

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291663 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.11

(22) Дата подачи заявки
2020.12.04

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C12N 5/073 (2010.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 15/867 (2006.01)

(54) АЛЛОГЕННЫЕ CAR-T-КЛЕТКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ПЛАЦЕНТЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/943,760; 62/944,349; 63/035,432

(32) 2019.12.04; 2019.12.05; 2020.06.05

(33) US

(86) PCT/US2020/063473

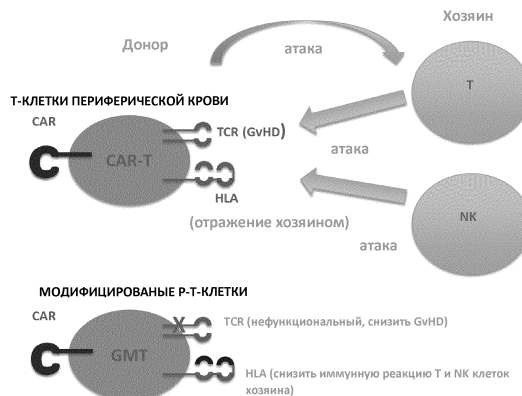
(87) WO 2021/113759 2021.06.10

(71) Заявитель:
СЕЛУЛЭРИТИ ИНК.; СОРРЕНТО
ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Карасьевич-Мендес Кэти, Хэ
Шуян, Тэсс Кристина, Лин Вэйфан,
Джхан Кевин, Зелдис Джером Б.,
Хэрири Роберт Дж., Чжан Сяокуй,
Ма Цянчжун, Го Вэньчжун, Чжан
Яньлян, Цзи Генри Хунцзюнь (US)

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

(57) Изобретение раскрывает популяции Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (chimeric antigen receptor, CAR), при этом указанные Т-клетки представляют собой плацентарные Т-клетки, полученные из пуповинной крови, плацентарного перфузата или их смеси. Показано, что такие популяции клеток являются улучшенными по ряду аспектов по сравнению с альтернативными популяциями клеток, такими как полученные из Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. В нем также описаны способы лечения рака, такого как гемобластоз, например злокачественные В-клеточные новообразования, или его симптома у пациента, нуждающегося в этом. Эти способы включают введение пациенту количества популяции Т-клеток согласно любому аспекту настоящего изобретения, эффективной для облегчения рака или его симптома у пациента.



A1

202291663

202291663

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574185EA/042

АЛЛОГЕННЫЕ CAR-T-КЛЕТКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ПЛАЦЕНТЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/943,760, поданной 4 декабря 2019 г., 62/944,349, поданной 5 декабря 2019 г., и 63/035,432, поданной 5 июня 2020 г., раскрытия которых полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится, в частности, к клеткам с химерным антигенным рецептором (chimeric antigen receptor, CAR) и лекарственным средствам, содержащим CAR.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

CAR содержащие лекарственные средства становятся чрезвычайно важным средством против рака. Однако эти виды терапии обычно основаны на применении собственных клеток пациента, например, T-клеток, полученных из мононуклеарных клеток периферической крови, МКПК (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), в качестве популяции эффекторных клеток. Поскольку клетки каждого пациента должны быть собраны, протестированы и превращены в CAR-терапевтическое средство, CAR терапия является: 1) весьма дорогостоящей; и 2) доступной только в определенных центрах, готовых и/или способных проводить терапию. Эти недостатки приводят к тому, что CAR терапия в значительной степени является недоступной для многих групп населения, нуждающихся в ней. Заявленное изобретение направлено, в частности, на создание готовой к использованию аллогенной CAR терапии, направленной на смягчение этих и других проблем.

Аутологичная CAR-T терапия стала частью стандарта лечения онкогематологических пациентов. Источником клеток для CAR-T терапии является МКМП (PBMC) пациента. Разработка терапии аллогенными CAR-T-клетками вступила в клинические испытания, в которых также используют МКМП (PBMC) в качестве исходного материала. T-клетки пуповинной крови (umbilical cord blood, UCB-T) обладают различными биологическими свойствами, что делает их более подходящими для применения в качестве исходного материала для аллогенной клеточной терапии. У них преобладают фенотипы T_{cm} и T_{naive}, они проявляют повышенную пролиферативную активность и сохраняют более длинные теломеры/более высокую активность теломеразы по сравнению с T-клетками, размноженными из МКМП (PBMC) (Okas, et. al. Journal of Immunotherapy, 2010; Frumento, et. al. Journal of Transplantation, 2013). Они обладают более высокой иммунной толерантностью к HLA несовместимости и нарушенной аллогенной активацией (Barker, et al. Blood, 2001; Chen, et al. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2006). Они могут быть размножены до масштаба клинических исследований для терапевтических целей.

Т-клетка и NK-клетки являются ключевыми клеточными медиаторами аллореактивности. Т-клеточный рецептор является ключевым рецептором, участвующим в аллореактивности. Инактивация гена Т-клеточного рецептора приводила к пониженной аллореактивности. NK-клетки-хозяева убивают донорские клетки с HLA несовместимостью или не экспрессируют молекулы HLA. Одним из механизмов предотвращения уничтожения NK-клеткой является экспрессия молекулы HLA-E, которая ингибирует функцию NK-клеток.

Авторами изобретения разработана уникальная платформа для применения Т-клеток, полученных из послеродовой плаценты человека, для применения в аллогенной платформе для лечения гемобластоза и солидного рака. В настоящих исследованиях авторы изобретения продемонстрировали подтверждение концепции о плацентарных Т-клетках CD19 CAR-T и CD20 CAR-T для лечения злокачественных В-клеточных новообразований. Несмотря на то, что Т-клетки, полученные из плаценты, (P-T-клетки) демонстрируют более высокую иммунную толерантность и нарушенные аллореактивные ответы, авторы изобретения предполагают и продемонстрировали нокаут (knockout, KO) альфа константы Т-клеточного рецептора (T cell receptor alpha constant, TRAC), например, CRISPR-опосредованный нокаут (knockout, KO) альфа Т-клеточного рецептора (TRAC) в качестве дополнительной стратегии снижения риска, чтобы обойти любую потенциальную реакцию «трансплантат против хозяина» РТПХ (Graft-versus-host disease, GvHD), связанную с экспрессией эндогенного Т-клеточного рецептора на P-T-клетках. При необходимости эти клетки можно дополнительно генетически модифицировать, чтобы НЕ экспрессировать бета-2 микроглобулин (beta-2 microglobulin, B2M) и экспрессировать химерную молекулу HLA-E для снижения их аллореактивности/клиренса Т/NK-клетками.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к применению клеток, полученных из плаценты, в качестве источника клеток для CAR терапии. Эти клетки включают клетки, выделенные из плаценты, из плацентарного перфузата и из пуповинной крови, а также их комбинации. В примерах настоящего изобретения использовали клетки из пуповинной крови и/или из плацентарного перфузата, и было показано, что эти клетки, полученные из плаценты, имеют преимущества перед Т-клетками из других источников клеток, такими как клетки из МКПК (PBMC).

В настоящей заявке заявители обнаружили, что клетки, полученные из плаценты, имеют больше фенотипа naïve с меньшим количеством эффекторных клеток/клеток памяти, чем у МКПК (PBMC), представляя собой одно преимущество этой популяции. Кроме того, заявители продемонстрировали 3600-кратную экспансию Т-клеток, полученных из плаценты. Основываясь на этих открытиях, одним из аспектов настоящего изобретения является применение Т-клеток, полученных из плаценты, например, Т-клетки, полученные из пуповинной крови, или размноженные ex vivo Т-клетки, полученные из пуповинной крови, в качестве типа клеток для CAR терапии.

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

Заявители также продемонстрировали, что Т-клетки, полученные из плаценты, значительно менее аллореактивные, чем МКПК (PBMCs). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления заявленное изобретение содержит информацию, которая указывает на применение клеток, полученных из плаценты, например, клетки, полученные из пуповинной крови, или размноженные клетки, полученные из пуповинной крови, для применения в CAR терапии.

Дополнительное преимущество, обнаруженное заявителями, заключается в том, что фенотип naïve Т-клеток, полученных из плаценты, обеспечивает истощение регуляторных Т-клеток (regulatory T cells, Treg), что в противном случае могло бы снизить эффективность CAR терапии. Такое истощение является невозможным/нецелесообразным для МКПК (PBMCs) из-за экспрессии CD25 на активированных Т-клетках.

В дальнейших применяемых мерах по созданию аллогенной CAR терапии заявители нокаутировали часть Т-клеточного рецептора ТКР (T-cell receptor, TCR), в данном случае, TRAC. Заявители разработали способы для проведения генетической модификации Т-клеток, полученных из плаценты, с высокой эффективностью с использованием CRISPR. Ожидается, что использование такой генетической модификации еще больше усилит преимущества по аллогенности Т-клеток, полученных из плаценты. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления заявленное изобретение содержит информацию, которая указывает на генетическую модификацию Т-клеток для снижения аллореактивности, такую как нокаут гена ТКР (TCR), например, TRAC.

Хотя в заявленной заявке использовали специфичные CAR, преимуществами являются: 1) применение Т-клеток, полученных из плаценты; 2) нокаут генов Т-клетки, например, генов ТКР (TCR), таких как TRAC; и 3) ожидается, что их комбинация будет применимой к любому CAR, значительно улучшит CAR терапию и обеспечит аллогенное лечение с пониженной РТПХ (GVHD).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На ФИГ. 1 показаны стратегии обхода аллореактивности, вызванной Т/НК.

На ФИГ. 2 показана схема процесса получения аллогенных CAR-Т-клеток, полученных из плаценты.

На ФИГ. 3А-3С показан фенотип выделенных Т-клеток, полученных из плаценты.

На ФИГ. 4 показана экспансия *in vitro* Т-клеток, полученных из плаценты, через 20 дней.

На ФИГ. 5А-5В показан фенотип размноженных *in vitro* Т-клеток, полученных из плаценты, через 20 дней после повторной стимуляции через 13 дней.

На ФИГ. 6 показана экспансия *in vitro* Т-клеток, полученных из плаценты, модифицированных CD19 CAR, через 15 дней.

На ФИГ. 7А-7В показан статус дифференцировки Р-Т-клеток, модифицированных CD19 CAR, на 15 день.

На ФИГ. 8 показана экспрессия CD57 на эффекторных Т-клетках памяти (T_{em}) и эффекторных Т-клетках (T_{eff}).

На ФИГ. 9А-9Е показан анализ фенотипа Р-Т-клеток, модифицированных CD19 CAR, на 15 день.

На ФИГ. 10А-10В показана экспрессия CD19 CAR титрованных вирусных векторов CD19 CAR в Р-Т-клетках на 15 день.

На ФИГ. 11 показана кратная экспансия Р-Т на 15 день, воспроизведенная в нескольких препаратах Р-Т от разных доноров плаценты.

На ФИГ. 12А-12В показана экспрессия CD19 CAR на 15 день, воспроизведенная в нескольких препаратах Р-Т от разных доноров плаценты.

На ФИГ. 13А-13В показана экспрессия CD19 CAR на 15 день, воспроизведенная в нескольких препаратах Р-Т от разных доноров плаценты.

На ФИГ. 14 показан статус дифференцировки CD19 CAR+ Т-клеток на 15 день и расширенный анализ фенотипа экспрессии маркера.

На ФИГ. 15А-15В показаны результаты кинетического анализа цитотоксичности АСЕА для определения активности Р-CD19 CAR-Т-клеток на 15 день по отношению к мишеням CD19+ и CD19-.

На ФИГ. 16А-16С показаны результаты анализа высвобождения цитокинов в течение 24 часов для определения активности Р-CD19 CAR-Т-клеток на 15 день по отношению к клетками-мишеням CD19+ Daudi и Nalm6.

На ФИГ. 17А-17В показана активность Р-CD19 CAR-Т-клеток в модели мыши Daudi-Luc с диссеминированным CD19+.

На ФИГ. 18 показана активность Р-CD19 CAR-Т-клеток в отношении повторного заражения опухолевых клеток в диссеминированной модели Daudi-luc.

На ФИГ. 19А-19Е показаны результаты повторного заражения опухолевых клеток Р-CD19 CAR-RV Т-клетками в анализе проточной цитометрии в конце исследования.

На ФИГ. 20А-20В показана эффективность нокаута (КО) TRAC в UCB-Т-клетках.

На ФИГ. 21 показана эффективность КО TRAC Р-Т-клеток на 15 день с использованием CRISPR.

На ФИГ. 22А-22В показаны эффекты КО TRAC на экспрессию CD19 CAR Р-Т-клеток.

На ФИГ. 23А-23В показаны эффекты КО TRAC на активность Р-CD19 CAR.

На ФИГ. 24 показана кратная экспансия CD19 CAR Р-Т-клеток после повторной стимуляции анти-CD3/CD28.

На ФИГ. 25 показана аллореактивность Р-Т-клеток, измеренная с помощью анализа цитотоксичности.

На ФИГ. 26А-26В показана аллореактивность Р-Т-клеток, измеренная с помощью анализа пролиферации.

На ФИГ. 27 показана остаточная экспрессия ТКР $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$) на TCR КО Р-Т-клетках.

На ФИГ. 28А-28В показана кратная экспансия Р-Т-клеток в ответ на совместное культивирование в течение 4 дней с HLA-несовместимыми МКПК (PBMC).

На ФИГ. 29А-29В показана экспрессия маркера активации CD25 на Р-Т-клетках в ответ на совместное культивирование в течение 4 дней с HLA-несовместимыми МКПК (PBMC).

На ФИГ. 230А-30F показана секреция провоспалительных и эффекторных белков Р-Т-клетками в ответ на совместное культивирование в течение 4 дней с HLA-несовместимыми МКПК (PBMC).

На ФИГ. 31А-31В показана кратная экспансия МКПК (PBMC) в ответ на совместное культивирование в течение 4 дней с HLA-несовместимыми Р-CD19 CAR-NT клетками.

На ФИГ. 32А-32В показана экспрессия маркера активации CD25 на МКПК (PBMC) в ответ на совместное культивирование в течение 4 дней с HLA-несовместимыми Р-CD19 CAR-NT клетками.

На ФИГ. 33А-33F показана секреция провоспалительных и эффекторных белков МКПК (PBMC) в ответ на совместное культивирование в течение 4 дней с HLA-несовместимыми Р-CD19 CAR-NT клетками.

На ФИГ. 34А-34С показаны частота Treg Р-Т клеток и отсутствие аллореактивности в модели мыши NCG.

На ФИГ. 35 показана схема исследования для оценки безопасности нокаута (КО) TRAC СуCART-19 и СуCART-19 в гуманизированной мыши CD34⁺ (Hu-CD34) NSG.

На ФИГ. 36 показано приживание иммунных клеток человека мышам Hu-CD34 NSG на 3 день.

На ФИГ. 37 показано изменение массы тела животных в исследовании по оценке безопасности.

На ФИГ. 38 показаны результаты гистопатологии, демонстрирующие, что никаких гистопатологических изменений, связанных с РТПХ (GvHD), не наблюдалось в печени, тонком кишечнике, толстом кишечнике, коже и легких животных, получавших СуCART-19 (с КО TRAC или без него).

На ФИГ. 39А-39В показаны уровни цитокинов в плазме на 7 день исследования по оценке безопасности.

На ФИГ. 40 показана продолжительная персистенция клеток СуCART-19 в периферической крови мышей в исследовании по оценке безопасности.

На ФИГ. 41 показаны нормализованные клетки человека CD19⁺ (%) в периферической крови по сравнению с общим количеством донорских клеток или исходным уровнем на 3 день.

На ФИГ. 42 показано, что количество CD3+ Т-клеток и CD56+/CD3-NK клеток увеличилось во всех группах CART-19 на 7 день по сравнению с 3 днем.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему изобретению предложена популяция Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (chimeric antigen receptor, CAR), при этом указанные Т-клетки представляют собой плацентарные Т-клетки, при этом указанный CAR ввели в клетку путем вирусной трансдукции ретровирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные плацентарные Т-клетки представляют собой Т-клетки пуповинной крови, Т-клетки плацентарного перфузата или их смесь. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения при этом указанные плацентарные Т-клетки представляют собой Т-клетки пуповинной крови. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные плацентарные Т-клетки представляют собой смесь Т-клеток пуповинной крови и Т-клеток плацентарного перфузата.

Было показано, что эти клетки отличаются, например, от клеток, полученных из мононуклеарных клеток периферической крови, и, действительно, превосходят указанные клетки по нескольким аспектам.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в указанной популяции Т-клеток преобладающая субпопуляция CAR+Т-клеток имеет фенотип T scm/naïve. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная субпопуляция CAR+ T scm/наивных клеток включает в себя более примерно 30% популяции CAR+ Т-клеток, более примерно 40% популяции CAR+ Т-клеток, более примерно 45% популяции CAR+ Т-клеток, или более примерно 50% популяции CAR+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субпопуляция CAR+ Т-клеток с фенотипом эффекторной памяти (Teff) включает в себя менее примерно 75% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 70% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 60% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 50% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 40% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 35% популяции CAR+ Т-клеток или менее примерно 30% популяции CAR+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субпопуляция CAR+ Т-клеток с фенотипом центральной памяти (Tcm) включает в себя менее примерно 10% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 8% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 6% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 5% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 4% популяции CAR+ Т-клеток или менее примерно 3% популяции CAR+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения относительная численность субпопуляции CAR+ Т-клеток, которые являются CD8+, выше чем 50% относительной численности субпопуляции CAR+ Т-клеток, которые являются CD4+, выше чем 60% относительной численности субпопуляции CAR+ Т-клетки, которые являются CD4+, выше чем 70% относительной численности субпопуляции CAR+ Т-

клеток, которые являются CD4+, выше чем 80% относительной численности субпопуляции CAR+ Т-клеток, которые являются CD4+, выше чем 90% относительной численности субпопуляции CAR+ Т-клеток, которые являются CD4+, выше чем 100% относительной численности субпопуляции CAR+ Т-клеток, которые являются CD4+.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток обладает более высокой противоопухолевой активностью, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CD45RA, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CD27, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CCR7, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CD127, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток имеет более низкий процент клеток, экспрессирующих CD57, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CD62L, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток имеет более низкий процент клеток, экспрессирующих CD25, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих Lag-3+, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток имеет более низкий процент клеток, экспрессирующих Tim-3, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток демонстрирует более эффективное уничтожение *in vitro* линии раковых клеток, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество перфорины при заражении *in vitro* против линии раковых клеток, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество GM-CSF при заражении *in vitro* против линии раковых клеток, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество TNF- α при заражении *in vitro* против линии раковых клеток, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество IL-2 при заражении *in vitro* против линии раковых клеток, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество гранзима В при заражении *in vitro* против линии раковых клеток, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток вызывает повышенную выживаемость *in vivo* в модели рака, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток вызывает пониженную потерю массы тела *in vivo* в модели рака, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток вызывает пониженную реакцию «трансплантат против хозяина» РТПХ (GvHD) *in vivo* в модели рака, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови также экспрессирует указанный CAR. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанный CAR ввели в указанную популяцию Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови путем трансфекции. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанный CAR ввели в указанную популяцию Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови путем вирусной трансдукции. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанный CAR ввели в указанную популяцию Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови путем вирусной трансдукции ретровирусным вектором. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанный CAR ввели в указанную популяцию Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови путем вирусной трансдукции лентивирусным вектором. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанный CAR, который ввели в указанную популяцию Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови, представляет собой тот же самый CAR, который экспрессируется указанной популяцией Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная популяция Т-клеток содержит дополнительное генетическое изменение для снижения иммуногенности против хозяина. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанное генетическое изменение представляет собой нокаут гена. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанный нокаут гена представляет собой нокаут Т-клеточного рецептора ТКР (TCR). В других вариантах осуществления

настоящего изобретения указанный нокаут гена представляет собой нокаут альфа-константы Т-клеточного рецептора (TRAC). В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанное дополнительное генетическое изменение осуществляют путем трансфекции, ретровирусной трансдукции или лентивирусной трансдукции. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанное дополнительное генетическое изменение осуществляют с использованием технологий кластерных коротких палиндромных повторов, разделенных регулярными промежутками (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR), эффекторных нуклеаз, подобных активатору транскрипции (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) или нуклеаз цинкового пальца (zinc finger).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный нокаут TRAC снизил аллореактивность по отношению к мононуклеарным клеткам периферической крови в анализе реакции смешанных лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR) по сравнению с популяцией Т-клеток без указанного нокаута TRAC. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная сниженная аллореактивность включает в себя сниженную экспрессию или сниженную апрегуляцию CD25 в указанной популяции Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная сниженная аллореактивность включает в себя сниженную экспрессию или сниженную апрегуляцию провоспалительного или эффекторного белка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный провоспалительный или эффекторный белок выбирают из группы, состоящей из IFN- γ , TNF- α , перфорина, гранзима В и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная сниженная аллореактивность включает в себя сниженную пролиферацию/экспансию указанных мононуклеарных клеток периферической крови. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный нокаут TRAC не имеет аллореактивности или имеет сниженную аллореактивность *in vivo* в модели РТПХ (GVHD).

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака или его симптома у пациента, нуждающегося в этом, способ, включающий стадию введения пациенту количества любой из популяций Т-клеток согласно настоящему изобретению, эффективной для облегчения рака или его симптома у пациента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный рак представляет собой рак крови. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанный гемобластоз представляет собой злокачественные В-клеточные новообразования. В других вариантах осуществления настоящего изобретения популяция Т-клеток является аллогенной для указанного пациента.

Используемый в настоящем изобретении термин «плацентарный перфузат» означает перфузионный раствор, который пропустили по меньшей мере через часть плаценты, например, плаценту человека, например, через плацентарную сосудистую сеть,

и включает в себя множество клеток, собранных перфузионным раствором во время прохождения через плаценту.

