрида TcR-CD3. Соответственно, в частности, НК-клетка согласно настоящему изобретению не экспрессирует CAR или другого химерного рецептора, который содержит цепь или молекулу CD3, кроме как гибрида CD3-TcR. Согласно одному варианту реализации, когда используют CD3, или как часть гибрида (т.е. гибридного белка), он представляет собой гибрид CD3 или гибрид CD3-TcR, как более подробно описано ниже.

В норме (или по своей природе) НК-клетки не экспрессируют CD3 и, следовательно, чтобы придать указанной клетке способность экспрессировать CD3, в клетку вводят молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CD3. Таким образом, клетку модифицируют, чтобы она рекомбинантно экспрессировала CD3. Иными словами, клетку модифицируют, чтобы была возможна экспрессия гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей CD3. CD3 может подбираться под вид клетки (т.е. того же вида, из которого получена клетка), однако можно также применять CD3 из других видов. Так, для НК-клетки человека можно экспрессировать CD3 человека, или CD3 других видов млекопитающих, например, мыши, крысы, кролика и др. Согласно предпочтительному варианту реализации в НК-клетке экспрессируются все из цепей CD3 (т.е. CD3 γ -цепь, CD3 δ -цепь, две CD3 ϵ -цепи и ζ -цепь). Однако также предполагается, что присутствует только одна цепь CD3 (например, только CD3 γ -цепь, или только CD3 δ -цепь, или только CD3 ϵ -цепь, или только CD3 ζ -цепь) или любое их сочетание. Так, НК-клетка может быть модифицирована, чтобы она экспрессировала любую цепь CD3 по отдельности, или в сочетании с другими цепями CD3, вплоть до полной молекулы CD3 и включая ее. Без привлечения теории следует отметить, что выдвинута гипотеза о том, что может быть возможно направлять TcR на поверхность клетки и/или инициировать передачу сигнала, когда одна или более из цепей CD3 не экспрессируются на НК-клетке. Также предполагается, что одна или более из цепей CD3 может быть представлена в форме гибридного белка, в котором по меньшей мере две цепи экспрессируются как единый полипептид при условии, что сохраняется локализация и сигнальные функции CD3.

Также одна или более цепей CD3 могут кодироваться одной молекулой нуклеиновой кислоты или более чем одной молекулой нуклеиновой кислоты, например, разными молекулами. Традиционно будет создаваться конструкция, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую все три цепи CD3, например, под контролем одного промотора, или одинаково соединенных друг с другом.

НК-клетку согласно настоящему изобретению можно дополнительно модифицировать так, чтобы она экспрессировала TcR. TcR можно считать любой рецептор, содержащий антиген-распознающий домен TcR, антиген-распознающую последовательность или их фрагмент, которые селективно связываются с антигеном на поверхности клетки-мишени. Таким образом, в контексте настоящего изобретения TcR может быть каноническим TcR, содержащим антиген-распознающий домен TcR, антиген-распознающую последовательность, или он может содержать антиген-распознающий домен TcR, антиген-

распознающую последовательность или их фрагмент, соединенные с аминокислотной последовательностью и/или белковыми доменами (т.е. как часть химерной молекулы или гибридного белка), который в природе не обнаруживается вместе с TcR (т.е. ненативный контекст). Таким образом, в настоящем описании термин "TcR" применяют в широком смысле и включает любой антигенный рецептор, в котором антиген-распознающий участок представлен антиген-распознающим доменом или последовательностью TcR, например, антиген-распознающий участок из нативного TcR, или получен из нативного TcR. Соответственно, термин "TcR" включает нативные и ненативные TcR, то есть синтетические или искусственные молекулы или конструкции TcR, варианты или производные TcR, полученные из природного TcR или на его основе.

Таким образом, NK-клетка, экспрессирующая TcR, обладает антиген-специфичной (т.е. направленной) цитотоксической активностью в отношении клетки-мишени. Указанным TcR может быть любой TcR, обладающий специфичностью в отношении антигена на рассматриваемой клетке-мишени (целевой антиген). Специфичность NK-клетки (т.е. антиген, с которым она связывается) будет определяться специфичностью TcR. Иными словами, для придания NK-клетке желаемой специфичности (т.е. специфичности в отношении специфического антигена на клетке-мишени) необходимо выбрать подходящий TcR. Так, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложена NK-клетка, модифицированная так, чтобы она экспрессировала CD3, и дополнительно модифицированная так, чтобы она экспрессировала TcR, обладающий специфичностью в отношении антигена на клетке-мишени.

Согласно одному предпочтительному варианту реализации TcR связывается с антигеном на поверхности клетки-мишени с высокой аффинностью (т.е. TcR является высокоаффинным TcR). Согласно такому преимущественному варианту реализации TcR способен связываться с комплексом ГКГС-антиген на поверхности клетки-мишени с достаточно высокой аффинностью, чтобы клетка, экспрессирующая TcR, могла подвергнуться активации в отсутствие корецепторов CD8/CD4, которые обычно требуются для активации TcR в цитотоксической клетке или Т-хелпере, соответственно. Таким образом, согласно настоящему изобретению предложена NK-клетка, модифицированная так, чтобы она экспрессировала CD3, и дополнительно модифицированная так, чтобы она экспрессировала TcR, обладающий специфичностью в отношении антигена на клетке-мишени, причем TcR связывается с указанной клеткой-мишенью с высокой аффинностью и подвергается активации в отсутствие корецепторов CD8 и/или CD4. Альтернативно экспрессируемый, TcR, который вводится в NK-клетку согласно настоящему изобретению, не зависит от корецепторов (кофакторов); то есть он не требует дополнительного рецептора или кофактора для активации клетки (т.е. чтобы произошла передача сигнала в клетке, вызванная связыванием TcR). Таким образом, TcR может связываться с антигеном (комплекс ГКГС-антиген) со значением K_{off} в нормальном физиологическом диапазоне. В частности, он не зависит от CD8 и/или CD4, например, не зависит от CD8, и более конкретно, не зависит от CD8 и CD4. Однако согласно альтернативному варианту реализации NK-клетка может быть дополнительно модифицирована так, чтобы она экспрессировала CD8 и/или CD4.

TcR распознает антиген (пептид), представленный на поверхности клетки белком из семейства ГКГС I или II класса, и связывается с таким антигеном. Таким образом, распознавание антигена зависит как от типа клетки по ГКГС, так и от пептида (более конкретно, последовательности пептида) (антигена). В общем случае целевой антиген известен, и TcR выбирают в соответствии со специфичностью данного антигена. Согласно предпочтительному варианту реализации может быть известна последовательность пептида антигена, представляемого клеткой-мишенью. Кроме того, может быть также известен тип клетки-мишени по ГКГС. Так, согласно предпочтительному варианту реализации может быть выбран такой TcR, что он способен специфически связываться с комплексом антиген-ГКГС на поверхности клетки-мишени. Так, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения предложена NK-клетка, модифицированная так, чтобы она экспрессировала CD3, и дополнительно модифицированная, чтобы она экспрессировала TcR, обладающий специфичностью в отношении антигена на клетке-мишени, причем указанный TcR способен специфично связываться с комплексом антиген-ГКГС на поверхности клетки-мишени.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения может быть выбран TcR из цитотоксического Т-лимфоцита, для которого было показано, что он специфично проявляет цитотоксичность в отношении клетки-мишени или Т-хелпера. В качестве альтернативы может быть выбран антиген-распознающий домен или последовательность такого TcR или его фрагмент. Указанный Т-лимфоцит может быть получен из организма пациента, который будет подвергаться лечению, или может быть получен из организма другого субъекта (т.е. донора TcR). Так, в качестве TcR может быть выбран TcR из Т-лимфоцита, для которого показано, что он обладает "подтвержденной" активностью в отношении клетки-мишени. В качестве примера, Т-лимфоциты, например, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, можно изолировать из организма пациента, страдающего раком. По своей природе указанные клетки будут представлять собой или включать Т-лимфоциты, которые активны в отношении раковой опухоли указанного пациента. Гены, кодирующие TcR таких клеток, можно идентифицировать и клонировать, и применить для экспрессии TcR, или антиген-распознающего домена или последовательности такого TcR, или их фрагменте, в NK-клетке согласно настоящему изобретению. Т-лимфоциты можно

получить в организме пациента или субъекта посредством вакцинации, например, путем введения вакцины, содержащей раковый антиген. Затем можно отобрать такие Т-лимфоциты, индуцированные посредством вакцинации, которые наиболее активны в отношении раковой опухоли в организме субъекта, или в отношении раковых клеток. Таким путем можно отбирать наиболее мощные или эффективные ТсR, например, ТсR с максимальной аффинностью, или которые не зависят от корецепторов. Чтобы получить оптимальный ТсR, можно проводить "созревание аффинности".

Преимуществом будет, если профиль HLA или профиль ГКГС субъекта, из организма которого получен ТсR (донор ТсR), будет таким же, как профиль HLA или профиль ГКГС субъекта, которого требуется лечить. Как отмечалось выше, можно идентифицировать и охарактеризовать ТсR в Т-лимфоците, обладающем специфичностью к клетке-мишени, и можно получить аминокислотную последовательность указанного ТсR и нуклеотидную последовательность гена, кодирующего ТсR. Повторим, что у субъекта может быть идентифицирован цитотоксический Т-лимфоцит или Т-хелпер, содержащий ТсR, обладающий специфичностью в отношении определенного антигена на клетке-мишени, и может быть получена аминокислотная последовательность рецептора и последовательность ДНК гена, кодирующего рецептор. Последовательность ДНК или ген можно применять для получения молекулы нуклеиновой кислоты или конструкции для введения в НК-клетку, чтобы ТсR смог экспрессироваться в НК-клетке хозяина (т.е. реципиента).

Согласно альтернативному варианту реализации настоящего изобретения можно применять искусственный ТсR (т.е. ТсR, не идентифицированный из цитотоксического Т-лимфоцита или Т-хелпера). ТсR может быть искусственно сгенерированным аллореактивным ТсR. Связывающий домен ТсR можно сгенерировать на основе комбинаторного способа, такого как фаговый дисплей или рибосомальный дисплей, и можно получать химерный белок, содержащий искусственный связывающий домен, специфичный в отношении конкретного сочетания антигена и ГКГС (например, HLA).

ТсR может быть предложен в виде конструкции или гибрида, содержащего другие белковые домены.

В виде гибридного белка вместе с ТсR могут экспрессироваться одна или более цепей CD3 (или конструкция всего CD3). Иными словами, одна или несколько цепей CD3 могут присутствовать в той же полипептидной цепи, что и ТсR. Согласно одному предпочтительному варианту реализации молекула CD3, или одна или более цепей CD3 (например, CD3 γ -цепь, CD3 δ -цепь, CD3 ϵ -цепь или CD3 ζ -цепь или любое их сочетание) может присутствовать в виде гибридной конструкции ТсR-CD3, которая будет непосредственно направляться в плазматическую мембрану, т.е. без потребности в том, чтобы в клетке присутствовала также дополнительная молекула CD3 (поскольку гибридная конструкция сохраняет трансмембранный домен, например, обеспечиваемый цепью CD3) (Willemsen RM 2000 Gene Therapy 7:1369-1377). Так, согласно такому варианту реализации клетка может быть модифицирована, чтобы она одновременно экспрессировала CD3 и ТсR, как часть одной и той же конструкции или гибрида. Хотя может не быть необходимости в отдельно экспрессируемом CD3, тем не менее, он может быть предложен, например, чтобы улучшить передачу сигнала и, следовательно, повысить активность клетки.

Как было отмечено выше, можно разработать панель разных ТсR, причем каждый ТсR в панели будет обладать специфичностью в отношении (например, специфичная аффинность в отношении) конкретного комплекса антиген-ГКГС. Таким образом, могут распознаваться разные антигены и/или разные эпитопы на целевом антигене, и/или указанные ТсR могут обладать разной аффинностью и/или специфичностью в отношении антигена. Кроме того, для конкретного целевого антигена указанная панель может содержать ТсR с разной специфичностью ГКГС (или типом ГКГС). Таким путем, из панели может быть выбран конкретный ТсR, способный связываться со специфическим комплексом антиген-HLA, для применения в способах согласно настоящему изобретению, то есть ТсR, который соответствует и целевому антигену, и типу ГКГС субъекта. Так, согласно конкретному предпочтительному варианту реализации можно выбрать специфический ТсR в зависимости от природы антигенов, представляемых конкретными клетками-мишенями, и их типа ГКГС (например, HLA). Предполагается, что такую панель можно применять, чтобы было возможно быстрое генерирование НК-клеток, обладающих специфичной цитотоксической активностью в отношении клетки-мишени. Соответственно, способ согласно настоящему изобретению для получения НК-клетки, обладающей специфичностью в отношении клетки-мишени, может включать:

- а) модификацию НК-клетки, такую, чтобы она экспрессировала CD3;
- б) определение профиля ГКГС у указанной клетки-мишени и природы антигена, представляемого указанной клеткой-мишенью; и
- с) модификацию НК-клетки, такую, чтобы она экспрессировала ТсR, причем указанный ТсR выбран из панели ТсR, каждый из которых обладает специфичностью к другому антигену и/или типу ГКГС, и причем указанный ТсR обладает специфичностью в отношении ГКГС и антигена, представляемого на указанной клетке-мишени.

ТсR могут быть представлены в панели в форме молекул нуклеиновых кислот, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие ТсR. В целях удобства молекулы нуклеиновых кислот могут содержаться в векторах в НК-клетках. Молекула нуклеиновой кислоты может быть ДНК или РНК. Например, ТсR могут быть представлены в форме мРНК (матричной РНК) или вирусных векторов, напри-

мер, ретровирусных векторов.

Согласно одному варианту реализации НК-клетка модифицирована так, чтобы она экспрессировала TcR, после того как данная клетка была модифицирована, чтобы экспрессировать CD3. Таким образом, как отмечалось выше, можно получить универсальную НК-клетку путем модификации неиммуногенной НК-клетки, чтобы она экспрессировала CD3. Такие модифицированные НК-клетки можно выращивать или поддерживать в культуре, или хранить для будущего применения. Соответственно, согласно одному варианту реализации указанной клетке можно позволить воспроизводиться с образованием популяции НК-клеток, экспрессирующих CD3, до того, как она будет модифицирована так, чтобы она экспрессировала TcR. НК-клетки могут расти в культуре или размножаться. Согласно альтернативному варианту реализации предусмотрено, что клетку можно модифицировать, чтобы она экспрессировала CD3 и TcR, в одно и то же время, или по существу в одно и то же время. Согласно одному варианту реализации для модификации клетки, чтобы она экспрессировала и CD3, и TcR, можно применять единый вектор или конструкция, содержащий гены как для CD3, так и для TcR, а согласно другим вариантам реализации можно также применять отдельные векторы. Как обсуждалось выше, в НК-клетке может также экспрессироваться гибридный белок, содержащий функционалы TcR и CD3 в одной полипептидной молекуле, и, таким образом, вектор или конструкцию, кодирующую такой гибридный белок, можно применять для модификации клетки. НК-клеткам, модифицированным так, чтобы они экспрессировали CD3 и TcR, можно позволить воспроизводиться, например, их можно выращивать в культуре, или размножиться перед введением указанных клеток субъекту. Так, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения можно сгенерировать популяцию НК-клеток, экспрессирующих CD3, и субпопуляцию клеток NK:CD3 можно модифицировать так, чтобы они экспрессировали TcR, обладающий специфичностью в отношении антигена на поверхности клетки-мишени.

Модифицированные НК-клетки согласно настоящему изобретению также можно подвергать модификации другими путями, например, чтобы изменить или модифицировать другие аспекты функции или поведения клетки, и/или чтобы они экспрессировали другие белки. Например, клетки можно модифицировать так, чтобы они экспрессировали хоминг-рецептор или рецептор локализации, которые призваны направлять или улучшать локализацию клеток в конкретной ткани или участке организма. Также клетки можно модифицировать так, чтобы они экспрессировали один или более компонентов сигнального пути Т-лимфоцитов, чтобы усилить цитотоксический ответ, проявляемый НК-клетками. Любую такую модификацию можно проводить до, после или одновременно с модификацией согласно настоящему изобретению.