Используемый в настоящем изобретении термин «клетки плацентарного перфузата» означает ядродержащие клетки, например, все ядродержащие клетки, выделенные из плацентарного перфузата или выделяемые из него.

Используемый в настоящем изобретении термин «подавление опухолевых клеток», «подавление пролиферации опухолевых клеток» и т.п. включает в себя замедление роста популяции опухолевых клеток, например, путем уничтожения одной или нескольких опухолевых клеток в указанной популяции опухолевых клеток, например, путем контактирования или приближения, например, Т-клеток или популяции Т-клеток, полученной с использованием трехстадийного способа, описанного в настоящем документе, к популяции опухолевых клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанное контактирование происходит *in vitro* или *ex vivo*. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанное контактирование происходит *in vivo*.

Используемый в настоящем изобретении термин «гемопозитические клетки» включает в себя гемопозитические стволовые клетки и гемопозитические клетки-предшественники.

Используемый в настоящем изобретении термин «+», когда он используется для обозначения присутствия конкретного клеточного маркера, означает, что клеточный маркер обнаруживается при сортировке клеток с активированной флуоресценцией по сравнению с изотипическим контролем; или обнаруживается выше фона в количественной или полуколичественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией ОТ-ПЦР (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR). Используемый в настоящем изобретении термин «CAR+» используется для обозначения присутствия химерного антигенного рецептора, обнаруживаемого при сортировке клеток с активированной флуоресценцией по сравнению с изотипическим контролем; или обнаруживается выше фона в количественной или полуколичественной ОТ-ПЦР (RT-PCR).

Используемый в настоящем изобретении термин «-», когда он используется для обозначения отсутствия конкретного клеточного маркера, означает, что клеточный маркер не обнаруживается при сортировке клеток с активированной флуоресценцией по сравнению с изотипическим контролем; или не обнаруживается выше фона в количественной или полуколичественной ОТ-ПЦР (RT-PCR).

Используемый в настоящем изобретении термин «химерный антигенный рецептор» или, в качестве альтернативы, «CAR» относится к набору полипептидов, обычно два в самых простых вариантах осуществления настоящего изобретения, которые, находясь иммунной эффекторной клетке, придают клетке специфичность в отношении клетки-мишени, обычно раковой клетке с генерацией внутриклеточного сигнала. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения CAR включает в себя по

меньшей мере один внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен (также называемый в настоящем изобретении «внутриклеточный сигнальный домен»), включающий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы и/или костимулирующей молекулы, как определено ниже. В некоторых аспектах настоящего изобретения полипептиды являются смежными друг с другом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения набор полипептидов включает в себя переключатель димеризации, который в присутствии молекулы димеризации может связывать полипептиды друг с другом, например, может связывать антигенсвязывающий домен с внутриклеточным сигнальным доменом. В одном аспекте настоящего изобретения стимулирующей молекулой является дзета-цепь, связанная с комплексом Т-клеточного рецептора. В одном аспекте настоящего изобретения цитоплазматический сигнальный домен дополнительно содержит один или несколько функциональных сигнальных доменов, полученных из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы. В одном аспекте настоящего изобретения CAR включает в себя химерный гибридный белок, включающий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, включающий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном аспекте настоящего изобретения CAR включает в себя химерный гибридный белок, включающий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, включающий функциональный сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном аспекте настоящего изобретения CAR включает в себя химерный гибридный белок, включающий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, включающий два функциональных сигнальных домена, полученных из одной или нескольких костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном аспекте настоящего изобретения CAR включает в себя химерный гибридный белок, включающий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, включающий по меньшей мере два функциональных сигнальных домена, полученных из одной или нескольких костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном аспекте настоящего изобретения CAR содержит опциональную лидерную последовательность на амино-конце (N-ter) гибридного белка CAR. В одном аспекте настоящего изобретения CAR дополнительно содержит лидерную последовательность на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена, при этом лидерную последовательность опционально отщепляется от антигенсвязывающего домена (например, scFv) во время клеточного процессинга и локализации CAR к клеточной мембране.

CAR, который включает в себя антигенсвязывающий домен (например, scFv или ТКР (TCR)), нацеленный на специфический опухолевый маркер X, такой как описан в

настоящем изобретении, также называется XCAR. Например, CAR, который включает в себя антигенсвязывающий домен, нацеленный на CD 19, называется CD19CAR.

Используемый в настоящем изобретении термин «сигнальный домен» относится к функциональной части белка, который действует путем передачи информации внутри клетки для регуляции клеточной активности через определенные сигнальные пути путем генерирования вторичных мессенджеров или путем функционирования в качестве эффекторов, реагируя на такие мессенджеры.

Используемый в настоящем изобретении термин «антитело» относится к последовательности белка или полипептида, полученной из молекулы иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут быть поликлональными или моноклональными, многоцепочечными или одноцепочечными, или интактными иммуноглобулинами и могут быть получены из природных источников или из рекомбинантных источников. Антитела могут быть тетрамерами молекул иммуноглобулинов.

Используемый в настоящем изобретении термин «фрагмент антитела» относится по меньшей мере к одной части антитела, которая сохраняет способность специфически взаимодействовать (например, путем связывания, пространственного затруднения, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) с эпитопом антигена. Примеры фрагментов антител включают в себя, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, фрагменты антител scF_v, связанные дисульфидной связью F_v (sdF_v), фрагмент F_d, состоящий из доменов VH и CH1, линейные антитела, однодоменные антитела, такие как sdAb (или VL, или VH), домены верблюдовых VHH, мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител, такие как двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области, и изолированная область, определяющая комплементарность (complementarity determining region, CDR) или другие эпитопсвязывающие фрагменты антитела. Антигенсвязывающий фрагмент также может быть включен в однодоменные антитела, макситела, минитела, нанотела, интратела, диатела, триатела, тетратела, v-NAR и bis-scF_v (см., например, Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23: 1126-1136, 2005). Антигенсвязывающие фрагменты также могут быть привиты к каркасам на основе полипептидов, таких как фибронектин типа III (Fn3) (см. патент США №: 6703199, в котором описаны минитела полипептида фибронектина).

Используемый в настоящем изобретении термин «scF_v» относится к гибриднему белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, при этом переменные области легкой и тяжелой цепей связаны смежно, например, с помощью синтетического линкера, например, короткого гибкого полипептидного линкера, и способны экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида, и при этом scF_v сохраняет специфичность интактного антитела, из которого его получили. Если не указано иное, используемый в

настоящем изобретении scFv может иметь переменные области VL и VH в любом порядке, например, относительно N-терминального и C- терминального концов полипептида, scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL.

Часть CAR, согласно настоящему изобретению, включающая антитело или его фрагмент антитела, может существовать в различных формах, где антигенсвязывающий домен экспрессируется как часть непрерывной полипептидной цепи, включая, например, однодоменный фрагмент антитела (sdAb), одноцепочечное антитело (scFv), гуманизированное антитело или биспецифическое антитело (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). В одном аспекте настоящего изобретения антигенсвязывающий домен композиции CAR, согласно настоящему изобретению, включает в себя фрагмент антитела. Согласно другому аспекту настоящего изобретения CAR включает в себя фрагмент антитела, содержащий scFv. Точные границы аминокислотной последовательности приведенной CDR можно определить с использованием любой из ряда общеизвестных схем, включая схемы, описанные Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации «Kabat»), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (схема нумерации «Chothia»), или их комбинация.

Используемый в настоящем изобретении термин «связывающий домен» или «молекула антитела» относится к белку, например, цепи иммуноглобулина или ее фрагменту, содержащему по меньшей мере одну последовательность переменного домена иммуноглобулина. Термин «связывающий домен» или «молекула антитела» включает в себя антитело и фрагменты антител. В одном варианте осуществления настоящего изобретения молекула антитела представляет собой молекулу мультиспецифического антитела, например, она содержит множество последовательностей переменного домена иммуноглобулина, при этом первая последовательность переменного домена иммуноглобулина множества обладает специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, а вторая последовательность переменного домена иммуноглобулина множества обладает специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления настоящего изобретения молекула мультиспецифического антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела. Биспецифическое антитело обладает специфичностью не более чем к двум антигенам. Молекула биспецифического антитела характеризуется последовательностью первого переменного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и последовательностью второго переменного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания в отношении второго эпитопа.

Используемый в настоящем изобретении термин «тяжелая цепь антитела» относится к большей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях, и которые обычно определяют класс, к которому принадлежит антитело.

Используемый в настоящем изобретении термин «легкая цепь антитела» относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях. Легкие цепи каппа (κ) и лямбда (λ) относятся к двум основным изотипам легких цепей антитела.

Используемый в настоящем изобретении термин «рекомбинантное антитело» относится к антителу, которое получают с использованием технологии рекомбинантной ДНК, такое как, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом или системой экспрессии дрожжей. Термин также следует толковать как обозначающий антитело, которое получили путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, и эта молекула ДНК экспрессирует белок антитела или аминокислотную последовательность, определяющую антитело, при этом ДНК или аминокислотную последовательность получили с использованием технологии рекомбинантной ДНК или аминокислотной последовательности, которая доступна и хорошо известна в данной области техники.

Используемый в настоящем изобретении термин «антиген» или «Ag» относится к молекуле, которая вызывает иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать в себя либо выработку антител, либо активацию специфических иммунологически компетентных клеток, либо и то, и другое. Квалифицированному специалисту будет понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить антигеном. Кроме того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая ДНК, которая содержит последовательность нуклеотидов или частичную последовательность нуклеотидов, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, следовательно, кодирует «антиген», как этот термин используется в настоящем документе. Кроме того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген необязательно должен кодироваться исключительно полной нуклеотидной последовательностью гена. Очевидно, что настоящее изобретение включает в себя, но не ограничивается этим, использование частичных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена и что эти нуклеотидные последовательности расположены в различных комбинациях для кодирования полипептидов, которые вызывают необходимый иммунный ответ. Более того, специалист в данной области техники поймет, что антиген совершенно не обязательно должен кодироваться «геном». Очевидно, что антиген может быть выработан, синтезирован или получен из биологического образца, или может быть макромолекулой помимо полипептида. Такой биологический образец может включать в себя, но не ограничивается ими, образец ткани, образец опухоли, клетки или жидкость с другими биологическими компонентами.

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

В одном варианте осуществления настоящего изобретения внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен. Примеры первичных внутриклеточных сигнальных доменов включают в себя домены, полученные из молекул, ответственных за первичную стимуляцию или антигензависимую стимуляцию. В одном варианте осуществления настоящего изобретения внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий внутриклеточный домен. Примеры костимулирующих внутриклеточных сигнальных доменов включают в себя домены, полученные из молекул, ответственных за костимулирующие сигналы или антигеннезависимую стимуляцию. Например, в случае CART первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность Т-клеточного рецептора, а костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность из корецептора или костимулирующей молекулы.

Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать сигнальный мотив, известный как мотив активации иммунорецептора на основе тирозина или ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Примеры ITAM, содержащие первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают в себя, но не ограничиваются ими, последовательности, полученные из CD3 дзета, общего FcR гамма (FCER1G), Fc гамма R11a, FcR бета (Fc эpsilon Rib), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эpsilon, CD79a, CD79b, DAP10, и DAP12.

Используемый в настоящем изобретении термин «дзета» или, в качестве альтернативы, «цепь дзета», «CD3-дзета» или «TCR-дзета» определяется как белок, представленный как GenBan Acc. № BAG36664.1, или эквивалентные остатки из видов, отличных от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т.п., и «дзета-стимулирующий домен» или, в качестве альтернативы, «CD3-дзета-стимулирующий домен», или «стимулирующий домен TCR-дзета» определяется как аминокислотные остатки из цитоплазматического домена дзета-цепи или их функциональных производных, которых достаточно для функциональной передачи начального сигнала, необходимого для активации Т-клеток. В одном аспекте настоящего изобретения цитоплазматический домен дзета содержит остатки с 52 по 164 из GenBank Acc. № BAG36664.1 или эквивалентные остатки из видов, отличных от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т.п., которые являются его функциональными ортологами. В одном аспекте настоящего изобретения «дзета стимулирующий домен» или «CD3-дзета стимулирующий домен» представляет собой

последовательность, представленную как SEQ ID NO: 18. В одном аспекте настоящего изобретения «дзета стимулирующий домен» или «CD3-дзета стимулирующий домен» представляет собой последовательность, представленную как SEQ ID NO: 20.

Используемый в настоящем изобретении термин «костимулирующая молекула» относится к когнатному связывающему партнеру на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, тем самым опосредуя костимулирующий ответ Т-клеткой, такой как, но не ограничиваясь ими, пролиферация. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или их лигандов, которые способствуют эффективному иммунному ответу. Костимулирующие молекулы включают в себя, но не ограничиваются ими, молекулу главного комплекса гистосовместимости ГКС (major histocompatibility complex, МНС) I класса, В- и Т-лимфоцитарный аттенюатор (B- and T-lymphocyte attenuator, BTLA) и рецептор лиганда Toll, а также OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137). Дополнительные примеры таких костимулирующих молекул включают в себя CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHT), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD 160, CD 19, CD4, CD8альфа, CD8бета, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD 19a и лиганд, который специфически связывается с CD83.

Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой внутриклеточную часть костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула могут быть представлена в следующих семействах белков: белки-рецепторы TNF, иммуноглобулиноподобные белки, рецепторы цитокинов, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-клетки. Примеры таких молекул включают в себя CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, ICAM-1, антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцита (LFA-1), CD2, CDS, CD7, CD287, LIGHT, NKG2C, NKG2D, SLAMF7, NKp80, NKp30, NKp44, NKp46, CD 160, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т.п.

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

Используемый в настоящем изобретении термин «4-1BB» относится к члену суперсемейства TNFR с аминокислотной последовательностью, представленной как GenBank Acc. № AAA62478.2 или эквивалентными остатками из видов, отличных от

человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекоподобной обезьяны и т.п.; и «костимулирующий домен 4-1BB» определяется как аминокислотные остатки 214-255 GenBank Acc. № AAA62478.2 или эквивалентные остатки из видов, отличных от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекоподобной обезьяны и т.п. В одном аспекте настоящего изобретения «костимулирующий домен 4-1BB» представляет собой последовательность, представленную как SEQ ID NO: 14, или эквивалентные остатка из видов, отличных от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекоподобной обезьяны и т.п.

Используемый в настоящем изобретении термин «иммунная эффекторная клетка» относится к клетке, которая участвует в иммунном ответе, например, в стимулировании иммунного эффекторного ответа. Примеры иммунных эффекторных клеток включают в себя Т-клетки, например, альфа/бета Т-клетки и гамма/дельта Т-клетки, В-клетки, естественные клетки-киллеры (natural killer, NK), естественные Т-клетки-киллеры (NKT), тучные клетки и фагоциты миелоидного происхождения.

Используемые в настоящем изобретении термины «иммунная эффекторная функция» или «иммунный эффекторный ответ» относятся к функции или ответу, например, иммунной эффекторной клетки, которая усиливает или стимулирует иммунную атаку клетки-мишени. Например, иммунная эффекторная функция или ответ относится к свойству Т- или NK-клетки, которое способствует уничтожению или ингибированию роста, или пролиферации клетки-мишени. В случае Т-клетки первичная стимуляция и костимуляция являются примерами иммунной эффекторной функции или ответа.

Используемый в настоящем изобретении термин «противораковый эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, включая, но не ограничиваясь ими, например, уменьшение объема опухоли, уменьшением количества раковых клеток, уменьшение количества метастазов, увеличение продолжительности жизни, снижение пролиферации раковых клеток, снижение выживаемости раковых клеток или улучшение различных физиологических симптомов, связанных с раковым состоянием. «Противораковый эффект» также может проявляться способностью пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител в первую очередь предотвращать возникновение рака. Термин «противоопухолевый эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, включая, но не ограничиваясь ими, например, уменьшение объема опухоли, уменьшение количества опухолевых клеток, уменьшение пролиферации опухолевых клеток или снижение выживаемости опухолевых клеток.

Используемый в настоящем изобретении термин «аутологичный» относится к любому материалу, полученному от той же особи, которой он позднее будет повторно введен.

Используемый в настоящем изобретении термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному от другого животного того же вида, что и особь, которой вводят этот материал. Считается, что две или более особи являются аллогенными по

отношению друг к другу, если гены в одном или нескольких локусах не идентичны. В некоторых аспектах настоящего изобретения аллогенный материал от особей одного и того же вида может быть достаточно непохожим генетически, чтобы антигенно взаимодействовать.

Способы добавления/модификации гена являются хорошо известными в данной области техники и применимыми к настоящему изобретению. Например, способы доставки CAR или нокаута гена можно осуществлять методами стабильной или транзientной трансфекции или лентивирусной или ретровирусной трансдукцией. Модификацию генов можно проводить с помощью этих или других методов с использованием, например, CRISPR, TALEN или других таких технологий.

ПРИМЕРЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Пример 1: Исходный материал, сепарация монуклеарных клеток (mononuclear cell, MNC) человека и выделение Т-клеток

Исходный материал, кровь плаценты (которая включает в себя как пуповинную кровь человека (umbilical cord blood, UCB), так и/или перфузат плаценты человека (human placenta perfusate, HPP)) собирают с информированного согласия через LifebankUSA. После сбора исходные материалы обогащают монуклеарными клетками (MNC) с помощью седиментации эритроцитов (red blood cell, RBC) гидроксипропилированным крахмалом или сепарации клеток в градиенте плотности Ficoll-Paque. Затем MNC подвергают процессу положительной селекции для истощения регуляторных CD25⁺ Т-клеток (Tregs) с последующей положительной селекцией для CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток с использованием наборов для сепарации клеток Miltenyi. Перед замораживанием клеток берут аликвоты выделенных Т-клеток для серологического исследования и тестирования на стерильность, а также для анализа фенотипа.

Фенотип выделенных Р-Т-клеток отличается от монуклеарных клеток периферической крови. Р-Т-клетки содержат >78% CD3⁺CD56⁻ Т-клеток и состоят в основном из CD3⁺ CD45RA⁺ CCR7⁺ CD27⁺ наивных Т-клеток с низкой частотой CD3⁺ CD45RA⁻CCR7⁺ CD27⁺ центральных Т-клеток памяти и CD3⁺CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁺ эффекторных Т-клеток памяти. Истощение CD25 значительно снизило частоту CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ Tregs в Р-Т-клетках до уровня ниже 0,5%.

Дополнительный исходный материал включает в себя, но еще не протестирован, CD34 гемопозитические стволовые клетки/Т-клетки плаценты, полученные из предшественников. Процесс экспансии и дифференцировки предшественников в Т-клетки может занять 50-60 дней. Важно отметить, что популяции, показанные ниже с текущими протоколами, имеют значительное количество популяции CD4⁺/CD8⁺ клеток, однако полностью дифференцированные единичные позитивные Т-клетки могут быть легко отобраны/обогащены.

Оценку Т-клеток, полученных из перфузата плаценты, завершили, но процедура выделения нуждается в оптимизации, поскольку текущая процедура приводит к низкому количеству клеток, жизнеспособности и чистоте Т-клеток.

Пример 2: Активация и экспансия Т-клеток

Немодифицированные Р-Т-клетки:

Выделенные РТ-клетки размораживают, подвергают истощению CD25 с использованием шариков Miltenyi анти-CD25 для удаления CD4+CD25+CD127- Treg (могут быть добавлены до этапа выделения Т-клеток) и активируют с использованием анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (соотношение гранулы:клетки 1:1) от Invitrogen или с использованием анти-CD3/анти-CD28 наночастиц Transact (объемное разведение 1:100) от Miltenyi. Затем клетки размножают, используя 100 МЕ/мл IL-2, 10 нг/мл IL-7+10 нг/мл IL-15 или 100 МЕ/мл IL-2+10 нг/мл IL-7. Дополнительные повторные стимуляции завершают на 12-14 день, и клетки размножают до 21 дня в сосудах Grex для максимизации кратности экспансии.

Немодифицированные Р-Т-клетки могут быть размножены до 600 раз при начальной стимуляции и до 3600 раз при повторной стимуляции (re-stimulation, RS) на 14 день при культивировании до 20 дня.

В различных условиях культивирования немодифицированные размноженные Р-Т-клетки на 20 день демонстрировали более ранний фенотип дифференцировки по сравнению с некультивируемыми МКМП (PBMC) после размораживания (post-thaw, PT) и состояли в основном из CD3+ CD45RA+ CD62L+ наивных Т-клеток и CD3+ CD45RA-CD62+ центральных Т-клеток памяти, в то время как некультивируемые МКМП (PBMC) после размораживания (post-thaw, PT) состояли в основном из более дифференцированных CD3+ CD45RA-/+ CD62L- эффекторных Т-клеток памяти и терминальных эффекторных Т-клеток. Учитывая статус ранней дифференцировки Р-Т-клеток, дополнительные циклы стимуляции должны быть осуществимы и значительно увеличивают кратность экспансии, чтобы обеспечивать «готовое к использованию» производство аллогенного CAR-Т клеток, полученных из плаценты, сохраняя при этом сбалансированную смесь Т-клеток центральной памяти, которые будут сохраняться у пациента, и эффекторных Т-клеток, которые немедленно нацелятся и уничтожат опухолевые клетки.