Клетку согласно настоящему изобретению можно модифицировать так, чтобы изменилась ее способность к воспроизведению *in vivo* и/или *in vitro*. Согласно одному варианту реализации можно увеличивать способность клетки к воспроизведению (т.е. способность клетки воспроизводиться, т.е., пролиферировать). Согласно одному предпочтительному варианту реализации этого можно достичь путем такой модификации клеток, чтобы у них усилилась экспрессия цитокина, такого как ИЛ-2 (интерлейкин-2). Обычно ИЛ-2 требуется НК-клетке для роста и поддержания цитолитической функции, и, таким образом, клеткам, экспрессирующим ИЛ-2, не требуется дополнительный ИЛ-2 в качестве добавок к среде для роста, и они сохраняют цитотоксическую активность, когда их вводят субъекту. Экспрессию цитокина можно усилить путем введения гетерологичного (ненативного) вектора или конструкции, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую цитокин, в клетку, или, в качестве альтернативы, можно усилить экспрессию эндогенного гена, кодирующего цитокин. Экспрессия цитокина может быть конститутивной (т.е. промотор, контролирующей экспрессию гена, кодирующего цитокин, может быть конститутивно активен, или "включен"), или может быть индуцируемым внешним стимулом.

Согласно одному варианту реализации клетку можно модифицировать так, чтобы она обладала повышенной способностью к воспроизведению, до того, как клетка будет модифицирована, чтобы она экспрессировала CD3 и/или TcR. Согласно другому варианту реализации клетку можно модифицировать так, чтобы она обладала повышенной способностью к воспроизведению, после того, как клетка будет модифицирована, чтобы она экспрессировала CD3 и/или TcR. Согласно альтернативному варианту реализации клетку можно модифицировать так, чтобы она обладала повышенной способностью к воспроизведению, после того, как клетка будет модифицирована, чтобы она экспрессировала CD3, но до того, как она будет модифицирована, чтобы она экспрессировала TcR (т.е., таким образом, возможно получить большую популяцию НК-клеток, экспрессирующих CD3, до того, как модифицировать клетки, чтобы они экспрессировали TcR). В качестве альтернативы любые две или более из перечисленных выше модификаций можно проводить по существу в одно и то же время. Согласно одному варианту реализации все три модификации можно проводить по существу в одно и то же время.

Пролиферативную способность и жизнеспособность (выживание) НК-клеток согласно настоящему изобретению можно также снизить перед тем, как вводить их пациенту. Как отмечалось выше, это можно сделать, чтобы клетка стала неиммуногенной. Согласно предпочтительному варианту реализации способность к воспроизведению и/или жизнеспособность клетки можно снизить посредством облучения. Способность к воспроизведению и/или жизнеспособность клетки можно снизить (т.е. воспроизведение может стать медленнее) или исключить, в зависимости от дозы и природы излучения, воздействующего на клетки. Облучение можно проводить из любого источника α , β или γ -излучения, или это может быть

рентгеновское излучение или ультрафиолетовый свет. Дозы излучения 5-10 Гр может быть достаточно, чтобы упразднить пролиферацию, однако другие подходящие дозы облучения могут включать 1-10, 2-10, 3-10, 4-10, 6-10, 7-10, 8-10 или 9-10 Гр, или более высокие дозы 11, 12, 13, 14, 15 или 20 Гр. В качестве альтернативы, НК-клетки можно модифицировать так, чтобы они экспрессировали "ген суицида", который позволяет клеткам индуцируемо уничтожаться или препятствовать их воспроизведению в ответ на внешний стимул.

Клетку можно модифицировать так, чтобы А) она обладала повышенной способностью к воспроизведению и В) обладала сниженной способностью к воспроизведению и/или жизнеспособностью. Две указанные модификации можно производить последовательно в любом порядке (т.е. А, а затем В, или В, а затем А), или можно производить по существу в одно и то же время (А и В вместе). Согласно такому варианту реализации клетку можно модифицировать так, чтобы она экспрессировала цитокин (например, ИЛ-2), чтобы усилить рост клеток *in vitro*, до, одновременно или после модификации клетки, такой, чтобы она экспрессировала CD3 и/или TcR, и впоследствии можно модифицировать так, чтобы ее способность к воспроизведению и/или жизнеспособность снизилась до введения клетки в организм субъекта.

Как будет понятно на основании вышеизложенного, клетку согласно настоящему изобретению можно модифицировать, чтобы изменить в ней уровень экспрессии одного или более генов, или, в частности, чтобы стала возможна экспрессия одного или более генов, которые в норме данной клеткой не экспрессируются. Чтобы создать возможность для экспрессии такого гетерологичного гена, в клетку вводят молекулу нуклеиновой кислоты, соответствующую или содержащую рассматриваемый ген. В целях удобства молекулу нуклеиновой кислоты можно вводить в клетку в составе вектора или рекомбинантной конструкции. Способы экспрессии гетерологичных генов известны в технике, как в плане получения конструкций/векторов, так и в плане введения молекулы нуклеиновой кислоты (вектора или конструкции) в клетку. Так, в технике хорошо известны промоторы и/или другие последовательности, регулирующие экспрессию, подходящие для применения с клетками млекопитающих, в частности с лимфоидными клетками или НК-клетками, и соответствующие векторы (например, вирусные векторы).

Векторы или конструкции (молекулы нуклеиновых кислот) можно вводить в клетку согласно настоящему изобретению разными путями, включая химические агенты для трансфекции (такие как фосфат кальция, органические соединения с разветвленными цепями, липосомы или катионные полимеры), электропорацию, сжатие клеток, образование пор под действием ультразвука, гидродинамическую доставку или вирусную трансдукцию. Согласно предпочтительному варианту реализации вектор или конструкцию вводят посредством вирусной трансдукции. Молекулы гетерологичных нуклеиновых кислот, вводимые в клетку, могут экспрессироваться эпизотально, или могут интегрироваться в геном клетки в соответствующем локусе.

Способы культивирования клеток и реагенты, подходящие для НК-клеток, также хорошо известны в технике. Можно применять любой желаемый способ культивирования клеток, в зависимости от выбора и удобства и т.д. Например, можно применять тефлоновые пакеты для крупномасштабного культивирования, или автоматические системы для культивирования клеток.

Клеткой-мишенью согласно настоящему изобретению может быть раковая клетка. В настоящем описании рак определяют в широком смысле и включает любое новообразование, злокачественное, предраковое или незлокачественное. Однако обычно это может быть онкологическое заболевание. Предусматриваются солидные и несолитные опухоли, и термин "раковая клетка" может рассматриваться как синоним "клетки опухоли".

Подразумевается любой тип рака, включая и солидные раковые опухоли, и гемопоэтические раковые заболевания. Типичные раковые заболевания включают острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый миелолейкоз (ОМЛ), аденокарциному, рак, связанный со СПИДом (например, саркома Капоши и лимфома), рак анального канала, рак аппендикса, астроцитомы, атипичную тератому/рабдоидную опухоль, базально-клеточную карциному, рак желчного протока, внепеченочный рак желчного пузыря, рак костей (например, саркома Юинга, остеосаркома и злокачественная фиброзная гистиоцитоксантома), глиому ствола мозга, рак мозга, рак молочной железы, бронхиальные опухоли, лимфому Беркитта, карциноидные опухоли, опухоли сердца, рак центральной нервной системы (включая атипичную тератому/рабдоидную опухоль, эмбриональные опухоли, гериогенную опухоль, лимфому), рак шейки матки, хордому, хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), хронический миелобластный лейкоз (ХМЛ), хроническое миелопролиферативное заболевание, рак толстой кишки, рак толстой и прямой кишки, краниофарингиому, кожную Т-клеточную лимфому, рак желчного протока, внепеченочную протоковую карциному *in situ* (DCIS), эмбриональные опухоли, рак эндометрия, эпидимому, рак пищевода, эстезионейробластому, саркому Юинга, экстракраниальную гериогенную опухоль, внегонадную гериогенную опухоль, внепеченочный рак желчного протока, рак глаз (включая внутриокулярную меланому и ретинобластому), фиброзную гистиоцитому кости, рак желчного пузыря, рак желудка, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, гастроинтестинальную стромальную опухоль (GIST), гериогенную опухоль, гестационную трофобластическую болезнь, глиому, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, рак сердца, печеночно-клеточный рак (печени), лингерганс-клеточный гистиоцитоз, лимфому Ходжкина, гипогаренгиальный рак, интраокулярную меланому, опухоли из островковых кле-