CAR-модифицированные Р-Т-клетки:

Выделенные Т-клетки (которые подверглись истощению CD25 перед замораживанием) разморозили и активировали с использованием анти-CD3/анти-CD28 наночастиц Transact (объемное разведение 1:100) от Miltenyi. Затем клетки размножали в сосудах Grex с использованием 100 МЕ/мл IL-2. На 3 день клетки трансдуцировали либо лентивирусом CD19 CAR (LV), либо ретровирусом (RV) на планшетах, покрытых ретронектином, с использованием метода предварительного центрифугирования вируса. Затем клетки культивировали до 15 дня, при этом подпитку среды проводили каждые 2-3 дня.

Модифицированные CD19 CAR Р-Т-клетки могут быть размножены в 237-336 раз после 15 дней при культивировании без повторной стимуляции.

После пятнадцати дней культивирования модифицированные CD19 CAR P-T-клетки демонстрировали выраженный фенотип дифференцировки T-клеток по сравнению с CD19 CAR T-клетками, полученных из PBMC. P-T-клетки состояли из оптимальной смеси CD3+ CD45RA+ CCR7+ наивных/стволовых T-клеток памяти и CD3+ CD45RA+ CCR7- эффекторных T-клеток, в то время как CD19 CAR T-клетки, полученные из МКМП (PBMC), состояли в основном из CD3+ CD45RA- CCR7- эффекторных T-клеток памяти и CD3+ CD45RA+ CCR7- эффекторных T-клеток. Не трансдуцированные (not transduced, NT) P-T-клетки и CD19 CAR RV P-T-клетки состояли из большего количества наивных/стволовых T-клеток памяти (SCM), чем CD19 CAR LV P-T-клетки.

Кроме того, полученные из МКМП (PBMC) эффекторные T-клетки памяти (T_{em}) и эффекторные T-клетки (T_{eff}) экспрессировали значительно более высокие уровни маркера истощения CD57, в то время как экспрессия P-T-клеток была низкой.

Высокая частота и смесь эффекторных T-клеток и наивных/стволовых T-клеток памяти в P-T-клетках, наряду с низкой экспрессией CD57, демонстрирует продукт CAR-T, который может эффективно нацеливаться и уничтожать опухолевые клетки, сохраняя при этом способность самообновляться и пополнять свои более дифференцированные подмножества T-клеток с течением времени.

В целом, NT P-T-клетки и P-CD19 CAR T-клетки на 15 день экспрессировали высокие уровни CD45RA, CD27, CCR7, CD127 и CD28 и экспрессировали низкие уровни маркера истощения CD57 и маркеров иммунных контрольных точек (отрицательные регуляторы иммунных ответов) PD-1, Lag-3 и Tim-3.

P-T-клетки трансдуцировали на 3 день различными вирусными векторами scFv CD19 CAR мыши и человека, перечисленными ниже:

scFv CD19 CAR лентивирус (lentivirus, LV) мыши (murine, Ms)

- JL4.19 (EF1a-CD8-scFv-CD8-NTM-BBz) (вектор SBI, CAR19 UPENN)

- Вирус для исследовательских целей, произведенный Vector Builder (VB) и SignaGen.

scFv CD19 CAR Lentivirus (LV) человека (human, Hu)

- JL huCAR19 (CD8-сигнал-VL-линкер-VH-CD8NTM-BBz) (идентичен CAR UPENN, за исключением Hu scFv)

- JK1 huCAR19 (CD8-сигнал-VL-линкер-VH-CD8NTM-28z) ("CAR NCI": шарнирный и трансмембранный домены CD8 на 4 аминокислоты (aminoacids, aa) являются более длинными, чем у JL, костимулирующий домен CD28, Hu scFv)

- JK2 huCAR19 (CD8-сигнал-VL-линкер-VH-CD8NTM-BBz) (такой же как CAR NCI, но с костимулирующим доменом 41BB, Hu scFv)

- Все три последовательности человека имеют являются для исследовательских целей и производятся SignaGen.

Ретровирус (RV) CAR scFv мыши (murine, Ms)

- Произведенный и предоставленный Sorrento Therapeutics

Констру	Вирусный	Последовате	Костимул	# донора	Дополнительные
---------	----------	-------------	----------	----------	----------------

конструкция	вектор	господствующая специфичность scFv	содержащий домен	(N)	подробности
JL4.19	Лентивирус	Мышь	4-1BB	4	Основанный на мышши Ab FMC63
JL	Лентивирус	Человек	4-1BB	2	Идентичный JL4.19, за исключением Hu scFv
JK1	Лентивирус	Человек	CD28	2	Модифицированный в шарнирном и трансмембранном доменах из JL с костимулирующим доменом CD28
JK2	Лентивирус	Человек	4-1BB	2	Такой же как JK1, но с костимулирующим доменом 41BB
Sorrento	Ретровирус	Мышь	4-1BB	7	Патентованный

Таблица 1: Сводная информация о конструкциях CAR CD19 P-T-клеток

Эффективность трансдукции CAR CD19 измеряли путем инкубации клеток с реагентом CD19 Fc-Fitc и количественного определения процента клеток CD19 CAR+ с использованием проточной цитометрии. К 15 дню P-T-клетки экспрессировали CD19 CAR при трансдукции со всеми Ms scFv LV или RV (от Vector Builder, SignaGen или Sorrento) и экспрессировали CD19 CAR при трансдукции с последовательностями Hu scFv JK2 и JL, из которых все состояли из костимуляторного домена 4-1BB. P-T-клетки не экспрессировали CD19 CAR при трансдукции с последовательностью Hu scFv JK1, содержащей костимулирующий домен CD28. Оптимальные множественность заражения (multiplicity of infection, MOI)/концентрации были определены для каждого CD19 CAR: MOI 50 для Vector Builder Ms scFv CD19 CAR LV, MOI 100 для SignaGen Ms scFv CD19 CAR LV, MOI 200 для SignaGen Hu scFv CD19 CAR LV и 2,5X для Sorrento Ms scFv CD19 CAR RV (рассчитанный титр является неизвестным).

P-T-клетки могли быть легко размножены после 15 дней в культуре (для масштабов исследования). Наивысшее кратность экспансии в 483 раза была достигнута путем трансдукции P-T-клеток с помощью Ms CD19 CAR LV, а самая низкая кратность экспансии в 132 раза была получена путем трансдукции P-T-клеток с помощью Hu JK1 CD19 CAR LV.

P-CD19 CAR T-клетки на 15 день демонстрировали высокую жизнеспособность и чистоту CD3+ CD56- T-клеток, независимо от вирусного вектора, используемого для

трандукции. P-T-клетки, трансдуцированные с помощью Vector Builder Ms scFv CD19 CAR LV, привели к значительно более высокому уровню CD4⁺ T-клеток по сравнению с той же последовательностью Ms scFv CD19 CAR LV, произведенной SignaGen. P-T-клетки, трансдуцированные Ms scFv CD19 CAR от Sorrento, привели к наибольшей частоте CD8⁺ T-клеток и сбалансированной смеси CD4⁺ и CD8⁺ T-клеток.

При использовании оптимизированных MOIs/концентраций для каждого типа вируса CD19 CAR, экспрессия CD19 CAR варьировалась от 22 до 70% для P-T-клеток на 15 день. Vector Builder Ms scFv CD19 CAR LV продемонстрировал, что большая часть его экспрессии CD19 CAR была экспрессирована на CD4⁺ T-клетках, тогда как Ms scFv CD19 CAR RV от Sorrento продемонстрировал равной комбинации экспрессии CD19 CAR на CD4⁺ и CD8⁺ T-клетках и наибольшую общую частоту экспрессии CD19 CAR в CD8⁺T-клетках.

Расширенный анализ фенотипа P-CD19 CAR T-клеток продемонстрировал отчетливые фенотипические различия между P-T-клетками, трансдуцированными RV, по сравнению с LV. При RV наблюдался менее дифференцированный фенотип с самой высокой частотой CAR⁺ T scm/наивные клетки, тогда как для P-T-клеток, трансдуцированных LV, наблюдался более дифференцированный фенотип с более низкой частотой CAR⁺ T scm/наивные клетки (особенно Hu JK2 LV). Все CD19 CAR⁺ P-T-клетки экспрессировали более высокую частоту CD45RA, CCR7, CD27 и более низкую частоту PD-1, TIM-3 и маркер истощения CD57 по сравнению с CD19 CAR⁺ T-клетками, полученными из МКПК (PBMC).

Пример 3: Активность CD19 CAR *in vitro* и *in vivo*

Цитолитическая активность CAR-T-клеток P-CD19 на 15 день по отношению к линиям раковых клеток

Функциональную активность P-CD19 CAR T-клеток оценивали *in vitro* по отношению к линиям клеток CD19⁺ лимфомы Беркитта (Daudi) и CD19⁺ острого лимфобластного лейкоза (Nalm6) в кинетическом анализе цитотоксичности ACEA, и сравнивали активность P-T-клеток с PBMC Ms CD19 CAR RV (n=6). Клетки CD19⁻ K562 включали в качестве отрицательного контроля для оценки неспецифического уничтожения.

Высвобождение цитокинов P-CD19 CAR T-клеток на 15 день в совместном культивировании с линиями раковых клеток

Кроме того, функциональную активность P-CD19 CAR T-клеток оценивали *in vitro* по сравнению с линиями клеток лимфомы Беркитта (Daudi) CD19⁺ и острого лимфобластного лейкоза (Nalm6) CD19⁺ в анализе высвобождения цитокинов. Клетки K562 CD19⁻ включали в качестве мишеней для оценки неспецифического уничтожения P-CD19 CAR T-клеток. P-CD19 CAR T-клетки совместно культивировали с мишенями CD19^{+/-} при соотношении E:T 1:1 в течение 24 часов, супернатанты клеточной культуры собирали и анализировали на секрецию различных цитокинов и эффекторных белков.

P-CD19 CAR T-клетки секретировали провоспалительные цитокины и эффекторные белки (IFN-g, гранзим А, гранзим В, GM-CSF, IL2, перфорин и TNF- α) антигенспецифическим образом, когда были совместно культивированы с CD19+ Daudi and Nalm6 мишенями, при этом наибольшая общая секреция наблюдалась с Ms CD19 CAR RV. Минимальная секреция цитокинов IL-6 и IL-8 наблюдалась во всех мишенях, а минимальная секреция всех цитокинов и белков наблюдалась в отношении CD19- K562 клеток с P-CD19 CAR T-клетками. Против CD19+ Daudi and Nalm6 мишеней P-CD19 CAR RV T-клетки секретировали более высокие концентрации гранзима В, GM-CSF, перфорина, TNF- α и особенно IL-2 по сравнению с их аналогами, полученными из МКПК (PBMCs). Значительно более высокая секреция IL-2 свидетельствует о менее дифференцированной, более похожей на популяцию стволовых клеток, которые могут способствовать большей экспансии T-клеток, усиленной функции T-клеток и выживанию.

Активность in vivo P-CD19 CAR T-клеток

Противоопухолевую активность P-CD19 CAR T-клеток оценивали in vivo с использованием модели ксенотрансплантата диссеминированной лимфомы у мышей NSG. Клетки Daudi, экспрессирующие люциферазу (3×10^6), вводили внутривенно (в/в) на 0 день с последующей в/в инъекцией P-CD19 CAR T-клеток. P-T-клетки дозировали в соответствии с частотами CD8+ CD19 CAR+, указанными в таблице 1 (P-T: RV: одна доза 14×10^6 на 7 день; LV: одна доза 20×10^6 на 7 день или три дозы 20×10^6 на 7, 10 и 14 дни). Биолуминесцентную визуализацию (Bioluminescence Imaging, BLI) и выживаемость использовали в качестве основных конечных точек исследования.

Группа	Обработка	# животных	График дозирования	Доза T-клеток	Предварительная замораживание % CD19 CAR+ CD8+ (CD3+)	Доза клеток CD19 CAR+ CD8+	Способ введения
1	Носитель (PBS)	5	7 день	не применимо	не применимо	не применимо	в/в
2	PBMC CD19-	5	7 день	7 MM	30,59%	2,14MM	
3	CAR RV	5	7 день	2 MM	30,59%	0,612MM	
4	P-T CD19-CAR RV	5	7 день	14 MM	15,01%	2,1MM	

5	P-T CD19-CAR LV TRAC KO	5	7 день	20 MM	3,11%	0,622MM
6	P-T CD19-CAR LV (многократная доза)	5	7, 10, 14 дни	20 MM	3,50%	3×0,7MM=2,1 MM

Таблица 2: Дозирование P-CD19 CAR T-клеток в диссеминированной CD19+ модели мыши Daudi-Luc

P-CD19 CAR T-клетки хорошо переносились и были безопасными в этой модели мыши даже при трех дозах 20×10^6 немодифицированных TRAC T-клеток. Все P-CD19 CAR T-клетки значительно уменьшали опухолевую массу и улучшали выживаемость. Через четыре недели после обработки в группе, обработанной носителем, уровень смертности составлял 100%, в то время как все животные из группы, обработанной P-CD19 CAR T-клетками (n=5), оставались живыми без клинических симптомов, включая потерю веса. Группы, обработанные P-CD19 CAR LV T-клетками, справились с опухолевой массой так же, как и группа, обработанная PBMC CD19 CAR T-клетками (7MM). Многократное введение (3X) клеток P-CD19 CAR LV T-клеток демонстрировало улучшение по сравнению с однократной дозой и проявило несколько лучшее лечение опухоли и выживаемость, чем в группе, получавшей 7 MM PBMC CD19 CAR RV (обе дозы в сумме составили 2,1 MM CD8+ CD19- CAR+ T-клеток). Примечательно, что однократная доза клеток P-CD19 CAR LV T-клеток (0,6 MM CD8+ CAR+ CD19-T-клеток) снижала опухолевую массу и улучшала выживаемость лучше, чем в группе, получавшей 2 MM PBMC CD19 CAR RV (также 0,6 MM CD8+ CAR+ CD19-T-клеток). Примечательно, что мыши, обработанные P-CD19 CAR RV T-клетками, превзошли все группы обработки и уничтожили опухолевые клетки со 100% выживаемостью до 120 дня. Считается, что оптимальная смесь CD4+ и CD8+ T-клеток, более высокая экспрессия CD8+ CD19 CAR+ и более высокая секреция цитокинов (особенно IL-2 для поддержания функции/выживаемости T-клеток), все описанные в настоящем документе, в совокупности способствуют большей эффективности и повышенной выживаемости, наблюдаемым *in vivo* с P-CD19 CAR T-клетками, особенно P-CD19 CAR RV T-клетками.

Выживших мышей из группы, обработанной P-CD19 CAR RV T-клетками, затем повторно заражали дополнительными опухолевыми клетками Daudi. На 122 день клетки Daudi, экспрессирующие люциферазу (3×10^6), внутривенно (в/в) вводили выжившим мышам, обработанным P-CD19 CAR RV T-клетками, а также совпадающим по возрасту (6-месячным) наивным мышам NSG, чтобы служить в качестве новой контрольной группы, обработанной носителем.

P-CD19 CAR RV T-клетки были единственным средством лечения, которое устраняло опухоль и приводило к 100% выживаемости в течение 120 дней, в дополнение к лечению опухоли после повторного заражения Daudi (на 122 день) и увеличению выживаемости до 215 дней.

Кроме того, анализ проточной цитометрии клеток четырех выживших мышей в конце исследования после повторного заражения демонстрировал, что CD45+ CD56- CD3+ CD19 CAR+ P-T-клетки человека могли сохраняться *in vivo* и обнаруживаться в крови, селезенке и костном мозге повторно зараженных мышей в анализе проточной цитометрии клеток в конце исследования (185-215 дни; n=4), при этом наибольшая частота и количество клеток выявлялись в дни селезенки.

Пример 4: Нокаут T-клеточного рецептора (TRAC) в клетках

TRAC нацеливали с помощью направляющей РНК, гРНК (guide RNA, gRNA) на первый экзон локуса TRAC. Химически модифицированные РНК-формы Cas9 и гРНК трансфицировали в P-T-клетки на 6-8 день культивирования P-T-клеток посредством нуклеофекции (Lonza). Эффективность модификации гена контролировали методом проточной цитометрии с использованием антител против TCR $_{\alpha\beta}$ или CD3.

В трех отдельных экспериментах эффективность нокаута TRAC измеряли через 3 дня после трансфекции. Дата на оси x указывает время трансфекции. Более 90% нокаута гена TRAC было достигнуто независимо от метода активации P-T-клеток и условий культивирования (Dynabeads с IL-2 или Transact с IL-7 и IL-15). Процесс CRISPR оказал минимальное влияние на пролиферацию и жизнеспособность клеток. Между различными группами не существует значительных изменений пролиферации и жизнеспособности клеток.

Кроме того, когда P-T-клетки трансдуцировали CD19 CAR LV или RV на 3 день с последующей трансфекцией и KO TRAC с использованием CRISPR на 6 день, P-T NT-TRAC KO и P-CD19 CAR-TRAC KO клетки на 15 день демонстрировали >97% эффективность KO TRAC.

Кроме того, KO TRAC не приводил к каким-либо существенным изменениям экспрессии CD19 CAR или цитолитической активности *in vitro* по сравнению с CD19+ Daudi и Nalm6 мишенями в P-T-клетках.

Пример 5: Подтверждение потери функции при нокауте TRAC

Подтверждение потери функции при нокауте TRAC завершали повторной стимуляцией P-T CD19 CAR-NT (нетрансфицированные) и P-T CD19 CAR-TRAC KO клеток с анти-CD3/CD28 наночастицами и культивированием клеток в течение четырех дней.

У трех доноров P-T-клеток наблюдали экспансия в 3,2-5,1 раза после повторной стимуляции и четырех дней культивирования клеток с CD19 CAR-NT клетками, тогда как минимальную экспансию в несколько раз обнаружили после повторной стимуляции CD19 CAR-TRAC KO клеток, что подтверждает потерю функционального комплекса TCR/CD3.

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

Два независимых анализа использовали для измерения аллореактивности МКПК (РВМС) против Р-Т-клеток или Р-Т-клеток против МКПК (РВМС). В первом анализе аллореактивность измеряли как активность уничтожения клеток от одного донора к другому при совместном культивировании в течение 4 часов. Клетки-мишени метили РКН26, и цитотоксичность выражали как процент мертвых клеток-мишеней по отношению к общему количеству клеток-мишеней.

В двух отдельных экспериментах МКПК (РВМС) или Т-клетки, полученные из МКПК (РВМС), культивировали совместно с Р-Т-клетками. МКПК (РВМС) от одного донора убивали МКПК (РВМС) от другого донора с высокой эффективностью. Однако РВМС не убивали Р-Т-клетки (СВТ). В отдельном эксперименте Т-клетки, полученные из МКПК (РВМС), (РВТ), убивали линию раковых клеток RPMI8226 (RPMI) с высокой эффективностью. Однако они обладали минимальной активностью уничтожения Р-Т-клеток (СВТ). Р-Т-клетки также не убивали Т-клетки, полученные из МКПК (РВМС).

Во втором анализе аллореактивность измеряли как предпочтительную пролиферацию Т-клеток одного донора при совместном культивировании с другим донором. Клетки от двух доноров метили разными красителями (CFSE и РКН26) и совместно культивировали в соотношении 1:1 в течение 4 дней. Разбавление красителя свидетельствует о пролиферации клетки и может быть выражено как уменьшение процента клеток с высокой интенсивностью или изменением средней интенсивности флуоресценции.

Р-Т-клетки и контрольные МКПК (РВМС) метили РКН26, а МКПК (РВМС) метили CFSE. CFSE-меченые МКПК (РВМС), РКН26-меченые Р-Т-клетки (СВТ) и смешанная культура МКПК (РВМС), меченная либо CFSE, либо РКН26, служили в качестве контроля. Присутствует более низкий процент РКН26-hi Р-Т-клеток (СВТ) по сравнению с культурой только Р-Т-клеток, что указывает на преимущественную пролиферацию Р-Т-клеток при совместном культивировании с МКПК (РВМС).

В соответствии с этим результатом, среднекратный прирост (mean fold increase, MFI) Р-Т-клеток также снизился при совместном культивировании с МКПК (РВМС) по сравнению только с Р-Т-клетками и МКПК (РВМС) с контролем МКПК (РВМС), что указывает на лучшую пролиферацию. Напротив, MFI МКПК (РВМС) при совместном культивировании увеличивалась по сравнению только с МКПК (РВМС) или МКПК (РВМС) с культурой МКПК (РВМС).

Пример 7: Аллореактивность Р-Т-клеток по сравнению с HLA-несовместимыми МКПК (РВМС), измеренная в анализах *in vitro*

[00137] Для дальнейшей оценки аллореактивности Р-Т-клеток HLA-несовместимые РКН26-меченые Р-Т-клетки культивировали совместно с обработанными CFSE и митомизином-С (Mitomycin-C, ММС) МКПК (РВМС) в соотношении 1:1 в течение 4 дней в односторонней реакции смешанных лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR) для оценки любой аллореактивности Р-Т-клеток по отношению к МКПК (РВМС) (потенциал для РТПХ (GvHD)). Показания анализа включали в себя кратность экспансии Р-Т-клеток,

апрегуляцию маркера активации Т-клетки CD25 на Р-Т-клетках, а также секрецию провоспалительных цитокинов и эффекторных белков Р-Т-клетками в ответ на HLA-несовместимые МКПК (РВМС).

ID донора	# несовместимосте	ID донора	# несовместимосте	ID донора	# несовместимосте
Р-Т D#17182	й I класса	Р-Т D#17817	й I класса	Р-Т D#17695	й I класса
РВМС донор # 1	3/6	РВМС донор # 1	4/6	РВМС донор # 1	4/6
РВМС донор #2	3/6	РВМС донор #2	6/6	РВМС донор #2	6/6
РВМС донор #3	6/6	РВМС донор #3	2/6	РВМС донор #3	4/6
РВМС донор #4	6/6	РВМС донор #4	2/6	РВМС донор #4	5/6

Таблица 3: Сводная информация о HLA-несовместимостях между донорами Р-Т и МКПК (РВМС)

[00138] Эффективность нокаута $TCR_{\alpha\beta}$ была очень высокой на Р-Т-клетках, включенных в оценки аллореактивности, с оставшимся ~2% или менее $TCR_{\alpha\beta}$. Истощение $TCR_{\alpha\beta}$ с использованием микрогранул Miltenyi с Р-Т D# 17695 NT-КО дополнительно снижало и улучшало экспрессию остаточного $TCR_{\alpha\beta}$.

Три донора Р-Т NT-NT клеток (без модификации $TCR_{\alpha\beta}$) демонстрировали минимальную пролиферацию при совместном культивировании с четырьмя различными HLA-несовместимыми МКПК (РВМС) в течение четырех дней. Повторная стимуляция NT-NT клеток с помощью анти-CD3/CD28 наночастиц служила положительным контролем и демонстрировала, что отсутствие аллореактивности NT-NT Р-Т-клеток не было связано с ослабленными/нефункционирующими Т-клетками. Минимальная пролиферация, которую наблюдали у Р-Т-клеток, была дополнительно снижена, когда Р-Т-клетки подвергались $TCR_{\alpha\beta}$ КО и $TCR_{\alpha\beta}$ истощениям (показано с Р-Т-клетками D # 17695).

Три донора Р-Т NT-NT клеток (без модификации $TCR_{\alpha\beta}$) демонстрировали некоторую степень секреции IFN-g и гранзима В с минимальной/низкой секрецией TNF- α и перфорина при совместном культивировании с четырьмя различными HLA-

несовместимыми PBMCs в течение четырех дней. Вся секреция цитокинов/эффекторных белков, которая наблюдалась с P-T-клетками, была значительно снижена, когда P-T-клетки подвергались TCR_{a/b} КО и TCR_{a/b} истощениям, а затем совместно культивировались с HLA-несовместимыми PBMC.

Пример 8: Аллореактивность МКПК (PBMC) по отношению к HLA-несовместимыми P-T-клетками, измеренная в анализах *in vitro*

Аналогичным образом также оценивали аллореактивность МКПК (PBMC) в отношении HLA-несовместимых P-T CD19 CAR клеток. В этой системе МКПК (PBMC) метили PKN26 и совместно культивировались с обработанными CFSE и митомицином-C (MMC) P-CD19 CAR T-клетками в соотношении 1:1 в течение 4 дней в односторонней MLR для оценки аллореактивности МКПК (PBMC) по отношению к P-T-клеткам (хозяин против трансплантата). Показания анализа включали в себя кратность экспансии МКПК (PBMC), апрегуляцию маркера активации T-клетки CD25 на МКПК (PBMC), а также секрецию провоспалительных цитокинов и эффекторных белков МКПК (PBMC) в ответ на HLA-несовместимые P-CD19 CAR T-клетки.

Все три донора МКПК (PBMC) продемонстрировали отсутствие пролиферации при совместном культивировании с HLA-несовместимыми T-клетками CAR P-CD19 в течение четырех дней. Повторная стимуляция МКПК (PBMC) с анти-CD3/CD28 наночастицами служила положительным контролем и продемонстрировала, что отсутствие аллореактивности МКПК (PBMC) не было связано с ослабленными/нефункционирующими T-клетками.

В соответствии с отсутствием пролиферации все три донора МКПК (PBMC) также демонстрировали отсутствие апрегуляции маркера активации T-клетки CD25 при совместном культивировании с HLA-несовместимыми P-CD19 CAR T-клетками в течение четырех дней. Повторная стимуляция МКПК (PBMC) анти-CD3/CD28 наночастицами служила положительным контролем, значительно увеличивая экспрессию CD25, и продемонстрировала, что отсутствие аллореактивности МКПК (PBMC) не было связано с ослабленными/нефункционирующими T-клетками.

Все три МКПК (PBMC) демонстрировали от незначительного повышения секреции провоспалительных цитокинов и эффекторных белков или его отсутствие при совместном культивировании с HLA-несовместимыми P-CD19 CAR T-клетками в течение четырех дней. Единственным наблюдаемым исключением было увеличение секреции TNF- α при совместном культивировании PBMC #1 с P-CD19 CAR T-клетками CAR P-CD19.

В совокупности эти результаты позволяют предположить, что P-CD19 CAR T-клетки не вызывают аллореактивных ответов при культивировании с HLA-несовместимыми МКПК (PBMC) и могут проявлять характеристики иммунной привилегии, которые устранили бы их клиренс иммунными клетками пациента, сохраняя потенциал для их улучшенной персистенции *in vivo*.

Пример 9: Аллореактивность P-T-клеток в моделях животных

Аллореактивность (ксеноаллореактивность) немодифицированных, размноженных Р-Т-клеток на 21 день тестировали на мыши NCG модели РТПХ (GvHD). В этой модели МКПК (PBMC) вызывает РТПХ (GvHD), которую можно измерить как потерю веса. 30 миллионов CD25-истощенных Р-Т-клеток от трех доноров и контрольных МКПК (PBMC) вводили мышам NCG внутривенным способом. Вес животных контролировали в течение времени.

Изменение массы тела животных выражали в процентах от массы тела в день инъекции клетками. Каждая линия представляет собой одну мышь. Все пять животных в группе МКПК (PBMC) потеряли вес в течение 28 дней, и их пришлось умерщвлять. Ни у кого в группе Р-Т-клеток не было значительной потери веса и не было индукции ксено-GvHD. Р-Т-клетки были CD25-истощенными перед экспансией для удаления Tregs, поэтому отсутствие РТПХ (GvHD) не связано с CD4⁺ CD25⁺ CD127-FoxP3⁺ иммунными регуляторными Т-клетками. В настоящее время проводятся дополнительные исследования РТПХ (GvHD) для оценки аллореактивности Р-CD19 CAR Т-клеток и Р-CD19 CAR- TRAC КО Т-клеток.

Пример 10: Оценка безопасности нокаута (КО) TRAC СуСАРТ-19 и СуСАРТ-19 у гуманизированных CD34⁺ (Hu-CD34) NSG мышей

Цель этого исследования заключалась в оценке потенциальной токсичности, связанных с КО TRAC СуСАРТ-19 или СуСАРТ-19, включая аллогенную РТПХ (GvHD), нейротоксичность и синдром высвобождения цитокинов у мышей (NOD)-scid IL2Rgamma^{null} (NSG) без ожирения с диабетом, которым прижили CD34⁺ клетки пуповинной крови человека (NSG Hu-CD34).

В этом исследовании использовали самок Hu-CD34 NSG мышей в возрасте семи месяцев (через 24 недели после приживания CD34⁺ клеток пуповинной крови). Группа донора CD34 HLA I класса имела 5 из 6 несовместимостей с СуСАРТ-19 или СуСАРТ-19 TRAC КО клетками. Анализ периферической крови с помощью проточной цитометрии проводили на 3 день для проверки приживания CD45⁺ клеток человека. Основываясь на проценте привитых CD45⁺ клеток человека, шестнадцать мышей выбрали случайным образом в следующие четыре группы: без обработки (n=2), PBMC-CART-19 (n=3), СуСАРТ-19 (n=5), КО TRAC СуСАРТ-19 (n=6). В 0 день CART клетки вводили внутривенно (в/в) в дозе 10×10⁶ клетки/мышь (приблизительно 400×10⁶ клетки/кг).

У мышей, обработанных СуСАРТ-19 или СуСАРТ-19 TRAC КО при дозе 10×10⁶ клетки/мышь, наблюдалась потеря массы тела уже на 2 день, а масса тела восстанавливалась на 14 день. Увеличение выработки цитокинов в плазме обнаружили на 7 день, но не на 21 и 35 день. Обработка СуСАРТ-19 или СуСАРТ-19 TRAC КО значительно снизила количество В-клеток, полученных из донора CD34, на 7 день, а восстановление В-клеток наблюдали на 21 и 35 день.

Гистопатологический анализ продемонстрировал, что никаких изменений, связанных с РТПХ (GvHD), не наблюдали у животных, обработанных СуСАРТ-19 или СуСАРТ-19 TRAC КО. Кроме того, никаких изменений, связанных с обработкой

CyCART-19 или CyCART-19 TRAC KO, не наблюдали ни в одном исследованном органе и ткани, включая мозг, легкие, печень, селезенку, почки, кожу, тонкий и толстый кишечник.

Клетки CyCART-19 и CyCART-19 TRAC KO обнаружили в периферической крови на 7 день, но не на 21 и 35 день.

В совокупности это исследование продемонстрировало, что CyCART-19 или CyCART-19 TRAC KO при дозе 10×10^6 клетки/мышь не вызывали аллогенной РТПХ (GvHD) и нейротоксичности у HLA-несовместимых Hu-CD34 NSG мышей. Результаты по снижению массы тела, повышенной выработки цитокинов и уничтожению В-клеток показали, что обработка CyCART-19 или CyCART-19 TRAC KO индуцирует синдром высвобождения цитокинов при дозе 10×10^6 клеток/мышь.

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к описанным станут очевидными для специалистов в данной области техники из приведенного выше описания и сопровождающих фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Все ссылки, цитируемые в настоящем документе, включены в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны для включения в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей. Ссылка на любую публикацию предназначена для ее раскрытия до даты подачи заявки и не должна толковаться как признание того, что настоящее изобретение не имеет права датировать более поздним числом такую публикацию в силу предшествующего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Популяция Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (chimeric antigen receptor, CAR), где указанные Т-клетки представляют собой плацентарные Т-клетки, и где указанный CAR был введен в клетку путем вирусной трансдукции ретровирусным вектором.

2. Популяция Т-клеток по п.1, отличающаяся тем, что указанные плацентарные Т-клетки представляют собой Т-клетки пуповинной крови, Т-клетки плацентарного перфузата или их смесь.

3. Популяция Т-клеток по п.1, отличающаяся тем, что указанные плацентарные Т-клетки представляют собой Т-клетки пуповинной крови.

4. Популяция Т-клеток по п.1, отличающаяся тем, что указанные плацентарные Т-клетки представляют собой смесь Т-клеток пуповинной крови и Т-клеток плацентарного перфузата.

5. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что преобладающая субпопуляция CAR+ Т-клеток имеет фенотип T scm/naïve.

6. Популяция Т-клеток по п.5, отличающаяся тем, что указанная субпопуляция CAR+ T scm/наивных клеток содержит более примерно 30% популяции CAR+ Т-клеток, более примерно 40% популяции CAR+ Т-клеток, более примерно 45% популяции CAR+ Т-клеток или более примерно 50% популяции CAR+ Т-клеток.

7. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-6, отличающаяся тем, что субпопуляция CAR+ Т-клеток с фенотипом эффекторной памяти (Teff) содержит менее примерно 75% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 70% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 60% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 50% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 40% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 35% популяции CAR+ Т-клеток или менее примерно 30% популяции CAR+ Т-клеток.

8. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-7, отличающаяся тем, что субпопуляция CAR+ Т-клеток с фенотипом центральной памяти (Tcm) содержит менее примерно 10% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 8% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 6% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 5% популяции CAR+ Т-клеток, менее примерно 4% популяции CAR+ Т-клеток или менее примерно 3% популяции CAR+ Т-клеток.

9. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-8, отличающаяся тем, что относительная численность субпопуляции CAR+ Т-клеток, которые являются CD8+, превышает 50% относительной численности субпопуляции CAR+ Т-клеток, которые являются CD4+, превышает 60% относительной численности субпопуляции CAR+ Т-клеток, которые являются CD4+, превышает 70% относительной численности субпопуляции CAR+ Т-клеток, которые являются CD4+, превышает 80% относительной численности субпопуляции CAR+ Т-клеток, которые являются CD4+, превышает 90% относительной численности субпопуляции CAR+ Т-клеток, которые являются CD4+, превышает 100% относительной численности субпопуляции CAR+ Т-клеток, которые являются CD4+.

10. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-9, отличающаяся тем, что популяция Т-клеток обладает повышенной противоопухолевой активностью, по сравнению с популяцией Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

11. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-10, отличающаяся тем, что популяция Т-клеток содержит генетическое изменение для снижения иммуногенности против хозяина.

12. Популяция Т-клеток по п.11, отличающаяся тем, что указанное генетическое изменение представляет собой нокаут гена.

13. Популяция Т-клеток по п.12, отличающаяся тем, что указанный нокаут гена представляет собой нокаут Т-клеточного рецептора (TCR).

14. Популяция Т-клеток по п.13, отличающаяся тем, что указанный нокаут гена представляет собой нокаут альфа-константы Т-клеточного рецептора (TRAC).

15. Популяция Т-клеток по любому из пп.12-14, отличающаяся тем, что указанное генетическое изменение осуществляют путем трансфекции, ретровирусной трансдукции или лентивирусной трансдукции.

16. Популяция Т-клеток по любому из пп.12-15, отличающаяся тем, что дальнейшее генетическое изменение осуществляют с применением технологии CRISPR.

17. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-16, отличающаяся тем, что указанный нокаут TRAC имеет сниженную аллореактивность по отношению к мононуклеарным клеткам периферической крови в анализе реакции смешанных лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR) по сравнению с популяцией Т-клеток без указанного нокаута TRAC.

18. Популяция Т-клеток по п.16, отличающаяся тем, что указанная сниженная аллореактивность включает сниженную экспрессию или сниженную апрегуляцию CD25 в указанной популяции Т-клеток.

19. Популяция Т-клеток по п.16, отличающаяся тем, что указанная сниженная аллореактивность включает сниженную экспрессию или сниженную апрегуляцию провоспалительного или эффекторного белка.

20. Популяция Т-клеток по п. 19, отличающаяся тем, что указанный провоспалительный или эффекторный белок выбирается из группы, состоящей из IFN-g, TNF- α , перфорина, гранзима В и их комбинаций.

21. Популяция Т-клеток по п.16, отличающаяся тем, что указанная сниженная аллореактивность включает в себя сниженную пролиферацию/экспансию указанных мононуклеарных клеток периферической крови.

22. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-21, отличающаяся тем, что указанный нокаут TRAC не имеет аллореактивности или имеет сниженную аллореактивность в модели РТПХ (GVHD) *in vivo*.

23. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-22, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CD45RA, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

24. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-23, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CD27, чем популяция Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови.

25. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-24, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CCR7, чем популяция Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови.

26. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-25, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CD127, чем популяция Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови.

27. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-26, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет более низкий процент клеток, экспрессирующих CD57, чем популяция Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови.

28. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-27, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих CD62L, чем популяция Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови.

29. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-28, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет более низкий процент клеток, экспрессирующих CD25, чем популяция Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови.

30. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-29, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет больший процент клеток, экспрессирующих Lag-3+, чем популяция Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови.

31. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-30, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток имеет более низкий процент клеток, экспрессирующих Tim-3, чем популяция Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови.

32. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-31, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток демонстрирует более эффективное уничтожение линии раковых клеток *in vitro*, чем популяция Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови.

33. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-32, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество перфорина при заражении *in vitro* против линии раковых клеток, чем популяция Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови.

34. Популяция Т-клеток по любому из пп. 1-33, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество GM-CSF при заражении *in vitro* против линии раковых клеток, чем популяция Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови.

35. Популяция Т-клеток по любому из пп. 1-34, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество TNF- α при заражении *in vitro* против линии раковых клеток, чем популяция Т-клеток моноклеарных клеток периферической крови.

36. Популяция Т-клеток по любому из пп. 1-35, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество IL-2 при заражении *in vitro* против линии раковых клеток, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

37. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-36, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток экспрессирует большее количество гранзима В при заражении *in vitro* против линии раковых клеток, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

38. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-37, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток обеспечивает повышенную выживаемость в модели рака *in vivo*, по сравнению с популяцией Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

39. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-38, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток вызывает меньшую потерю массы тела в модели рака *in vivo*, чем популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

40. Популяция Т-клеток по любому из пп.1-39, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток вызывает снижение реакции «трансплантат против хозяина» РТПХ (GvHD) в модели рака *in vivo*, по сравнению с популяцией Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови.

41. Популяция Т-клеток по любому из пп.23-40, отличающаяся тем, что указанная популяция Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови также экспрессирует указанный CAR.

42. Популяция Т-клеток по п.41, отличающаяся тем, что указанный CAR введен в указанную популяцию Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови путем трансфекции.

43. Популяция Т-клеток по п.41, отличающаяся тем, что указанный CAR введен в указанную популяцию Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови путем вирусной трансдукции.

44. Популяция Т-клеток по п.43, отличающаяся тем, что указанный CAR введен в указанную популяцию Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови путем вирусной трансдукции ретровирусным вектором.

45. Популяция Т-клеток по п.43, отличающаяся тем, что указанный CAR введен в указанную популяцию Т-клеток мононуклеарных клеток периферической крови путем трансдукции вируса лентивирусным вектором.

46. Способ лечения рака или его симптома у нуждающегося в этом пациента, включающий стадию введения пациенту количества популяции Т-клеток по любому из пп. 1-38, эффективной для облегчения течения рака или его симптома у пациента.

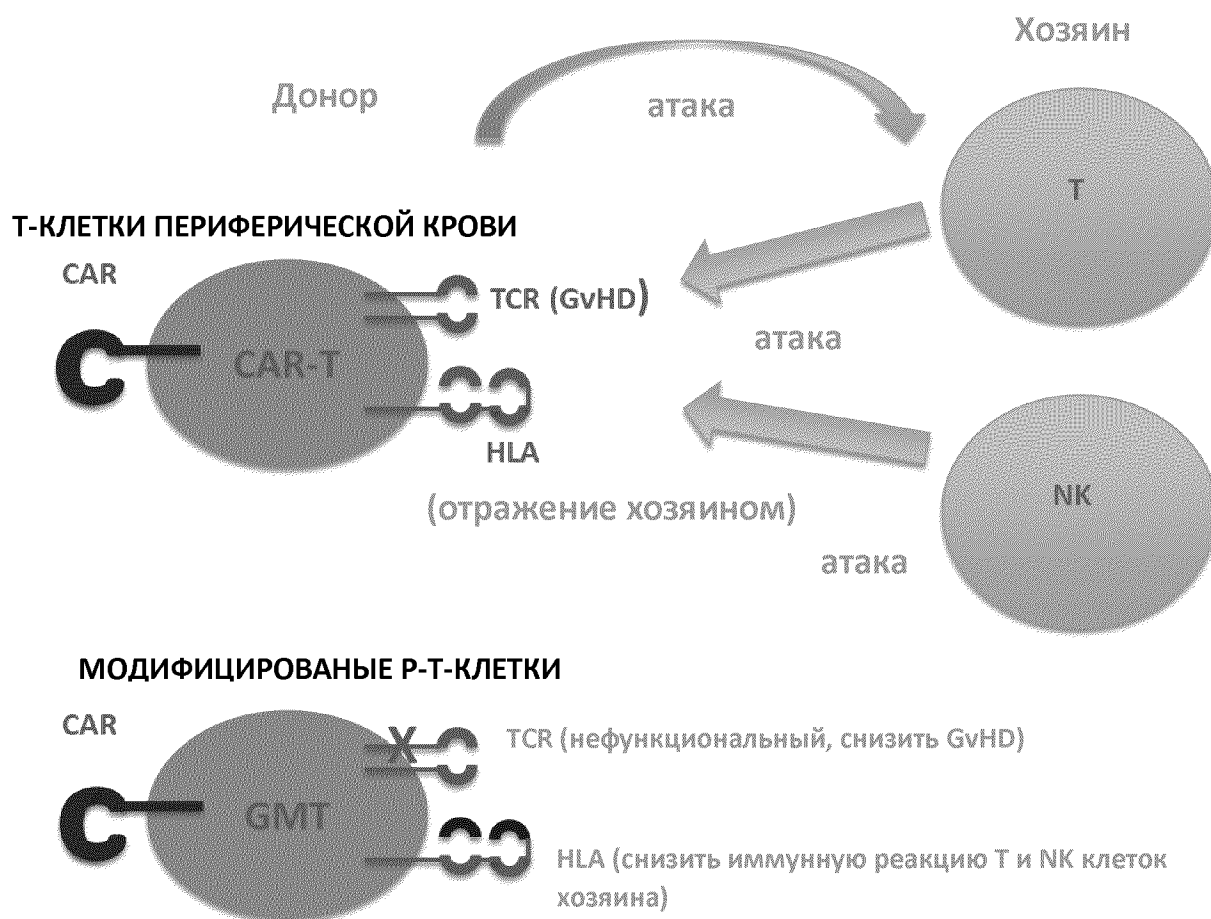
47. Способ по п.46, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой гемобластоз.

48. Способ по п.47, отличающийся тем, что указанный гемобластоз представляет собой злокачественные В-клеточные новообразования.

49. Способ по любому из пп.46-48, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой CD19+ рак.

50. Способ по любому из пп.46-49, отличающийся тем, что популяция Т-клеток является аллогенной для указанного пациента.