ток, нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы, саркому Капоши, рак почек (включая почечно-клеточную опухоль и опухоль Вильмса), ангиосаркому, лимфогранулематоз, рак гортани, лейкоз (включая острый лимфобластный (ОЛЛ), острый миелолейкоз (ОМЛ), хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), хронический миелобластный лейкоз (ХМЛ), рак губ и ротовой полости, рак печени (первичный), лобулярную карциному *in situ* (LCIS), рак легких, лимфому, макроглобулинемию Вальденстрема, меланому, карциному из клеток Меркеля, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытым первичным раком, карциному срединного тракта с вовлечением гена *NUT*, рак ротовой полости, синдромы множественной эндокринной неоплазии, детские, множественную миелому/плазмноклеточную опухоль, грибовидный микоз, миелодиспластические синдромы, миелодиспластические/миелолипролиферативные новообразования, множественную миелому, миелолипролиферативные нарушения, рак носовой полости и придаточных пазух носа, рак носоглотки, нейробластома, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легкого, рак рта, рак ротовой полости, рак ротоглотки, рак яичников, рак поджелудочной железы, нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы (опухоли из островковых клеток), папилломатоз, рак носовой полости и придаточных пазух носа, рак паращитовидных желез, рак полового члена, фарингеальный рак, феохромоцитому, опухоль гипофиза, плазмноклеточную опухоль/ множественную миелому, плевральный рак, рак при беременности и рак молочных желез, первичную лимфому центральной нервной системы (ЦНС), рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак (почек), переходно-клеточный рак почек, таза и мочевого пузыря, ретинобластома, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, саркому, ретикулярную эритродермию, рак кожи, мелкоклеточный рак легких, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточный рак, плоскоклеточный рак шеи со скрытым первичным раком, метастатический, рак желудка, Т-клеточную лимфому, рак яичка, рак горла, тимому и рак вилочковой железы, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак почек, таза и мочевого пузыря, рак матки, эндометрия, саркому матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса.

Как отмечалось выше, было показано, что ряд раковых опухолей экспрессируют конкретные или специфические раковые антигены, или они должны характеризоваться экспрессией конкретного или специфического ракового антигена. Таким образом, можно применять известный или общепризнанный раковый антиген. Как известно в технике, определенные антигены могут появляться при ряде разных типов рака, тогда как другие могут быть специфичны для конкретного типа рака. Однако в других случаях может быть целесообразно или необходимо охарактеризовать рак у субъекта и идентифицировать раковый антиген, подходящий для применения. Таким образом, любое раковое заболевание можно лечить при помощи ТсR, направленного на универсальный раковый антиген, и были идентифицированы такие ТсR. В качестве альтернативы раком может быть любой рак, который лечат в настоящее время или предполагают лечить посредством терапии на основе адаптивного переноса Т-лимфоцитов, например, распространенные раковые заболевания, такие как меланома, гематологические раковые заболевания, рак легких, рак толстой и прямой кишки. В качестве еще одной альтернативы рак может быть редким раком, для которого в настоящее время доступно мало вариантов лечения (например, со статусом орфанного лекарственного препарата), как, например, при раке или саркоме поджелудочной железы.

Согласно другим вариантам реализации клеткой-мишенью может быть инфицированная клетка и, в частности, клетка, инфицированная вирусом. Вирусом может быть ВИЧ (вирус иммунодефицита человека), но обычно это будет патогенный вирус. В качестве примера вирусом может быть ВИЧ, вирус гепатита (например, HBV (вирус гепатита В) или HCV (вирус гепатита С)), HPV (папилломавирус человека), CMV (цитомегаловирус) или EBV (вирус Эпштейна-Барр), ВГЧ-8 (вирус герпеса человека 8 типа), HTLV-1 (вирус Т-клеточного лейкоза человека), SV40 (вирус обезьян 40), энтеровирус. Другие возможные возбудители инфекции или патогены включают также бактерии, например, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, и паразитов, например, *Schistosoma haematobium*, печеночную двуустку, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* и малярию.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения клетки можно вводить субъекту непосредственно в вену. Согласно альтернативному варианту реализации клетки можно вводить непосредственно в опухоль посредством внутриопухолевой инъекции.

Доза клеток, вводимая субъекту, может варьировать в зависимости от природы клетки-мишени. Согласно предпочтительному варианту реализации, когда клеткой-мишенью является раковая клетка, дозу можно рассчитывать на основании типа рака, на который направлено лечение. Согласно предпочтительному варианту реализации субъекту можно вводить дозу приблизительно 10^9 клеток, однако она может варьировать в зависимости от типа и степени рака. Возможно, чтобы вводимая доза составляла приблизительно 10^6 , 10^7 или 10^8 клеток. В качестве альтернативы можно вводить более высокую дозу приблизительно 10^{10} , 10^{11} или 10^{12} клеток. Также вводимая доза клеток может варьировать в зависимости от размеров тела пациента, и, таким образом, можно вводить дозу 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} или 10^{12} клеток на m^2 поверхности тела пациента или на килограмм веса пациента.

Также предполагается, что для эффективного лечения субъекта может потребоваться несколько инфузий. Например, пациенту можно проводить 2, 3, 4, 5, 6 или более отдельных инфузий с интервалом 24 или 48 ч, или раз в 3, 4, 5, 6 или 7 дней. Также интервалы между инфузиями могут составлять неделю,

две недели или месяц, или интервалы по 6 недель или 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев. Также возможно проводить инфузии раз в год.

Субъектом, которого требуется лечить при помощи способов и клеток согласно настоящему изобретению, может быть млекопитающее любого вида. Например, субъектом может быть домашнее животное любого вида, например, мышь, крыса, песчанка, кролик, морская свинка, хомяк, кот или собака, или сельскохозяйственное животное, такое как коза, овца, свинья, корова или лошадь. Согласно дополнительному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения субъектом может быть примат, такой как обезьяна, гиббон, горилла, орангутанг, шимпанзе и бонобо. Однако согласно предпочтительному варианту настоящего изобретения субъектом является человек.

Предусматривается, что НК-клетки для применения согласно настоящему изобретению можно получить из организма млекопитающего любого вида, однако согласно предпочтительному варианту реализации НК-клетки будут получены из организма млекопитающего того же вида, что и субъект, которого требуется лечить. Кроме того, как отмечалось выше, согласно предпочтительному варианту реализации клетку можно модифицировать с применением генов, экспрессирующих белки млекопитающего того же вида (например, для субъекта-человека будут применяться CD3 и TcR человека). Однако возможно, что будут применяться также CD3 и TcR из организма другого вида, например, клетку можно модифицировать с применением генов, экспрессирующих CD3 мыши и TcR человека.

Настоящее изобретение может стать более понятным благодаря разделу "Примеры" ниже и применительно к чертежам, которые включают следующее.

На фиг. 1 показано, что CD3 можно экспрессировать в клетках NK-92. Ретровирусную конструкцию CD3-IRES-GFP вводили в NK-92. Флуоресценцию отслеживали по каналу FITC (флуоресцинизоцианат). В обозначенном участке показаны клетки GFP⁺. Черный цвет: нетрансфицированные клетки, серый цвет: трансфицированные клетки.

На фиг. 2 показано, что CD3 можно определять на поверхности NK-92, экспрессирующих CD3-IRES-GFP, в присутствии TcR. Отсортированные по CFP⁺ NK-92 (NK-92-CD3) подвергали суперинфицированию четырьмя разными TcR, а именно Радий-1 (TGFbRII специфичный к сдвигу рамки считывания, ГКГС-I), и вариант с цистеином -Радий-1_{cys}, DMF-5 (MART-1-специфичный, ГКГС-I), Радий-3 (hTERT-специфичный, ГКГС-II), и в качестве контроля процедуру проходили клетки без суперинфицирования. Клетки окрашивали антителом анти-CD3 с целью определения D3 на поверхности клетки, и флуоресценцию измеряли по каналам FITC (GFP) и APC (анти-CD3). Клетки в верхнем правом квадранте экспрессируют CD3 на своей поверхности.

На фиг. 3 показано, что TcR Радий-1 и DMF-5 могут специфически определяться на поверхности NK-92, экспрессирующих CD3-GFP. Клетки трансфицировали так, чтобы они экспрессировали CD3 и два разных TcR: Радий-1 (TGFbRII специфичный к сдвигу рамки считывания), DMF-5 (MART-1) и только CD3 (без TcR). Клетки окрашивали антителом, специфичным к V-бета, которое позволяет определять цепь V-бета Радия-1 (не DMF5, верхний ряд), или мультимером MART-1, чтобы определить TcR DMF-5 на поверхности клетки (нижний ряд). Флуоресценцию измеряли по каналам FITC (GFP) и APC (анти-Vb и M1-мультимер).

На фиг. 4 показано, что NK-92, модифицированные так, чтобы они экспрессировали CD3 и TcR Радий-1, демонстрируют антиген-специфичную цитотоксическую активность. NK-92, трансфицированные CD3-IRES-GFP (GFP⁺ - верхняя рамка - CD3_IRES_GFP), и клетки, которые не были трансфицированы (GFP⁻ - нижняя рамка - NTr), отсортировывались в две отдельные популяции. Клетки SupT1 отделяли от НК-клеток путем определения экспрессии маркера NK - CD56. Потерю зернистости отслеживали путем определения маркера CD107 в НК-клетках после инкубации с клетками SupT1 в популяциях GFP⁺ и GFP⁻, и на графике они отложены вместе (гистограмма, серый цвет: GFP⁺, пунктир: GFP⁻).

На фиг. 5 показано, что чистая популяция NK-92 CD3, подвергнутая суперинфицированию TcR DMF-5 или Радий-1 и отсортированная, специфически активируется Т2-лимфоцитами, нагруженными соответствующим пептидом. Верхняя панель: для разделения двух линий клеток применяют сигнал CD3 и GFP. Затем популяцию CD3⁺ оценивают на экспрессию CD107a (потеря зернистости). Гистограмма: показанный NK-92-CD3-TcR инкубировали с Т2-лимфоцитами, нагруженными O/N 1 мкМ пептидов (серая штриховка: без пептида, темно-серый контур: MART-1, светло-серый контур: TGFbRII).

На фиг. 6 показан расчет значений EC₅₀ (полумаксимальной эффективной концентрации) для TcR Радия-1 и DMF-5.

На фиг. 7 показаны результаты фосфо-проточно-цитометрического анализа активации клеток NK-92(CD3/Радий-1) при контактировании с антителами α-CD3 и α-CD28. Сдвиг спектра проточной цитометрии вправо указывает на повышение уровня фосфорилирования значимого белка, что в свою очередь указывает на активацию комплекса TCR.

На фиг. 8 показана специфичность стимуляции клеток NK-92(CD3/Радий-1) и NK-92(CD3/DMF-5). NK-92 инкубировали с антиген-представляющими клетками, которые представляли либо специфичный, родственный пептид для каждого рецептора (TGFbRII для клеток, экспрессирующих Радий-1, MART-1 для клеток, экспрессирующих DMF-5), либо случайный пептид. Стимуляцию передачи сигнала через комплекс TCR измеряли в разные моменты времени в соответствии с уровнем фосфорилирования разных

TcR/CD3-родственных белков. Данные уровни фосфорилирования измеряли посредством фосфопроточной цитометрии. На каждом графике сплошной линией показана активация клеток специфичным, родственным пептидом; пунктирной линией показана активация клеток случайным пептидом.

На фиг. 9 показана кинетика стимуляции клеток NK-92(CD3), трансдуцированных либо TcR Радий-5, либо TcR Радий-6. Оба данных рецептора получены из CD4⁺ Т-лимфоцитов и специфически связываются с пептидом TGFbRII со сдвигом рамки считывания; Радий-5 специфически связывается с ним в контексте HLA-DR7, Радий-6 в контексте HLA-DR4. Значения EC₅₀ для Радия-5 и Радия-6 рассчитаны с применением ткани от пациентов-доноров (пациенты H, S и B). У пациента H был гаплотип HLA-DR7; у пациентов S и B был гаплотип HLA-DR4.

Пример 1.

Экспрессия CD3 в NK92.

Для трансфекции NK92 рецептором CD3 применяли кодон-оптимизированный вектор pMP71-CD3 ζ -CD3 ϵ -CD3 γ -CD3 δ -IRES-GFP (CD3-GFP) (Ahmadi et al. 2011. Blood 118, 3528-3573), и клетки трансфекцировали путем ретровирусной трансдукции. Ретровирус, содержащий конструкцию CD3-GFP, получали в пакующей клеточной линии ("Hek-Phoenix"), и NK-клетки центрифугировали (0,3 М клеток, инкубированных с вирусной надосадочной жидкостью и открученных при 900×g в течение 1 ч при 32°C на планшетах с нанесенным в них ретронектином ("Tanaka Biotech")). В качестве маркера успешной трансдукции применяли GFP (зеленый флуоресцентный белок).

Успешную трансдукцию NK-92 рецепторами CD3 (NK-92(CD3)) подтверждали методом проточной цитометрии с использованием проточного цитометра FACS Canto ("BD Biosciences"). Флуоресценцию отслеживали по каналам SSC и FITC и успешную трансфекцию наблюдали, отслеживая флуоресценцию по каналу GFP (см. фиг. 1).

Была достигнута эффективность трансфекции приблизительно 50%. В качестве альтернативы, чтобы получить чистую популяцию, отсортировывали клетки GFP⁺.

Пример 2.

Экспрессия TcR в NK-92(CD3).

Оценивали способность NK-92(CD3) совместно экспрессировать CD3 и TcR. И для CD3, и для TcR требуется коэкспрессия другого члена комплекса TcR, чтобы они направлялись на поверхность клетки. Таким образом, было возможно применить экспрессию CD3 на поверхности NK-клеток в качестве маркера успешной котрансфекции клетки и CD3, и TcR.

NK-92(CD3) подвергали суперинфицированию четырьмя разными TcR с использованием ретровирусной надосадочной жидкости (цистеиновый вариант Радий-1_{cys}, Радий-1-специфичный (TGFbRII сдвиг рамки считывания), DMF-5, MART-1-специфичный DMF-5 (Johnson, L. A. et al. 2006 J Immunol 177:6548-6559)) и Радий-3 (hTERT, MHC-II)), и экспрессию CD3 на поверхности клетки отслеживали для каждого TcR с использованием мультимера анти-CD3 антитела, меченного APC (аллофикоцианином). Экспрессию CD3 определяли путем отслеживания экспрессии клетками GFP. Флуоресценцию определяли по каналам FITC и APC. Клетки, экспрессирующие GFP, выводятся в правой области точечных диаграмм, а клетки, экспрессирующие на своей поверхности CD3, выводятся в верхней области точечных диаграмм. Клетки, совместно экспрессирующие CD3 и TcR (т.е. клетки с комплексом CD3-TcR, локализованным на поверхности клетки), выводятся в верхней правой области точечных диаграмм.

В клетках, модифицированных так, чтобы они экспрессировали каждый из TcR, определялась экспрессия CD3 на поверхности клетки (фиг. 2A-D) (клетки в верхнем правом квадранте на каждой точечной диаграмме). В частности, клетки, модифицированные так, чтобы они экспрессировали TcR Радий-1, демонстрировали экспрессию CD3 на поверхности клетки (фиг. 2B). Также на фиг. 2D показано небольшое увеличение флуоресценции по каналу APC для клеток GFP⁺, что указывает на низкий уровень экспрессии TcR Радий-3. Для клеток, не содержащих TcR, экспрессия CD3 на поверхности клетки не определялась (фиг. 2E).

Экспрессию TcR на поверхности клетки также определяли в NK-92(CD3), модифицированных так, чтобы они экспрессировали TcR Радий-1 и DMF-5. Присутствие TcR на поверхности клетки отслеживали с использованием либо V-бета-специфичного антитела, которое позволяет определять V-бета цепь Радия-1, либо мультимера MART-1 для определения TcR DMF-5 на поверхности клетки (нижний ряд), меченного APC. Флуоресценцию определяли по каналам FITC (GFP) и APC (анти-Vb и M1-мультимер). По каналу APC для NK-92(CD3), не модифицированных так, чтобы они экспрессировали TcR, увеличения сигнала не наблюдалось (фиг. 3A). Клетки, модифицированные так, чтобы они экспрессировали TcR Радий-1, демонстрировали увеличение сигнала по каналу APC, когда их окрашивали анти-Vp антителом, но не мультимером MART-1 (фиг. 3B). Клетки, модифицированные так, чтобы они экспрессировали TcR DMF-5, демонстрировали увеличение сигнала по каналу APC, когда их окрашивали мультимером MART-1 (фиг. 3C).