По доверенности

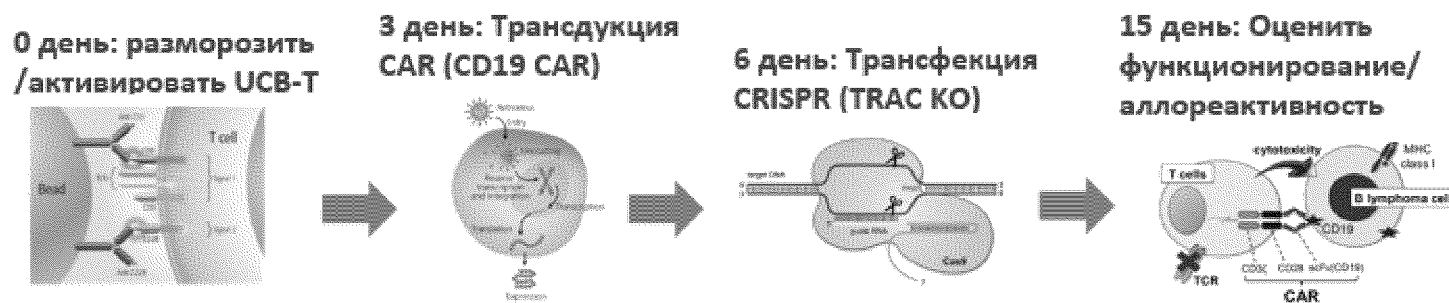


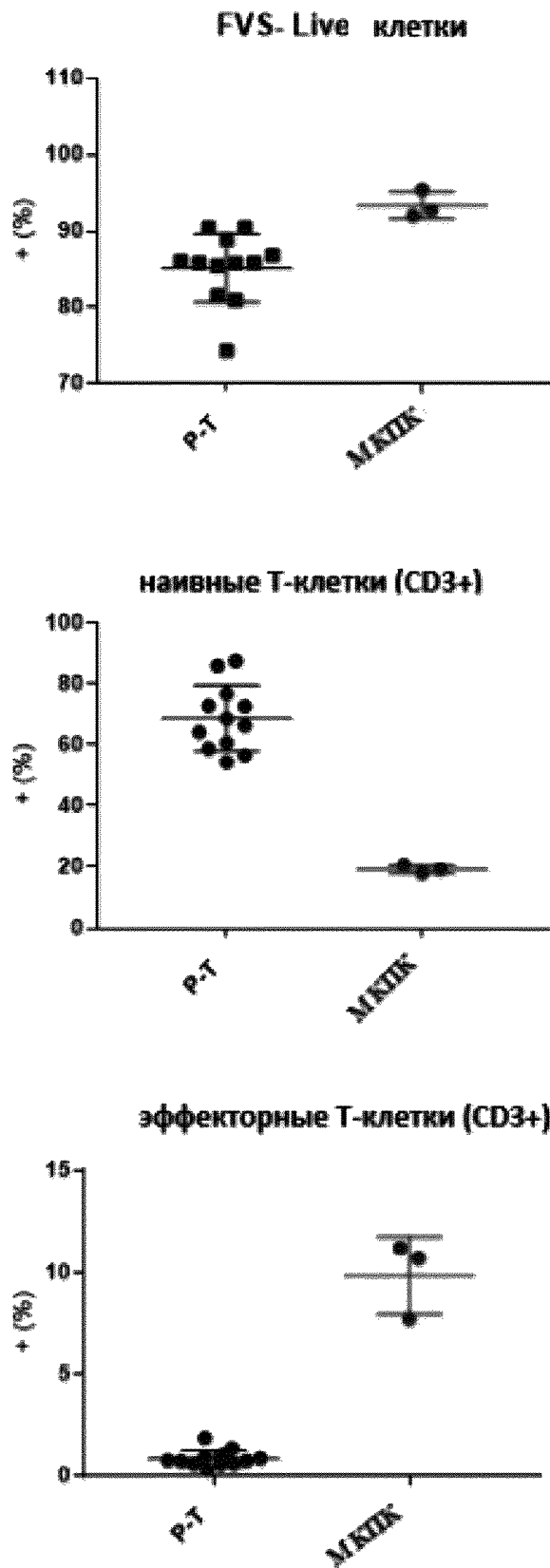
ФИГ. 1

ПРОЦЕССИНГ И ВЫДЕЛЕНИЕ Т-КЛЕТОК:

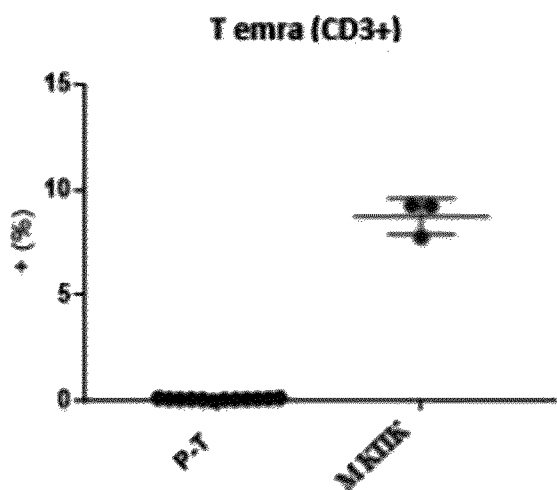
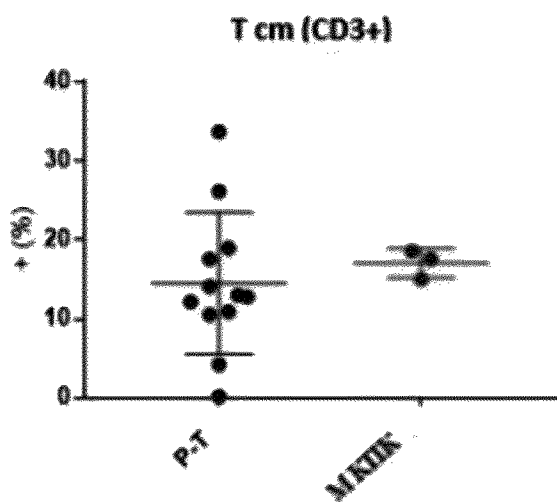
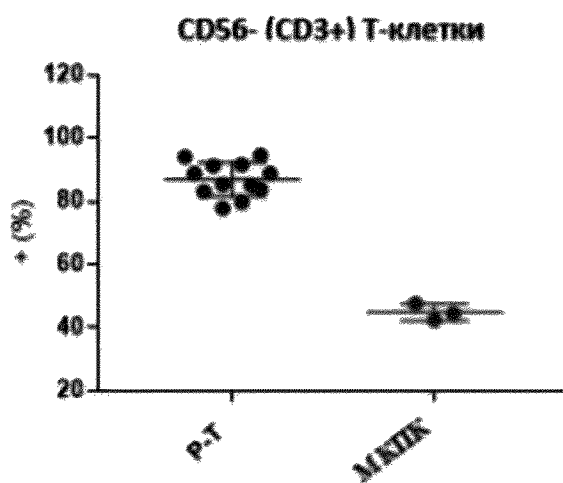


ЭКСПАНСИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ Р-Т-КЛЕТОК:



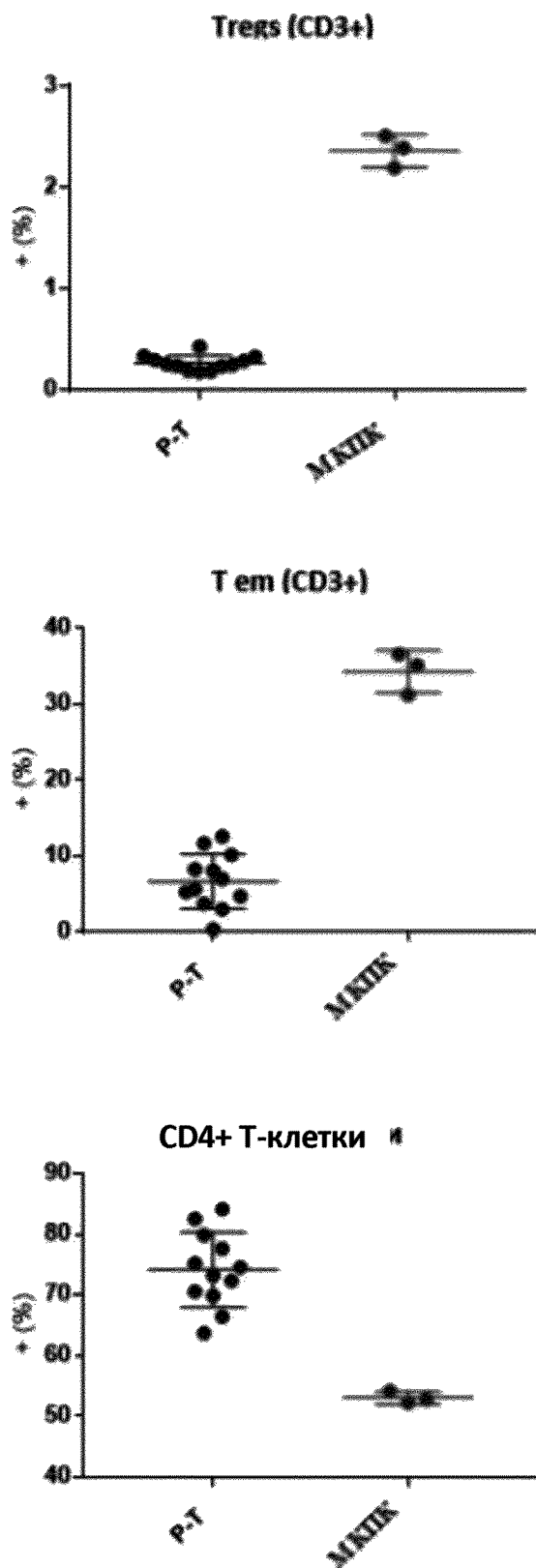


ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

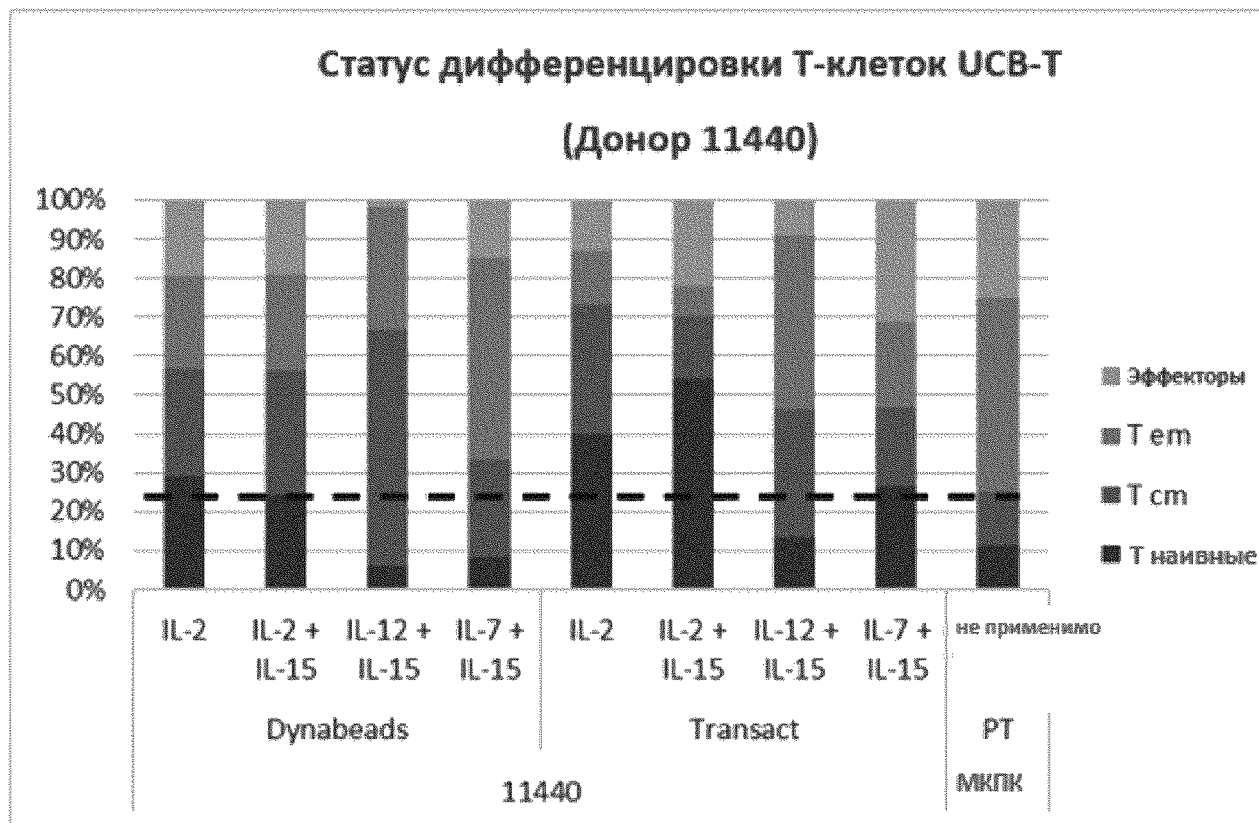
5/74

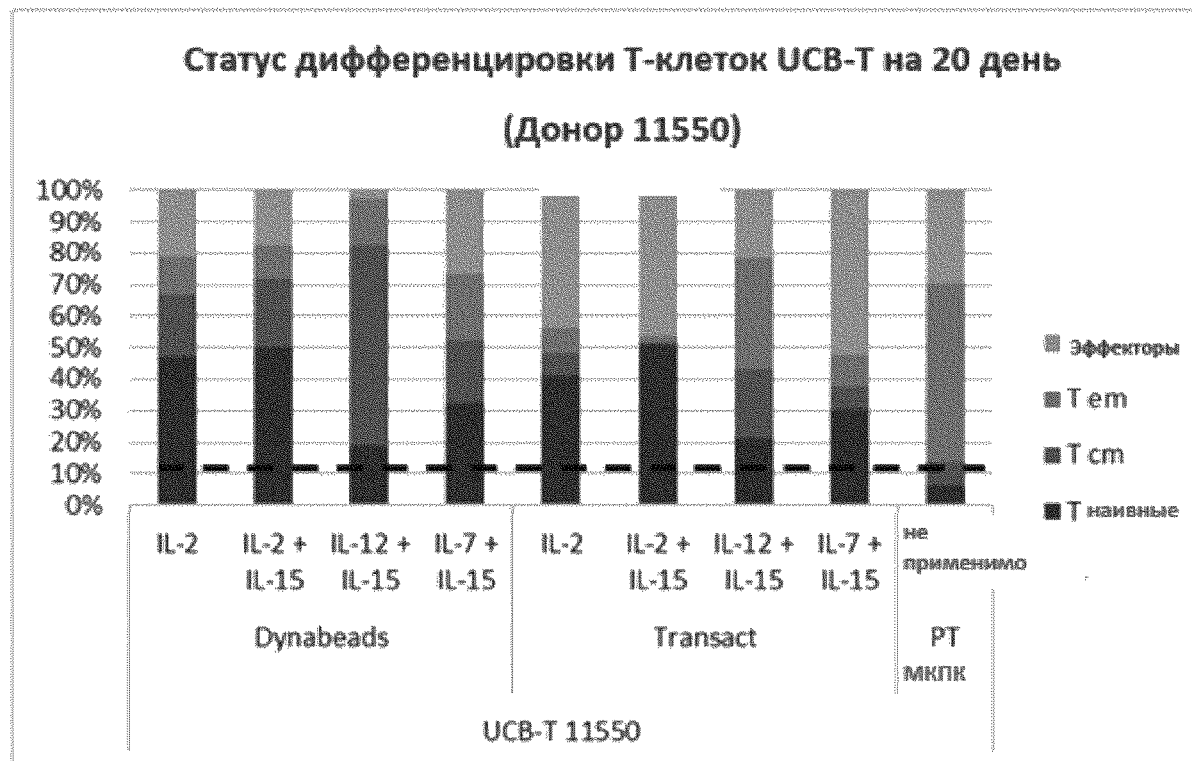


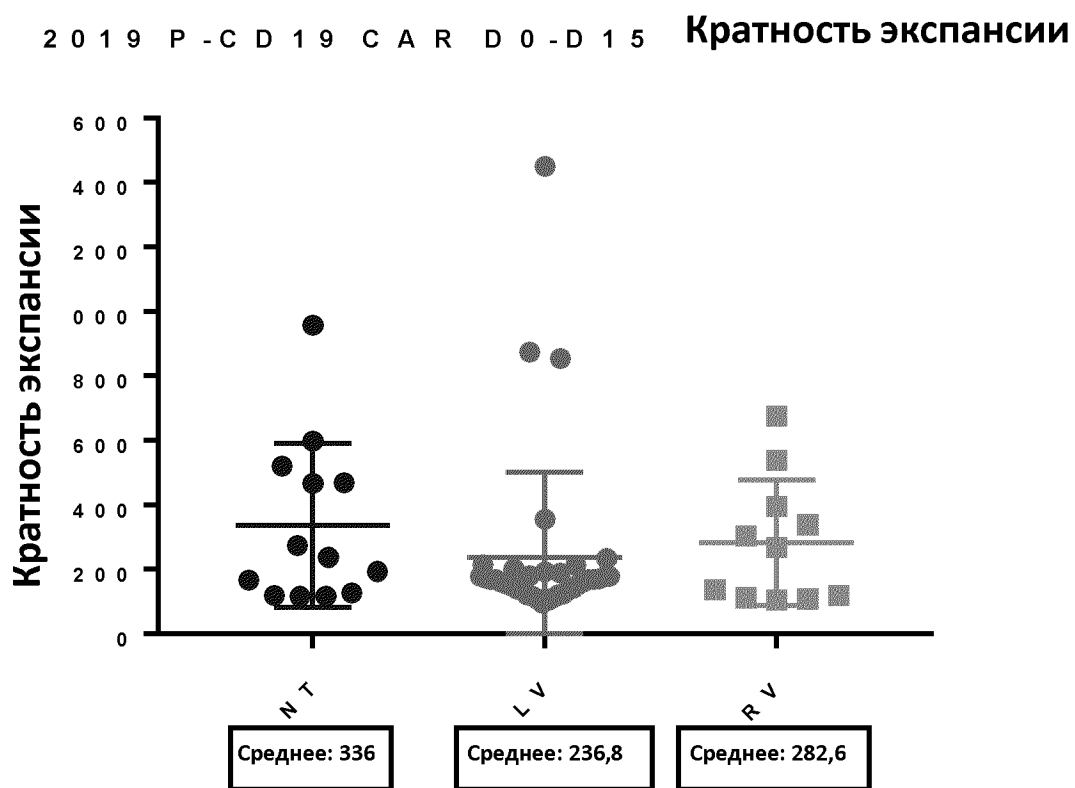
ФИГ. 3С

ФИГ. 4





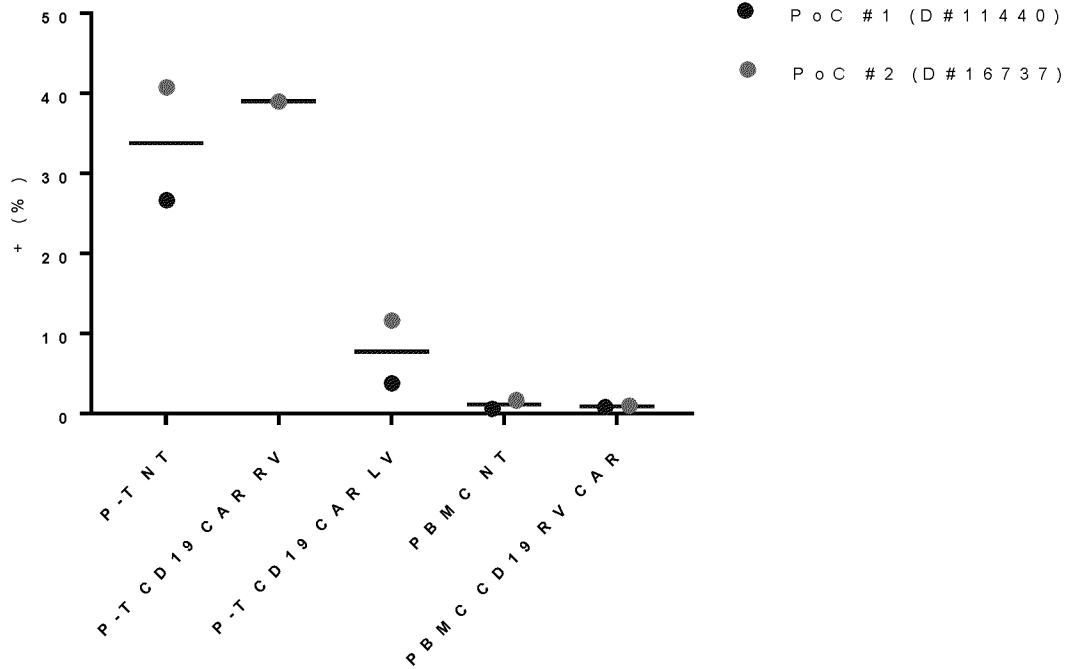




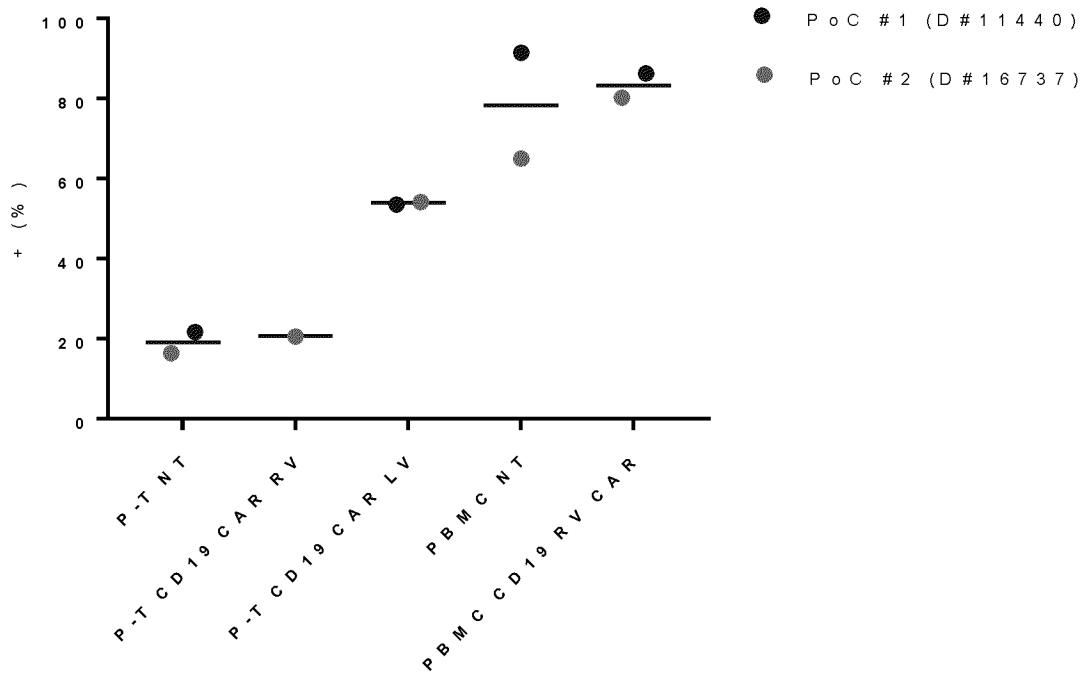
ФИГ. 6

10/74

Т наивные / s c m
(C D 4 5 R A + C C R 7 +)

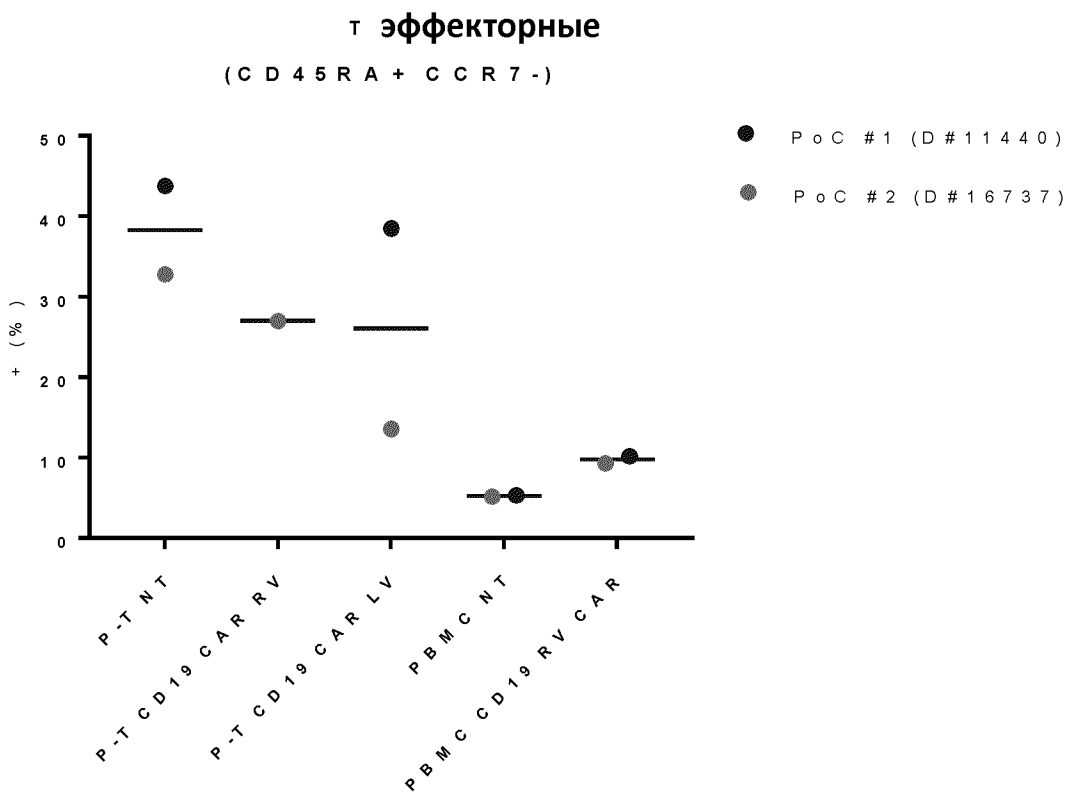
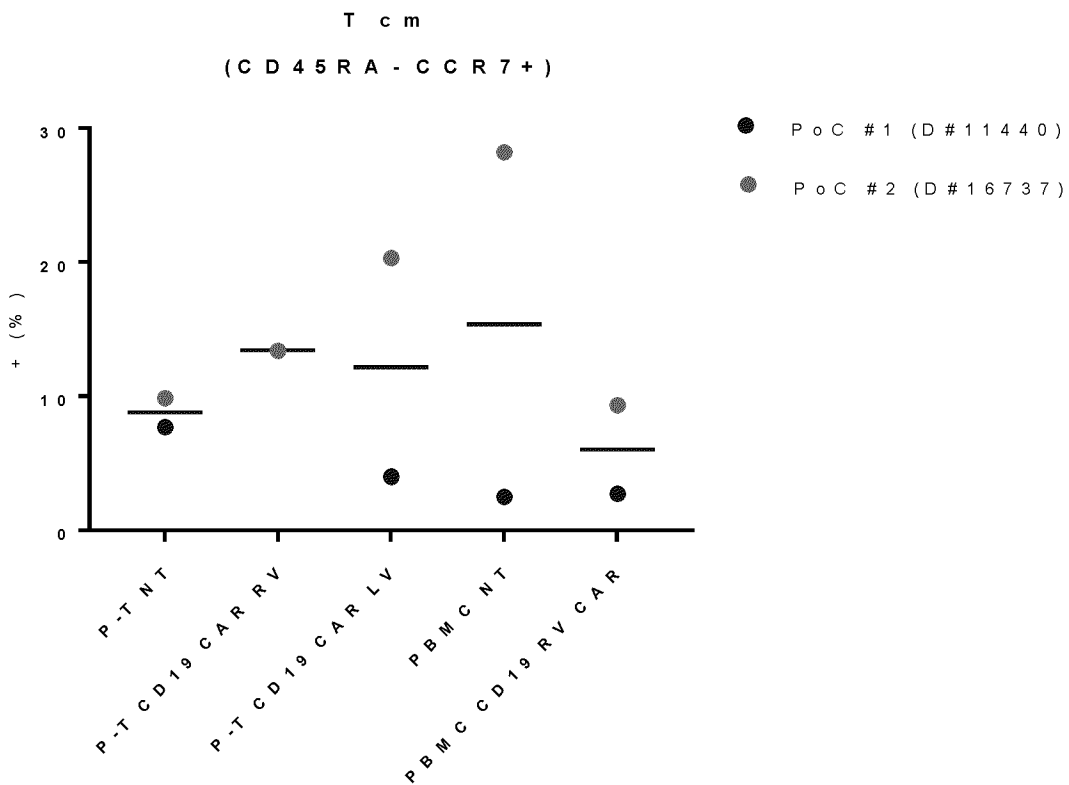


Т em
(C D 4 5 R A - C C R 7 -)



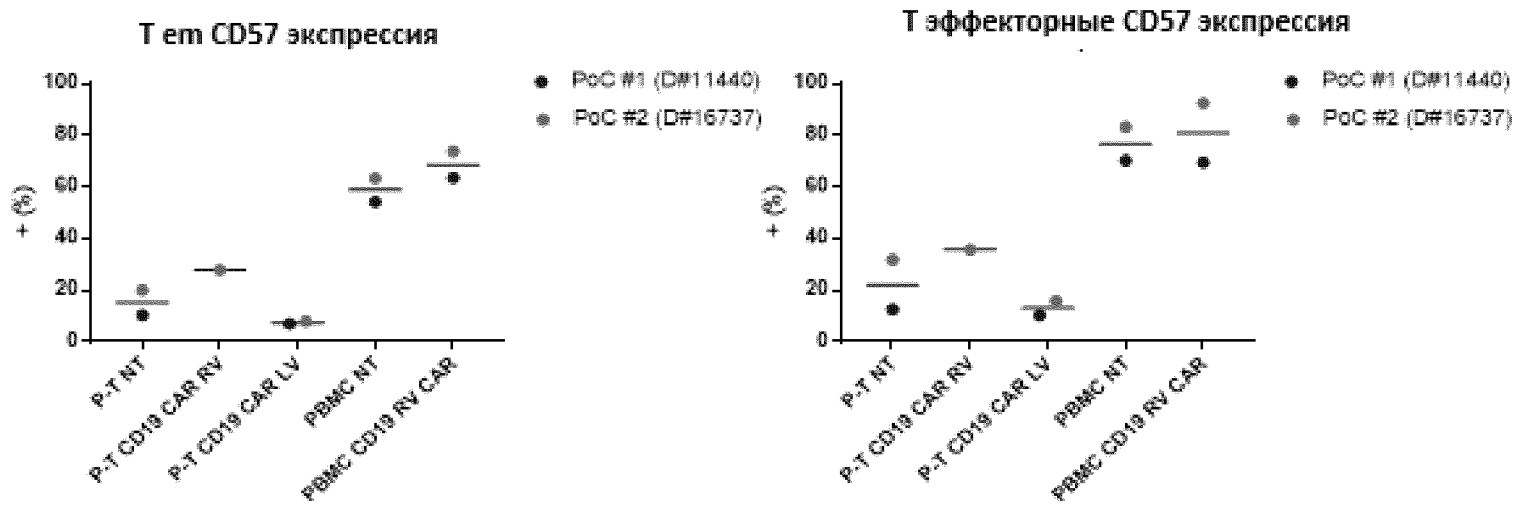
ФИГ. 7А

11/74



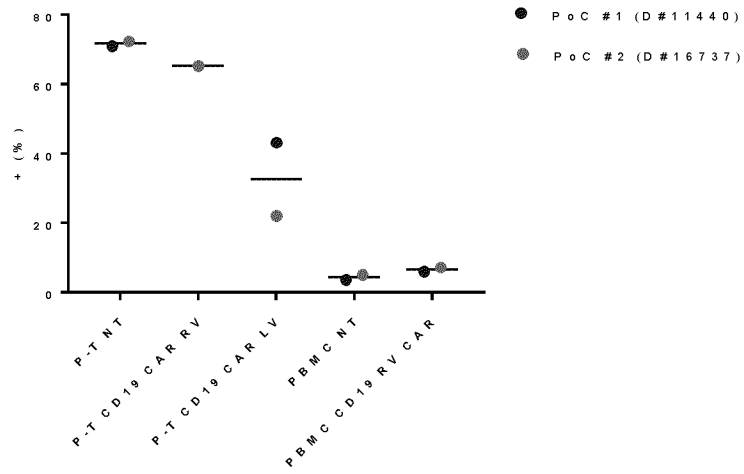
ФИГ. 7В

ФИГ. 8

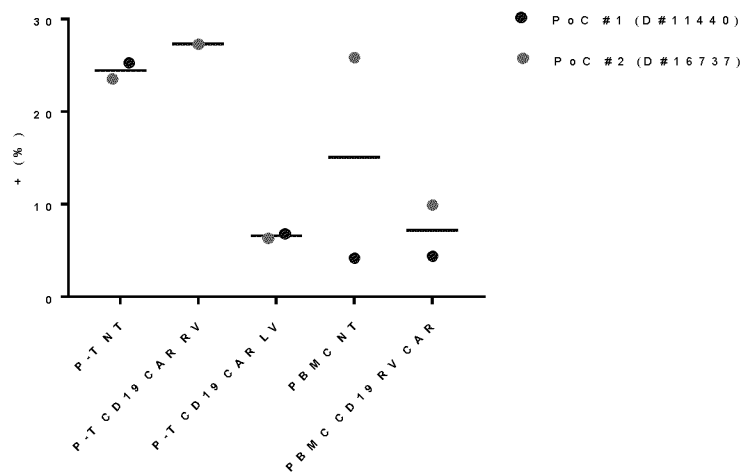


13/74

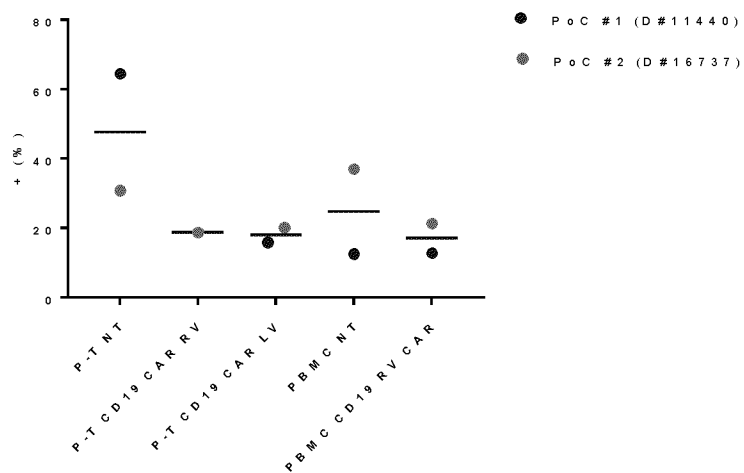
CD45RA Экспрессия



CD127 Экспрессия



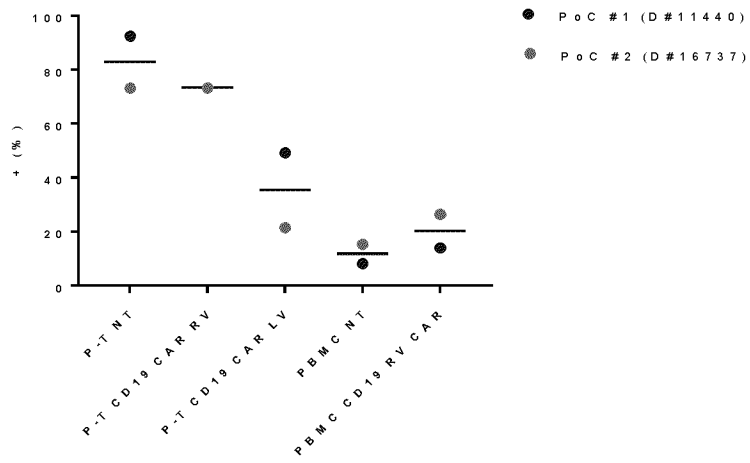
CD62L Экспрессия



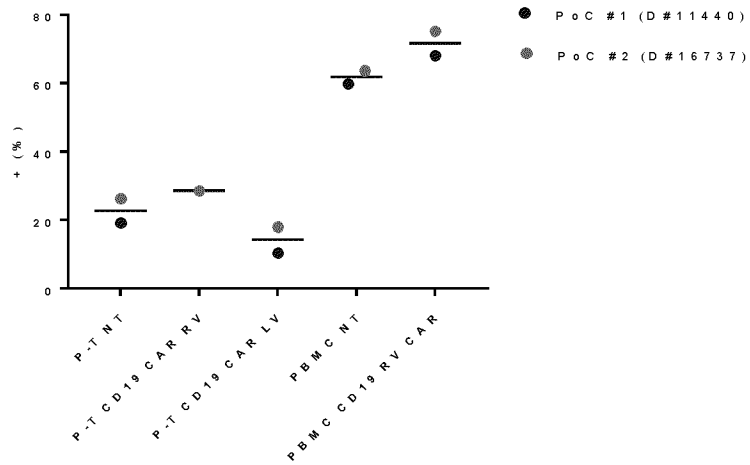
ФИГ. 9А

14/74

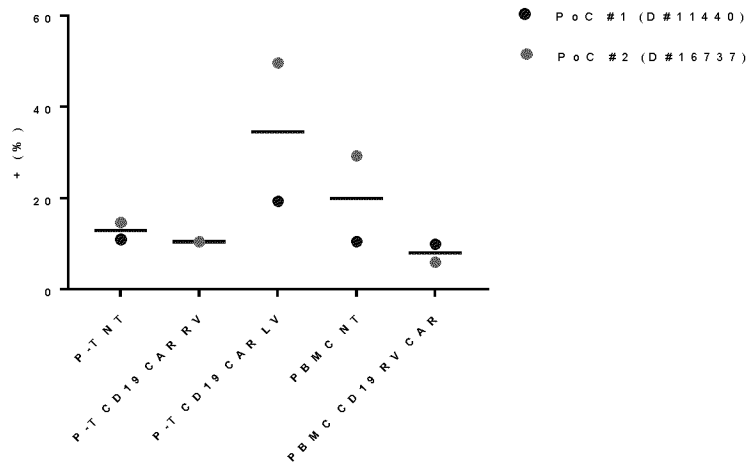
CD27 Экспрессия



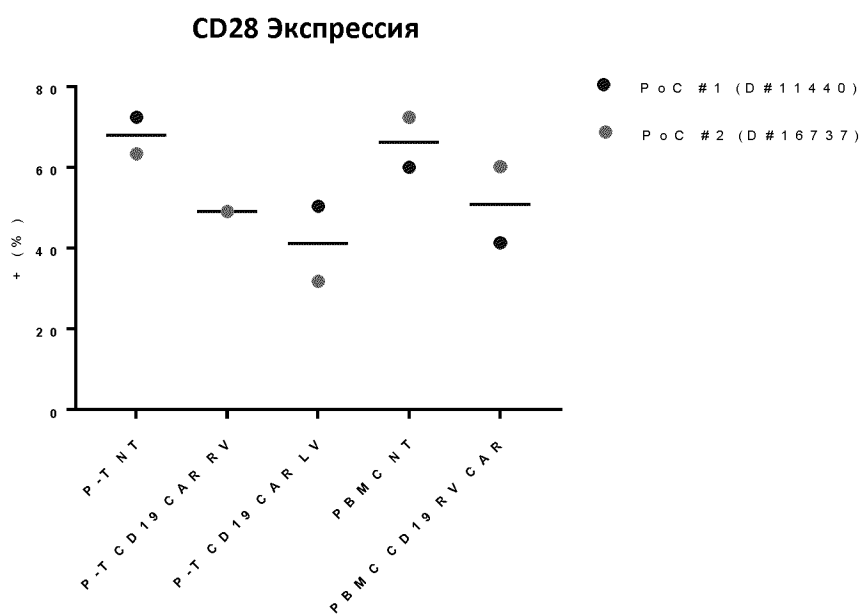
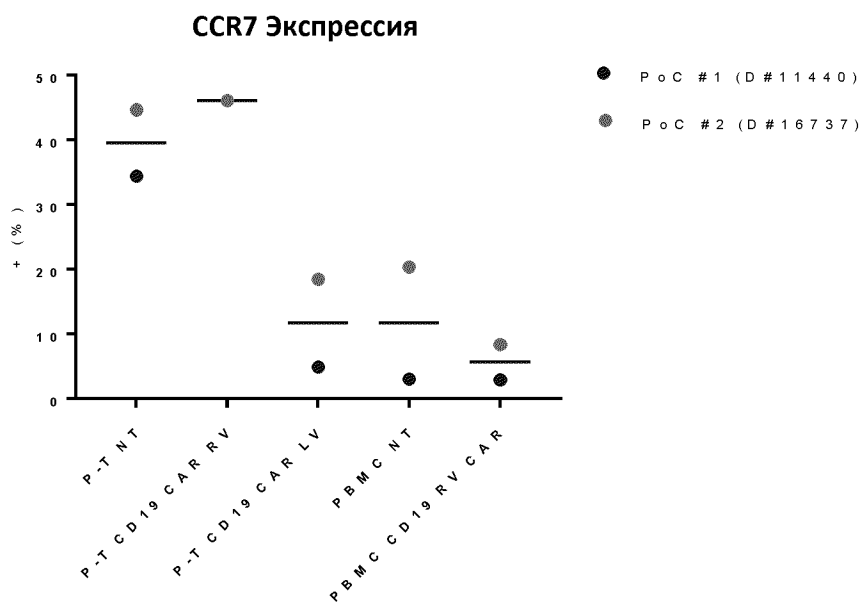
CD57 Экспрессия