Пример 3.

NK-92(CD3), экспрессирующие TcR, функциональны.

Чтобы проверить функциональность нашего TcR, когда он экспрессируется в NK-клетке, мы оцени-

вали, способен ли TcR, экспрессируемый в NK-клетке, специфично распознавать клетки-мишени.

NK-92(CD3), экспрессирующие TcR, инкубировали с клетками-мишенями, экспрессирующими молекулу одноцепочечного тримера (SCT), содержащего корректный целевой пептид (TGFbRII) или неспецифичный пептид (irr) в течение 5 часов, или в отсутствии клеток-мишеней (без APC), и экспрессию маркера потери зернистости CD107 отслеживали в качестве маркера способности NK-клеток быть стимулированными клетками-мишенями. (SCT представляет собой белок ГКГС I класса, представляющего антиген, и состоит из антигенного пептида, β_2 -микроглобулина и h-цепи, экспрессируемых в виде единой полипептидной цепи, см. патент США 2010/015954 and Yu, Y. Y. et al. (2002) J Immunol 168: 3145-3149).

NK-92(CD3) сначала окрашивали анти- CD56 Tx Red (CD56 является маркером NK) и отслеживали флуоресценцию TxRed и GFP (фиг. 4A). На основе экспрессии CFP проявлялись отдельные популяции NK-92. Определялись как клетки GFP⁺ (верхняя область), так и клетки NK GFP⁻ (нижняя область). Экспрессию CD107a отслеживали для каждой популяции клеток, и клетки GFP⁻ применяли в качестве отрицательного контроля (т.е. клетки, не экспрессирующие TcR).

NK-92(CD3), экспрессирующие Радий-1-специфичный TcR, инкубировали с SupT1, экспрессирующими молекулу одноцепочечного тримера (SCT) с неспецифическим пептидом (фиг. 4C) или целевым пептидом для Радия-1 (фиг. 4D). Также отслеживали клетки, инкубируемые в отсутствии антиген-представляющей клетки (фиг. 4B). Экспрессию CD3 отслеживали для линии клеток NK-92, и клетки сортировали, как было описано выше. На каждой гистограмме видны популяции GFP⁺ (пунктирная линия) и GFP⁻ (сплошная линия).

При инкубации с клетками SupT1, экспрессирующими SCT Радий-1 (фиг. 4D), увеличение экспрессии CD107 демонстрировали только NK-92(CD3), экспрессирующие Радий-1-специфичный TcR, на что указывает сдвиг пунктирной линии вправо по сравнению со сплошной линией (отрицательный контроль GFP⁻). Для указанных клеток, когда их инкубировали с клетками SupT1, экспрессирующими неспецифический пептид (фиг. 4C), или для клеток, инкубируемых в отсутствии антиген-представляющих клеток, увеличения экспрессии CD107 не наблюдалось.

В совокупности эти данные показывают, что NK-92(CD3), экспрессирующие Радий-1-специфичный TcR, способны активироваться клетками-мишенями, экспрессирующими целевой пептид для Радия-1. Это демонстрирует, что TcR, экспрессируемый в NK-92(CD3), активен и функционален. Таким образом, NK-92(CD3), экспрессирующие TcR, обладают специфичной в отношении клетки-мишени цитотоксичностью.

Пример 4.

Активация NK-92(CD3), экспрессирующих TcR, T2-лимфоцитами, нагруженными значимым пептидом.

NK-92(CD3) модифицировали так, чтобы они экспрессировали TcR Радий-1 или DMF-5, и экспрессию CD3 на поверхности клетки определяли с использованием APC-меченного анти-CD3 антитела. CD3⁺ клетки отбирали для анализа потери зернистости (фиг. 5, верхняя панель) и отсортировывали.

NK-92(CD3), модифицированные так, чтобы они экспрессировали TcR Радий-1 или DMF-5, инкубировали с T2-лимфоцитами (фиг. 5, нижняя панель), нагруженными пептидами либо TGFbRII (светло-серый контур), либо MART1 (темно-серый контур), которые являются целевыми антигенами для TcR Радия-1 и DMF-5, соответственно. Измеряли экспрессию CD107a в NK-92(CD3), экспрессирующих TcR Радий-1 (фиг. 5, нижняя левая панель) и DMF-5 (фиг. 5, нижняя правая панель), инкубируемых с T2-лимфоцитами в присутствии любого из пептидов. NK-92(CD3), модифицированные так, чтобы они экспрессировали TcR Радий-1, демонстрировали активацию в присутствии пептида TGFbRII, а клетки, экспрессирующие TcR DMF-5, демонстрировали активацию в присутствии MART-1. Наблюдалась неспецифическая активация.

Аналогичный эксперимент также проводили, чтобы определить EC₅₀ для каждого TcR. NK-92(CD3), модифицированные так, чтобы они экспрессировали TcR Радий-1 (кружки) и DMF-5 (квадраты), инкубировали с T2-лимфоцитами в присутствии пептидов TGFbRII или MART-1, соответственно, в диапазоне разных концентраций пептидов. Активацию измеряли путем определения экспрессии CD107a, как было описано выше. Экспрессию CD107a измеряли при каждой концентрации, и рассчитывали относительную активацию (CD107a как процент от максимальной экспрессии CD107a). Расчеты показали значения EC₅₀ 2 нМ (Радий-1) и 7 нМ (DMF-5) (фиг. 6).

Пример 5.

TcR/CD3-опосредуемая передача сигнала в NK-92(CD3).

NK-92(CD3), трансфицированные TcR Радий-1, оценивали с использованием фосфо-проточной цитометрии для изучения их способности к передаче сигнала. Сначала общую способность к передаче сигнала комплекса TCR анализировали, стимулируя клетки анти-CD3 и анти-CD28 антителами, которые стимулируют активацию через TCR. Как показано на фиг. 7, кластеризация TcR и CD3 приводит к активации сигнального каскада, аналогично тому, как это наблюдают в Т-лимфоцитах. Это показано увеличением уровня фосфорилирования нескольких TcR/CD3-родственных белков, включая ZAP-70, SLP-76 и CD3 ζ .

Затем клетки оценивали на предмет стимуляции специфичными антигенами, с использованием антиген-представляющих клеток и отслеживания сигнальной активности комплексов TCR в разные моменты времени методом фосфо-проточной цитометрии. И NK-92(CD3)-Радий-1, и NK-92(CD3)-DMF-5 стимулировались своими родственными пептидами. Как показано на фиг. 8, только специфичная стимуляция приводит к фосфорилированию сигнальной молекулы. Можно было различить ранние и поздние сигналы, и их характер был сходен с тем, что наблюдают в Т-лимфоцитах. В совокупности эти данные показывают, что NK-92(CD3-TCR) реагируют подобно Т-лимфоцитам, когда они контактируют со своими субстратами.

Пример 6.

Стимуляция NK-92(CD3) рецепторами TcR, полученными из CD4⁺ Т-лимфоцитов TcR, полученные из CD4⁺ Т-лимфоцитов, - Радий-5 и Радий-6 трансдуцировали в NK-92(CD3). Указанные TcR были способны перенацелить клетки специфично на целевые пептиды ГКГС II класса. И Радий-5, и Радий-6 специфично нацелены на мутантный пептид со сдвигом рамки считывания

TGFβRII (KSLVRLSSCVPAALMSAMT);

Радий-5 нацелен на данный пептид специфично в контексте HLA-DR7, а Радий-6 в контексте HLA-DR4. Кинетика стимуляции клеток NK-92(CD3)-Радий-5/6 показана на фиг. 9. Стимуляцию NK-92(CD3) измеряют, как описано в примере 4, выше. Были рассчитаны значения EC₅₀, которые представлены на фиг. 9. EC₅₀ для Радия-5 в пробе от пациента с гаплотипом HLA-DR7, по расчетам составила 19 мкМ; EC₅₀ для Радия-6 по расчетам составила 4 мкМ в пробе одного пациента и 0,4 мкМ в пробе второго. Пробы обоих пациентов были с гаплотипом HLA-DR4.