CD25 Экспрессия

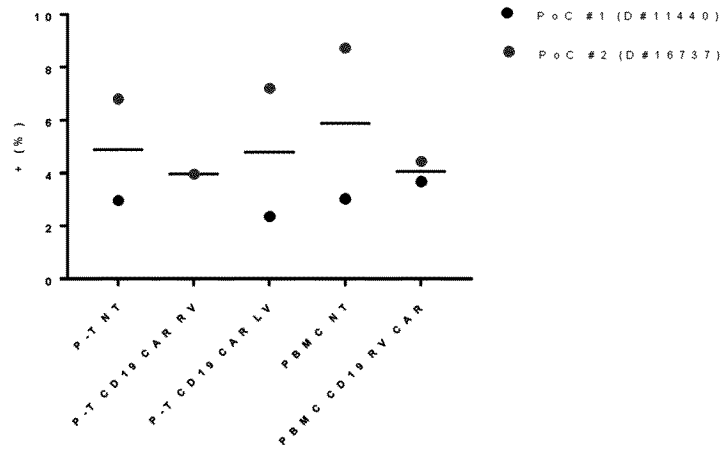


ФИГ. 9В

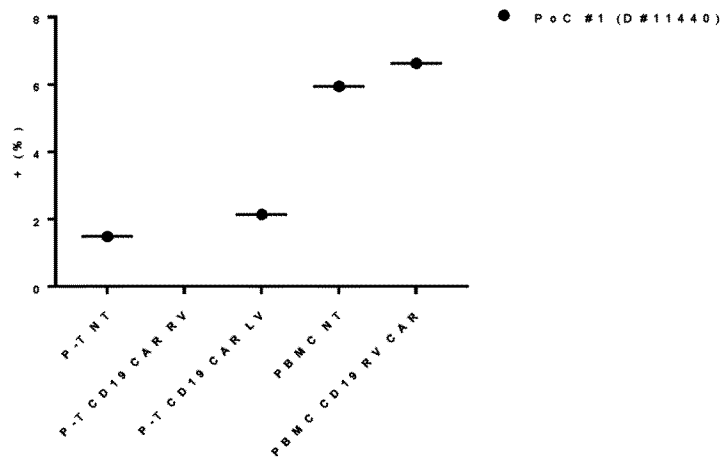


ФИГ. 9С

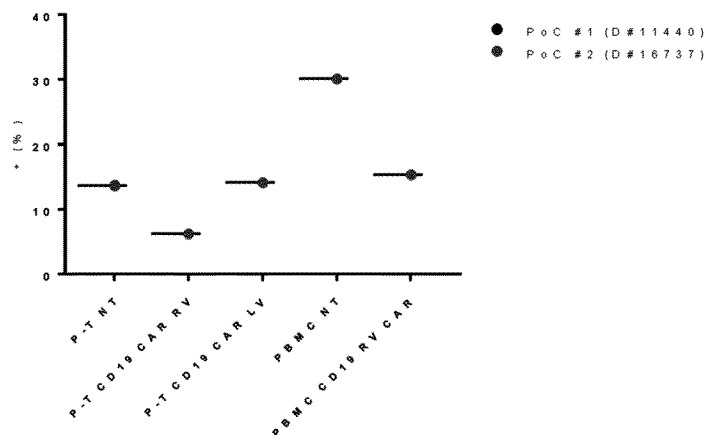
PD-1 Экспрессия



Lag-3+ Экспрессия

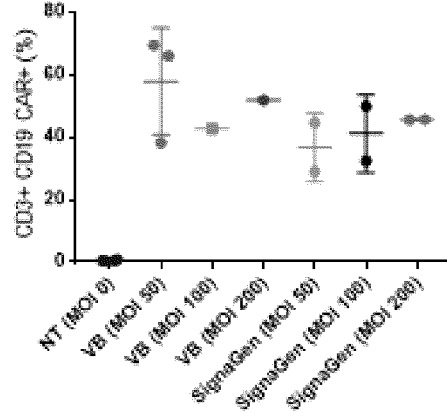


Tim-3 Экспрессия

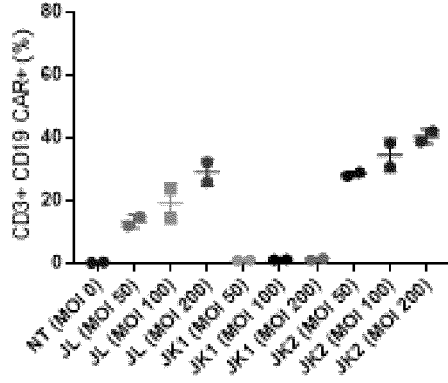


ФИГ. 10

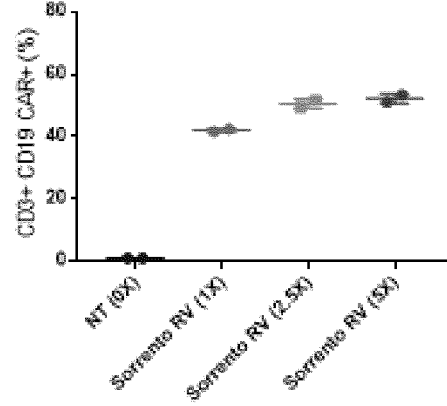
P-CD19 LV M μ scFv CD19 CAR Экспрессия

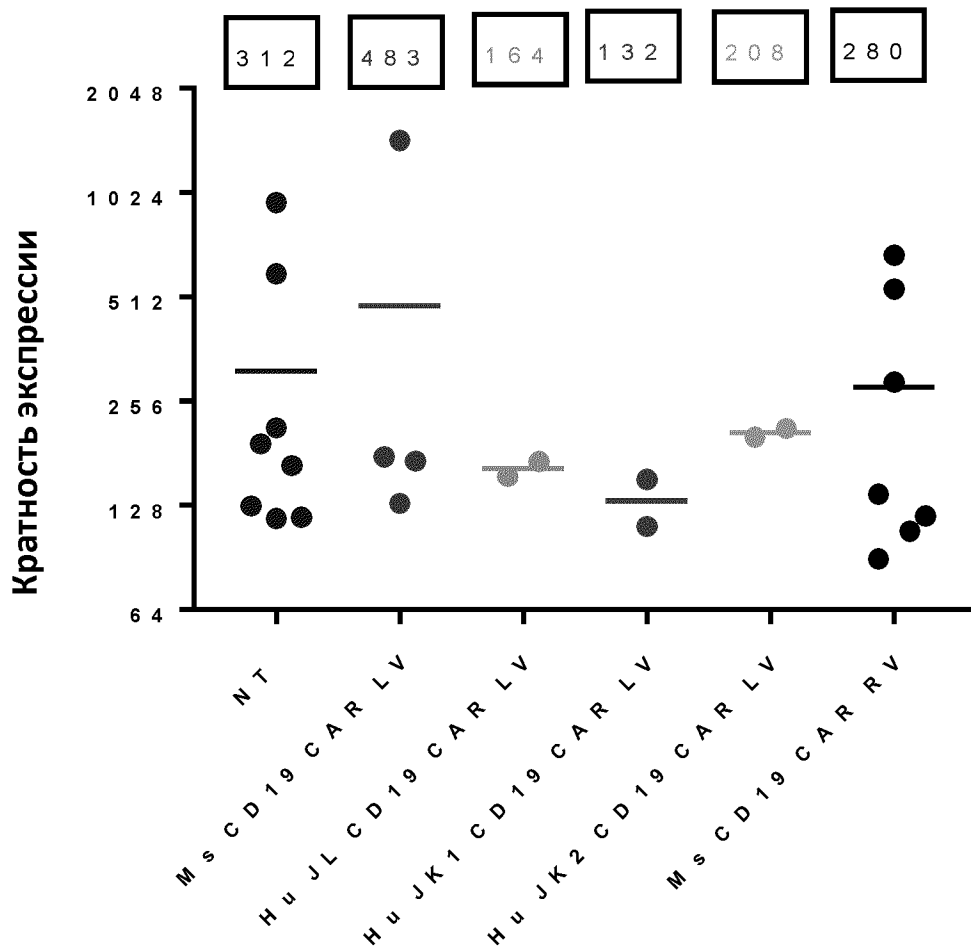


P-CD19 LV Hu scFv CD19 CAR Экспрессия

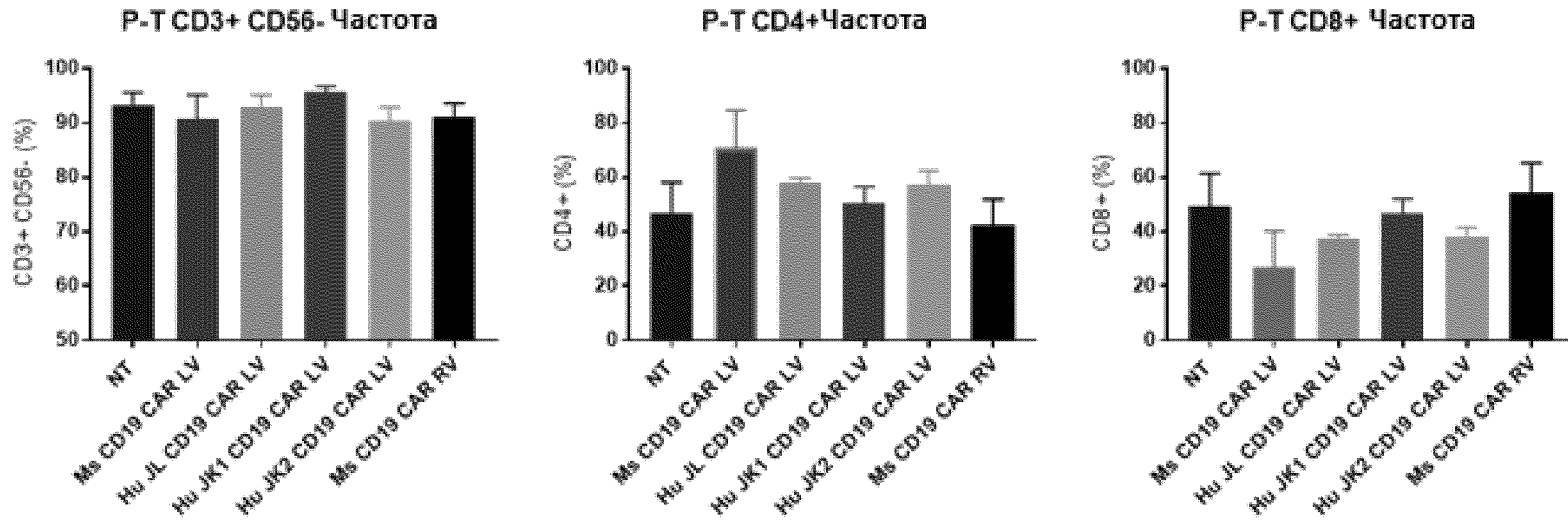


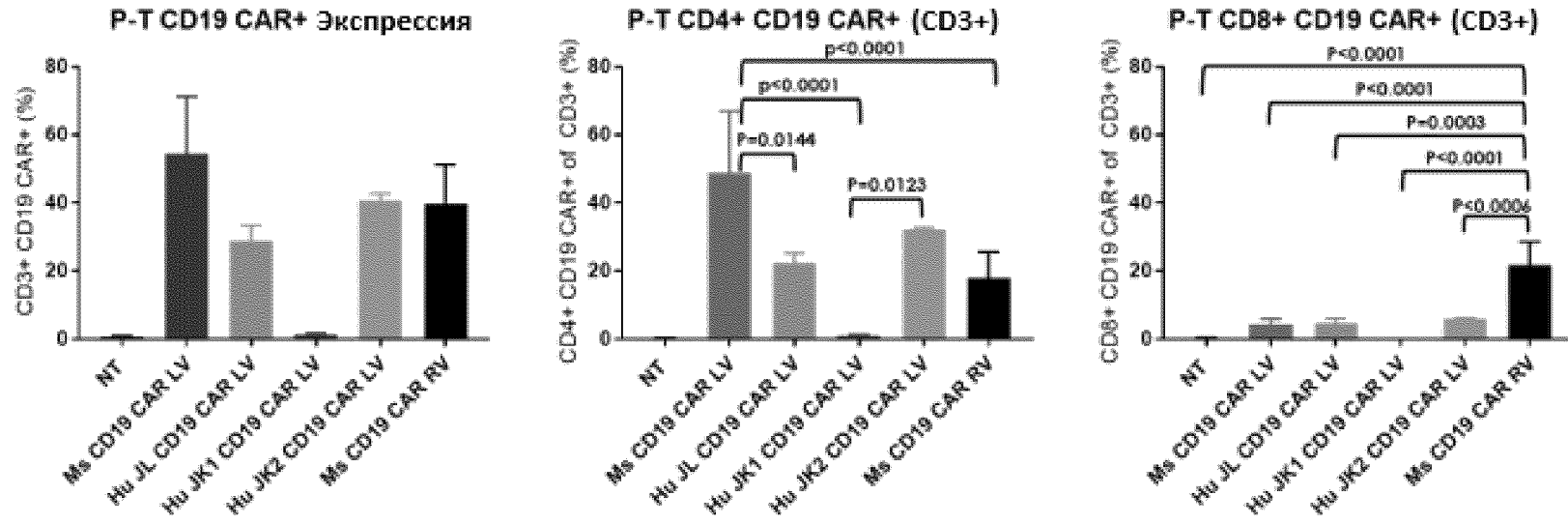
P-CD19 RV M μ scFv CD19 CAR Экспрессия



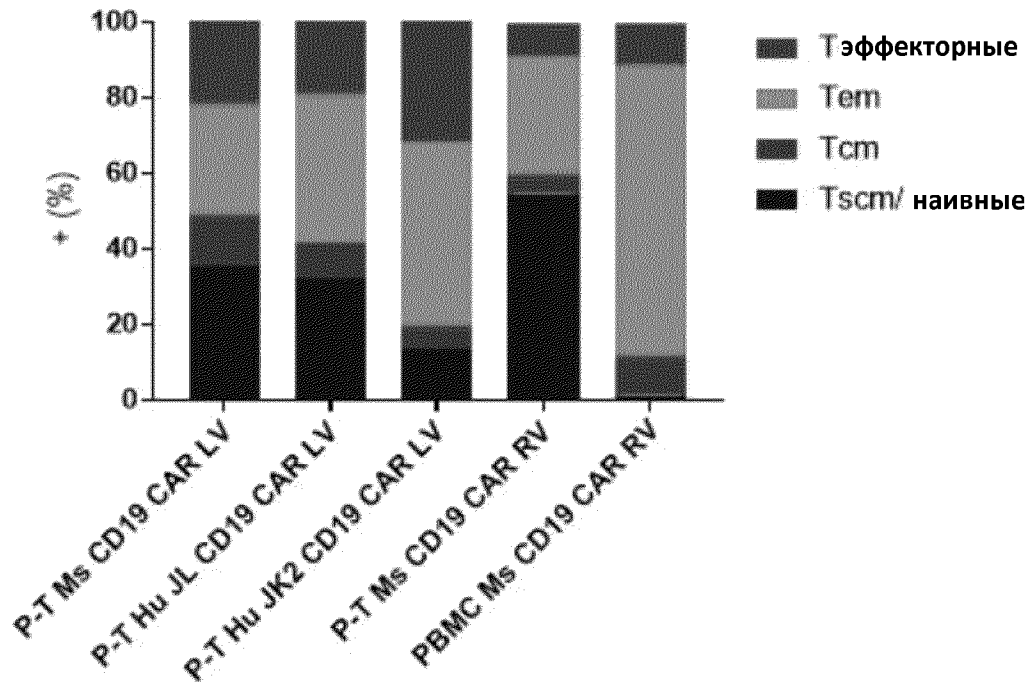


ФИГ. 11

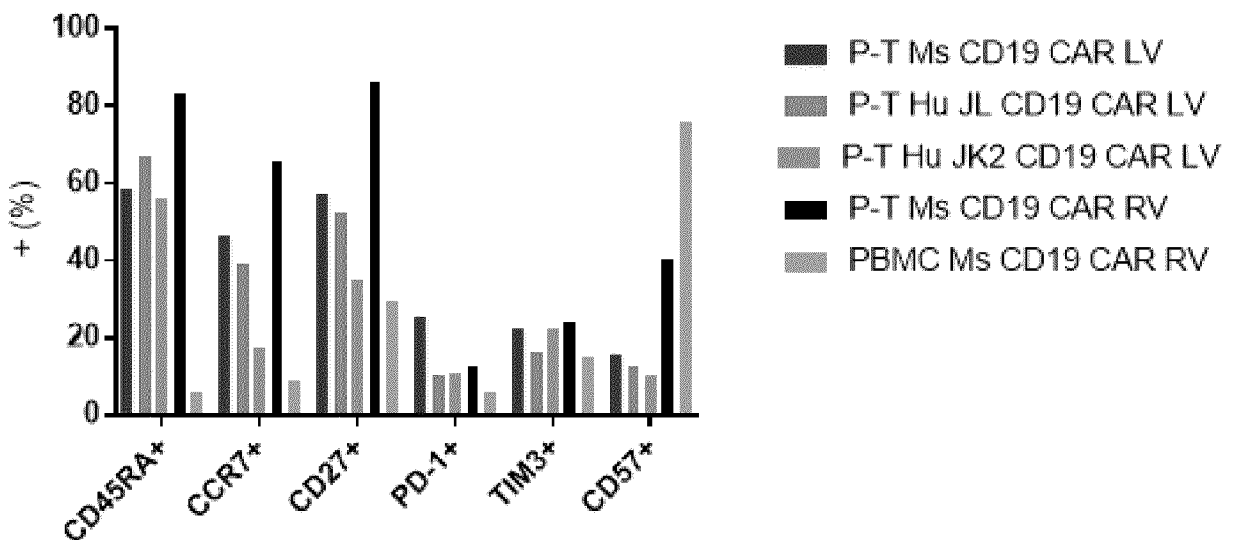




Статус дифференцировки CD19 CAR+ T-клеток

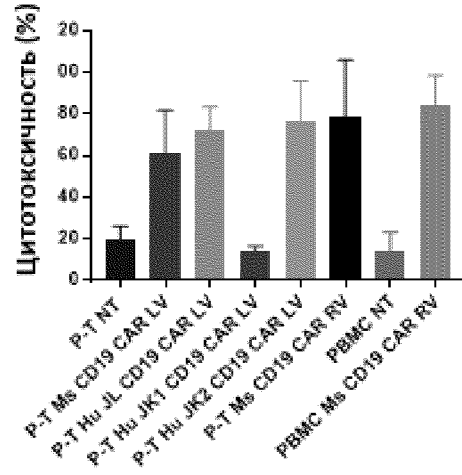


Экспрессия маркера CD19 CAR+

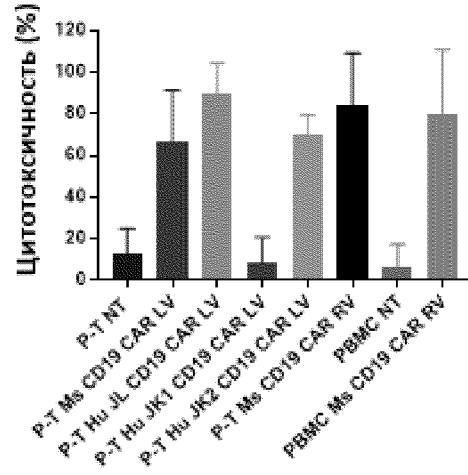


ФИГ. 14

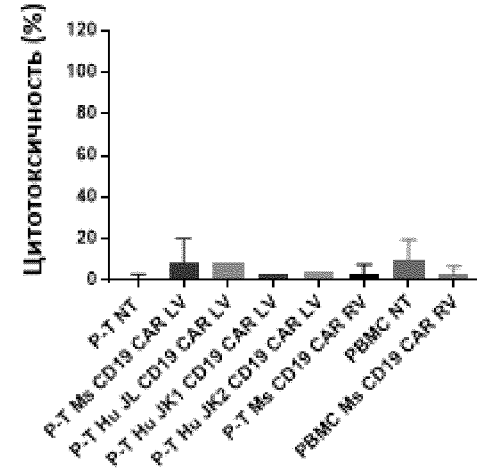
ACEA 24-ч Цитотоксичность vs. Daudi (E:T 2,5:1)

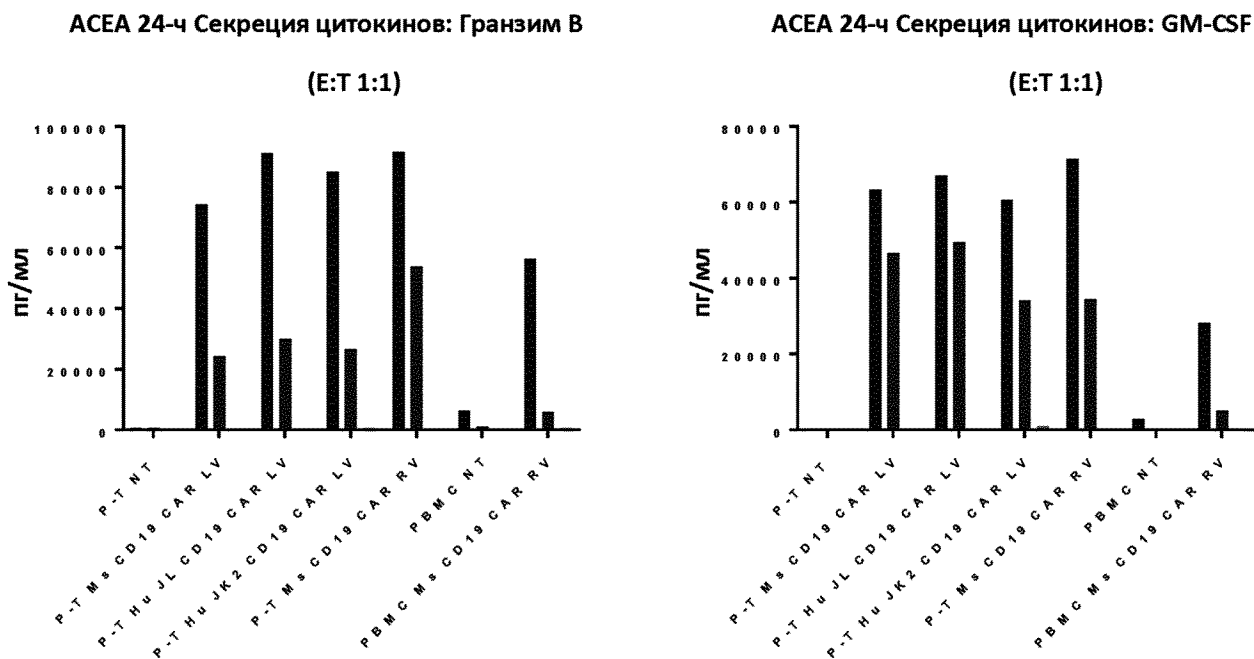
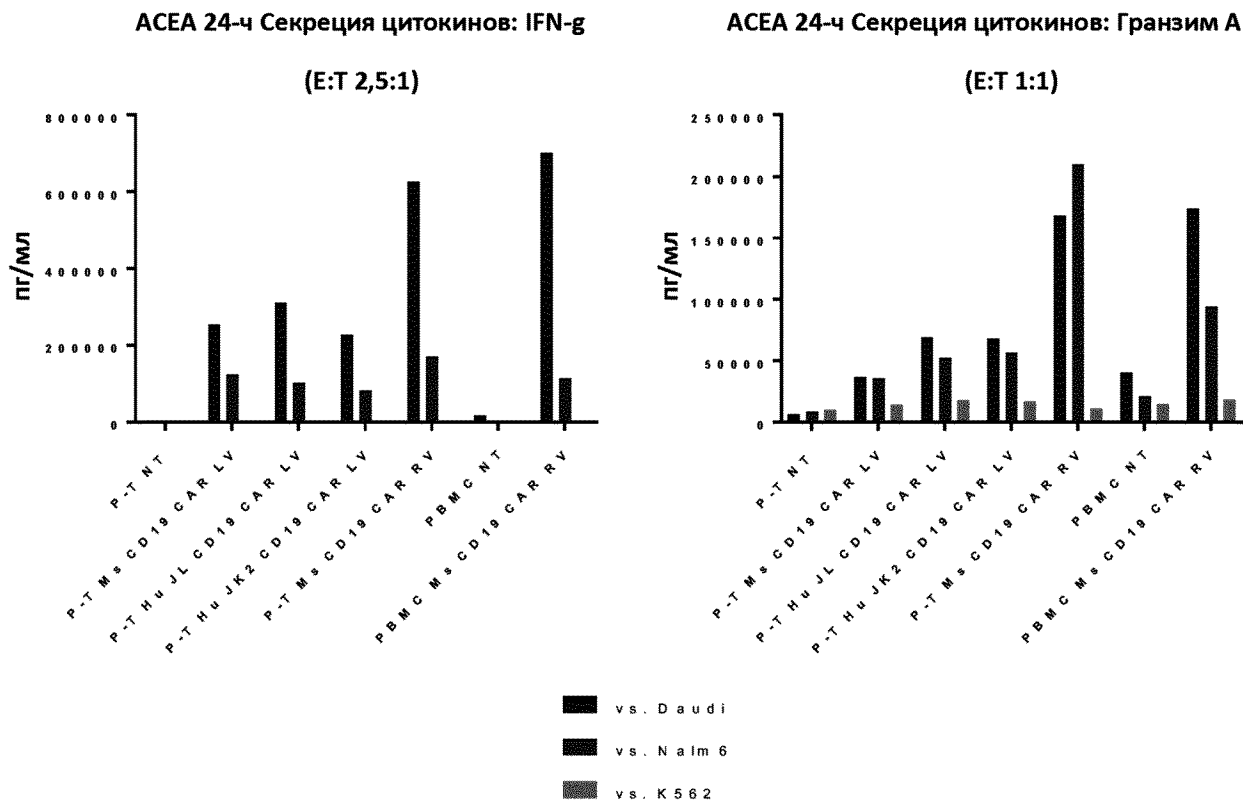