Пример 7.

Анализ экспрессии белка в NK-92 с экспрессией CD3/CD3-TcR и без его экспрессии. Профили экспрессии белков в NK-92 сравнивали с таким профилем для NK-92(CD3/CD3-TcR). Между двумя группами клеток никаких различий не было (разумеется, за исключением наличия CD3 в NK-92(CD3/CD3-TcR)). Сравнение приведено в таблице ниже (МКПК=моноклеарные клетки периферической крови).

Поверхностные маркеры	NK-92	NK-92 652 (CD3- трансдуцированные)	МКПК
CD3	-	(+)	+
CD4	-	-	+
CD8	-	-	+
CD16	-	-	+
CD25	+	+	+
CD28	+	+	+
CD45RA	+	+	+
CD45RO	+	+	+
CD56	+	+	+
CD57	+	+	+
CD62L	-	-	-
CD134 (OX40)	+	+	+
CD152 (CTLA-4)	+	+	(+)
CD336 (NKp44)	-	-	-
CD337 (NKp30)	+	+	+
PD1	+	+	+
HLA cl I	+	+	+
HLA-DR	-	-	-
CXCR3	+	+	+
CXCR4	+	+	+
NKG2D	+	+	+

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированная NK-клетка для уничтожения клетки-мишени, при этом указанная NK-клетка экспрессирует цепи CD3 CD3γ, CD3δ, CD3ε и CD3ζ и TCR, при этом указанные цепи CD3 и указанный TCR формируют функциональный комплекс CD3-TcR, который локализован на поверхности указанной NK-клетки.

2. NK-клетка по п.1, отличающаяся тем, что указанная клетка-мишень представляет собой раковую клетку и указанная модифицированная NK-клетка предназначена для терапии рака.

3. NK-клетка по п.1 или 2, отличающаяся тем, что указанная NK клетка представляет собой модифицированную клетку NK-92.

4. NK-клетка по п.1 или 2, отличающаяся тем, что указанная NK-клетка представляет собой модифицированную первичную NK-клетку.

5. NK-клетка по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что указанный TCR не зависит от корецепторов.

6. NK-клетка по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что указанная NK-клетка модифицирована для нарушения или предотвращения экспрессии β_2 микроглобулина.

7. NK-клетка по любому из пп.1-6, отличающаяся тем, что указанная NK-клетка представляет собой клетку человека и является негативной по HLA.

8. NK-клетка по любому из пп.1-7, отличающаяся тем, что пролиферативная способность указанной NK-клетки снижена облучением.

9. Терапевтическая композиция для лечения рака, содержащая модифицированную NK-клетку согласно любому из пп.1-8 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

10. Способ лечения рака путем терапии на основе адоптивного переноса клеток, при этом указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества модифицированной NK-клетки согласно любому из пп.1-8.

11. Набор для получения NK-клетки, которая определена в п.1, причем указанный набор включает:

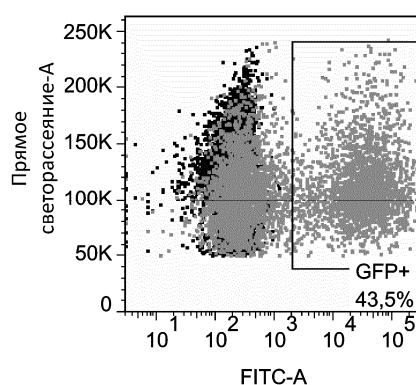
(a) NK-клетку, которая экспрессирует цепи CD3 CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ и CD3 ζ , и

(b) панель молекул нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует TcR, причем указанные TcR обладают специфичностью к разным антигенам и/или разной специфичностью в отношении главного комплекса гистосовместимости.

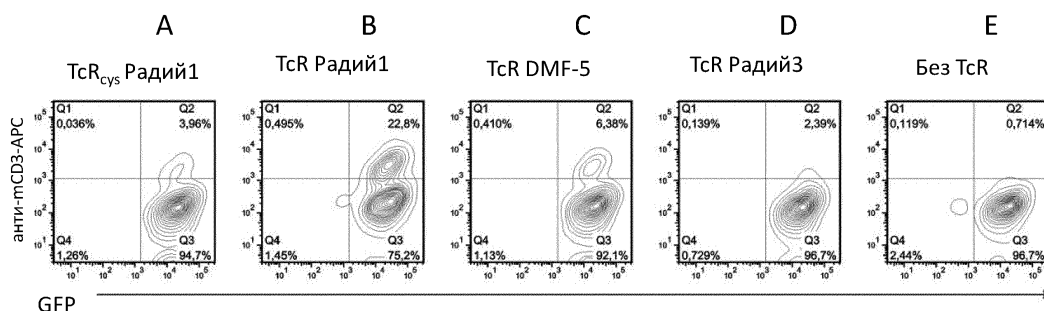
12. Набор по п.11, отличающийся тем, что указанные молекулы нуклеиновых кислот содержатся в векторах.

13. Набор по п.12, отличающийся тем, что указанные векторы представляют собой вирусные векторы.

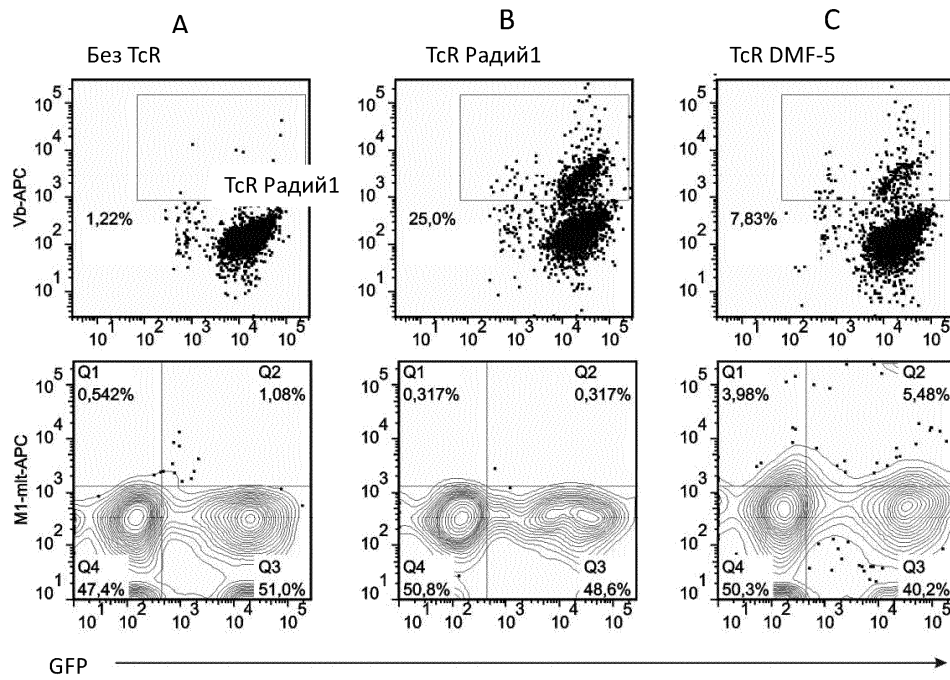
14. Набор по любому из пп.11-13, отличающийся тем, что указанная NK-клетка представляет собой модифицированную первичную NK-клетку.



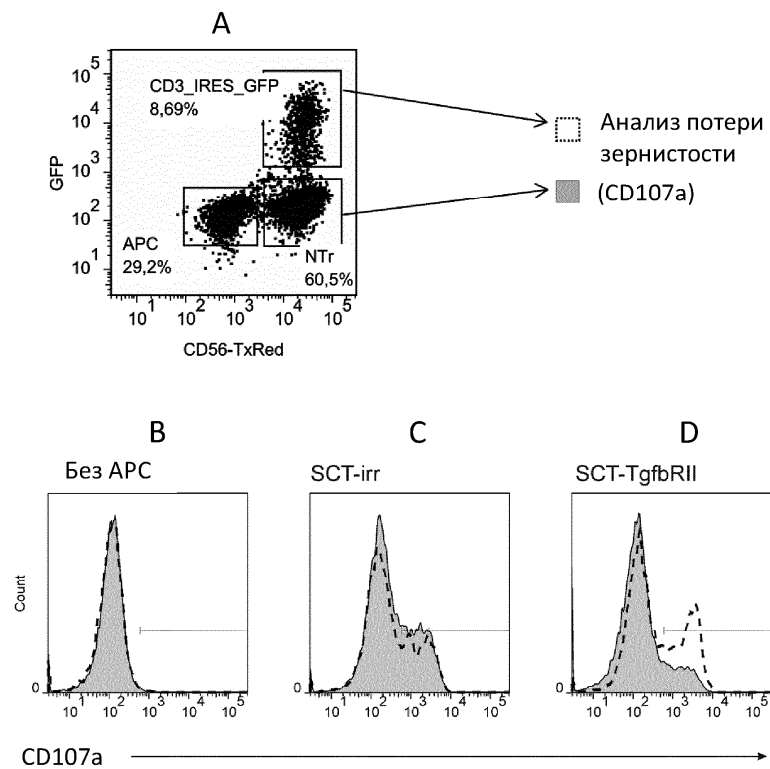
Фиг. 1



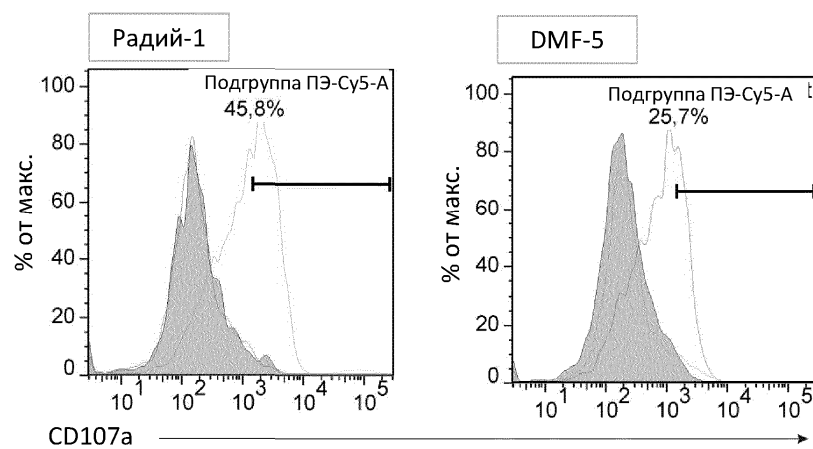
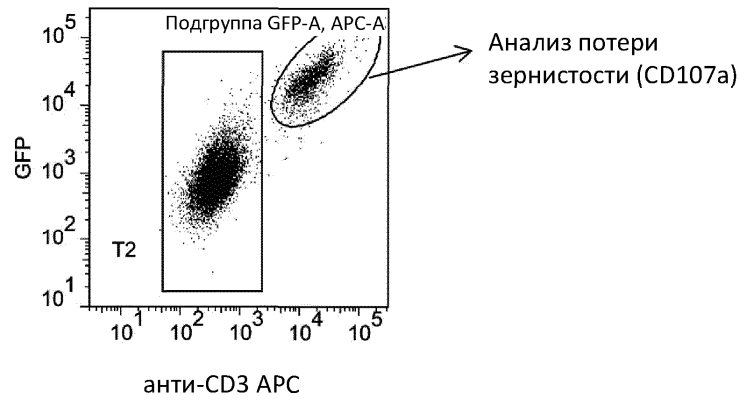
Фиг. 2



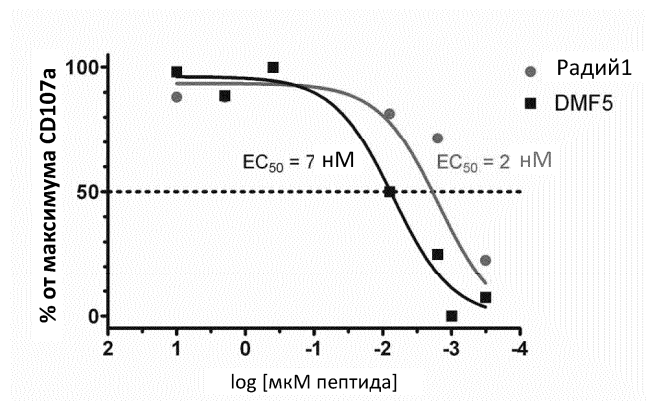
Фиг. 3



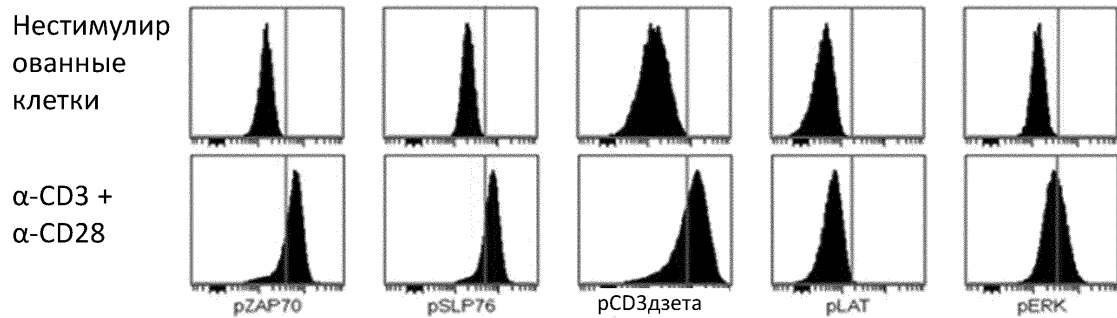
Фиг. 4



Фиг. 5

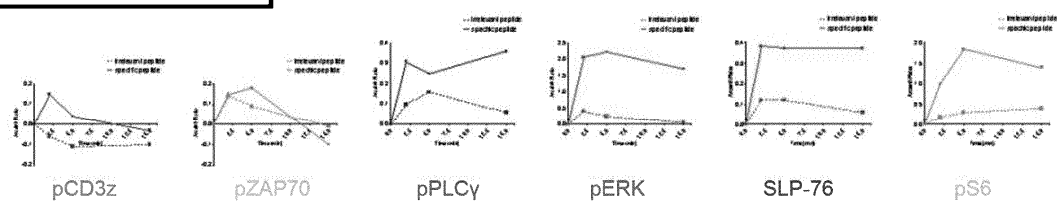


Фиг. 6

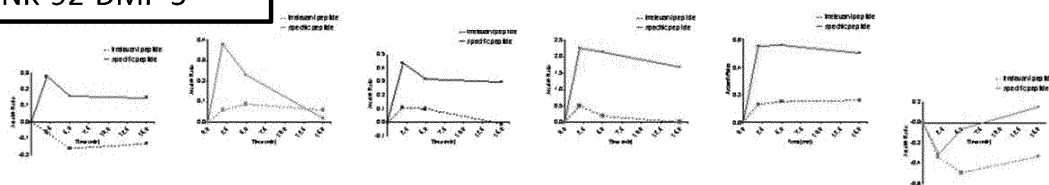


Фиг. 7

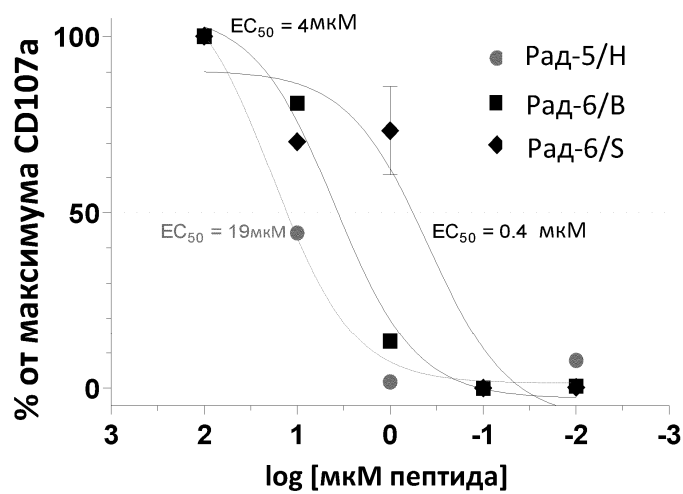
NK-92-Радий-1



NK-92-DMF-5



Фиг. 8



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2