ACEA 24-ч Цитотоксичность vs. Nalm6 (E:T 2,5:1)



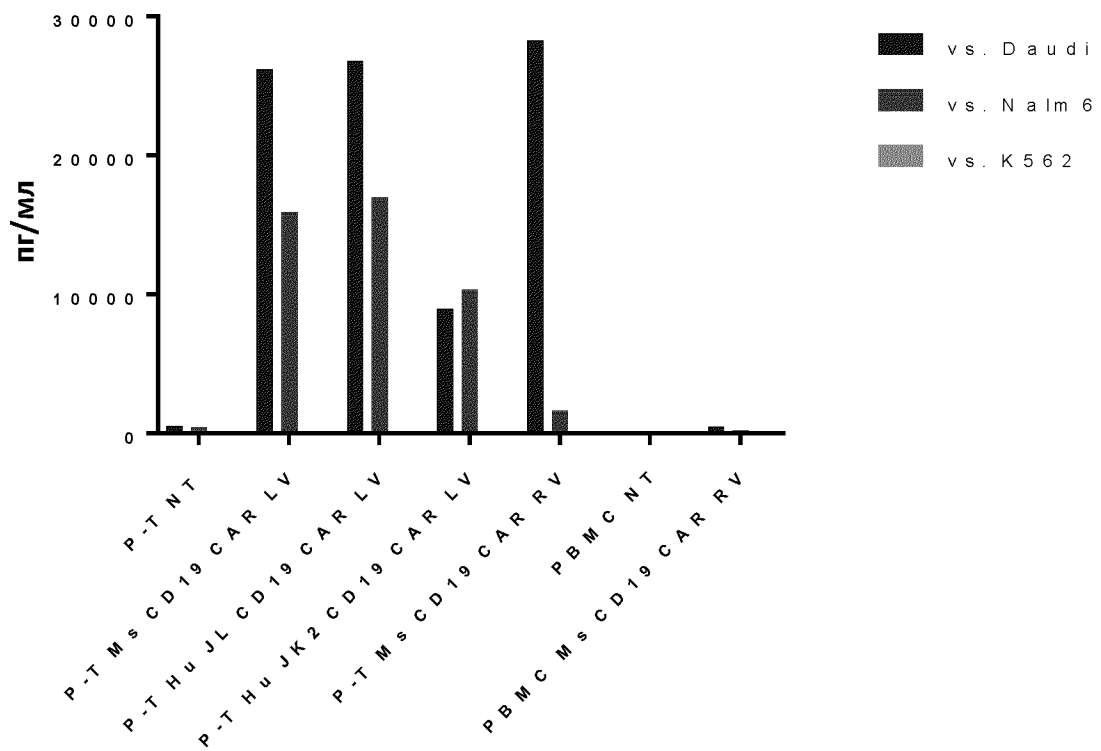
ACEA 24-ч Цитотоксичность vs. K562 (E:T 2,5:1)





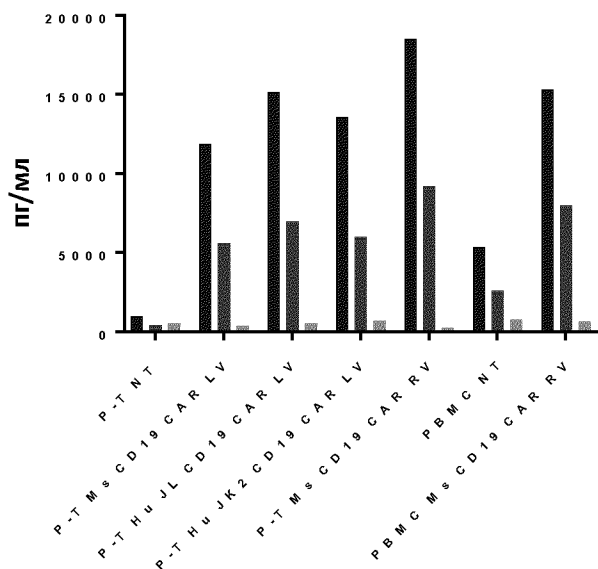
ФИГ. 16А

**АСЕА 24-ч Секреция цитокинов: IL-2
(Е:Т 1:1)**

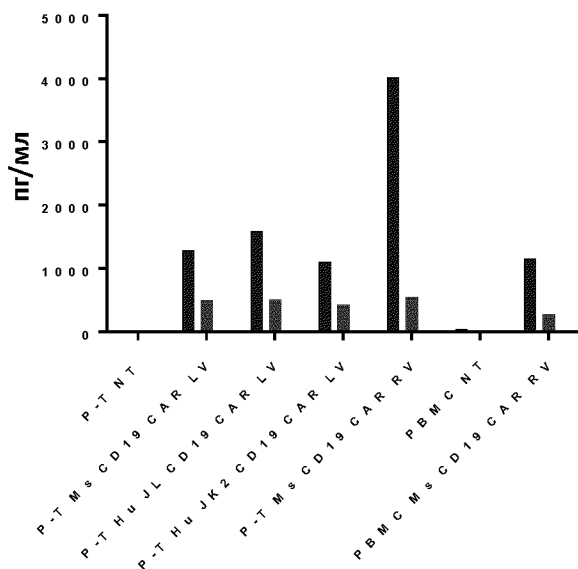


ФИГ. 16В

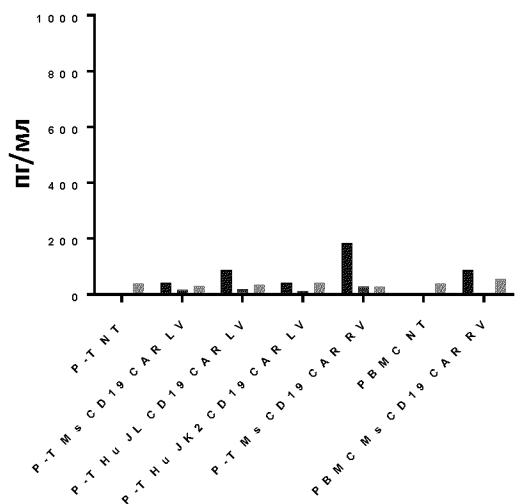
**АСЕА 24-ч Секрeция цитoкинов: Перфoрин
(E:T 1:1)**



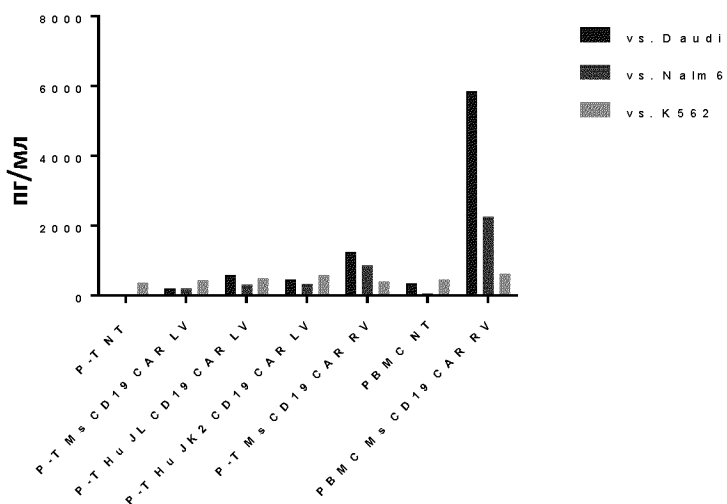
**АСЕА 24-ч Секрeция цитoкинов: TNF-α
(E:T 1:1)**



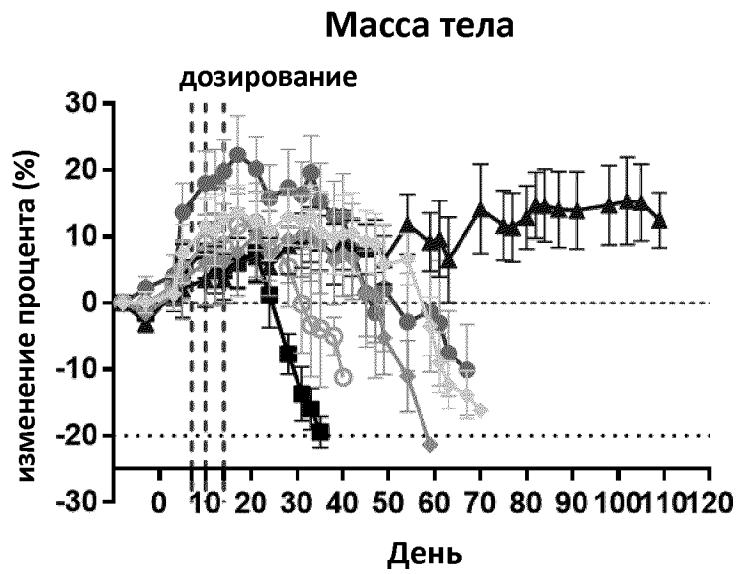
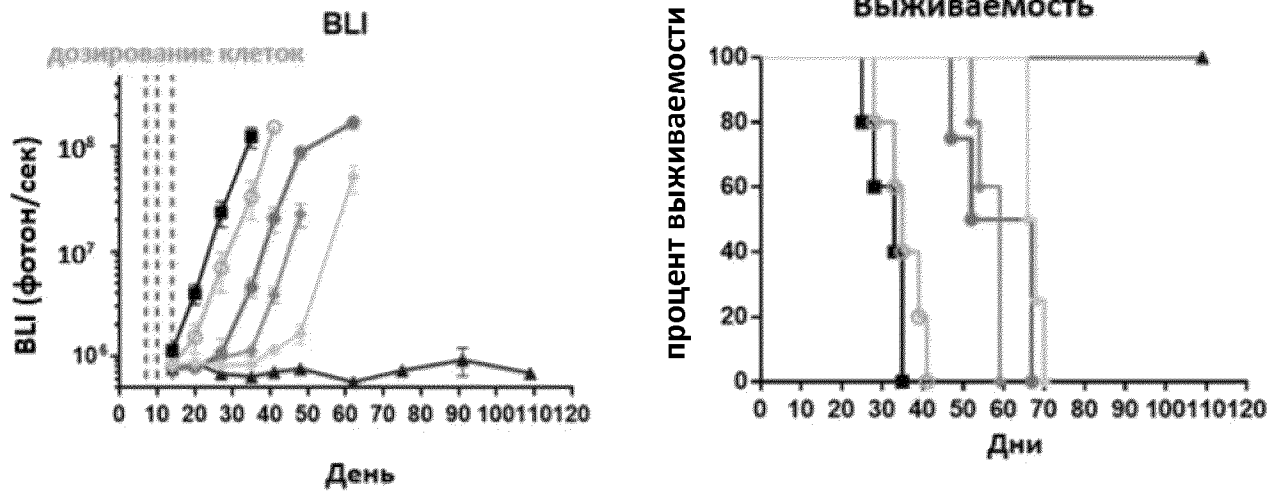
**АСЕА 24-ч Секрeция цитoкинов: IL-6
(E:T 1:1)**



**АСЕА 24-ч Секрeция цитoкинов: IL-8
(E:T 1:1)**

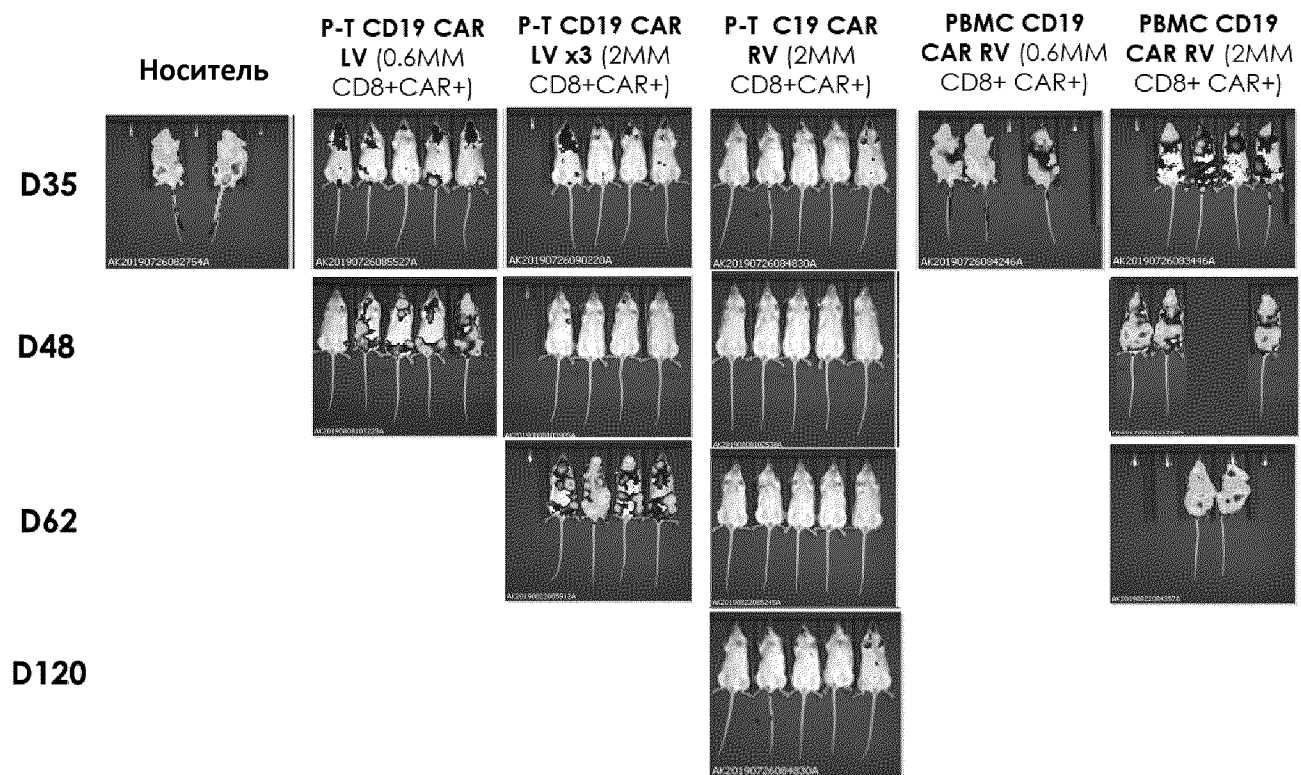


ФИГ. 16С



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

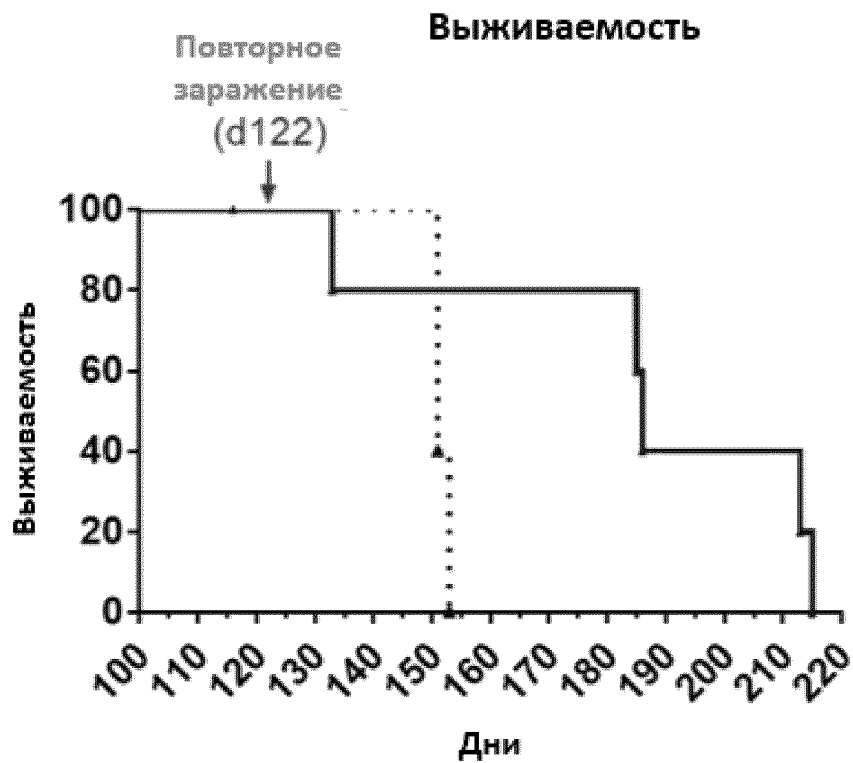
ФИГ. 17А



ФИГ. 17В

28/74

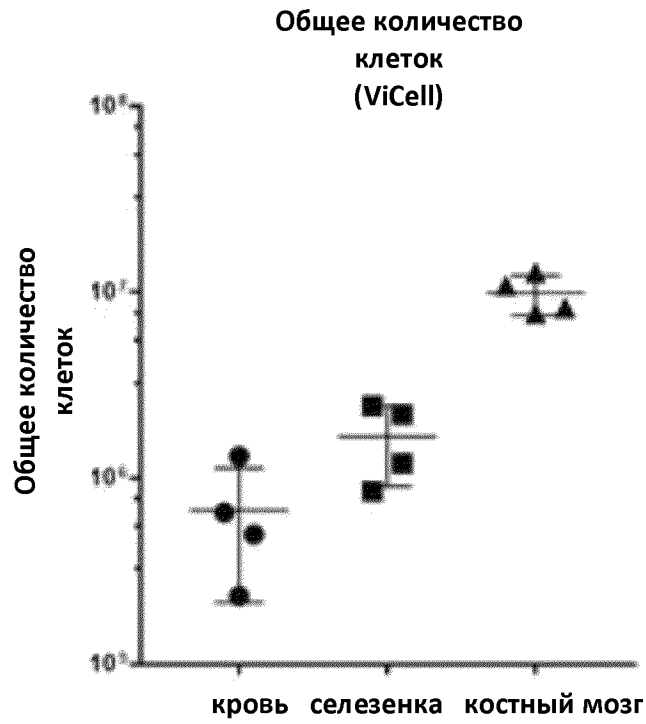
Биолюминесцентная визуализация



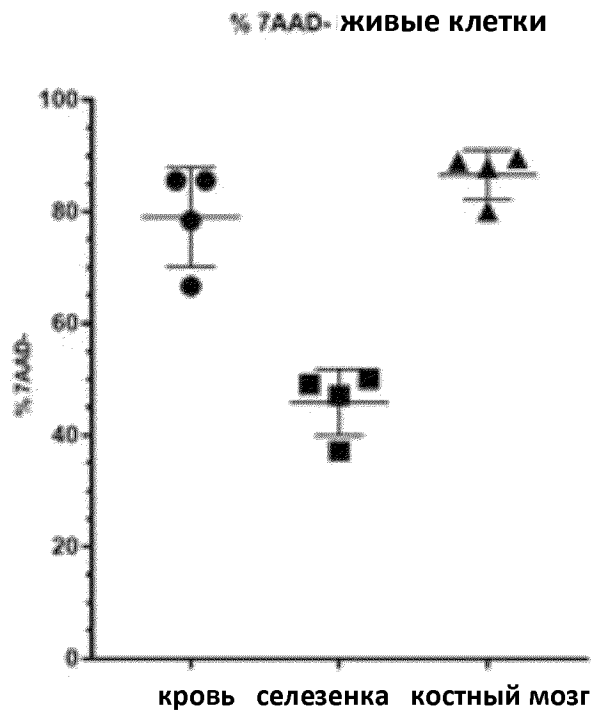
- ▲. Носитель для повторного заражения
- P-T CD19 CAR RV

ФИГ. 18

29/74



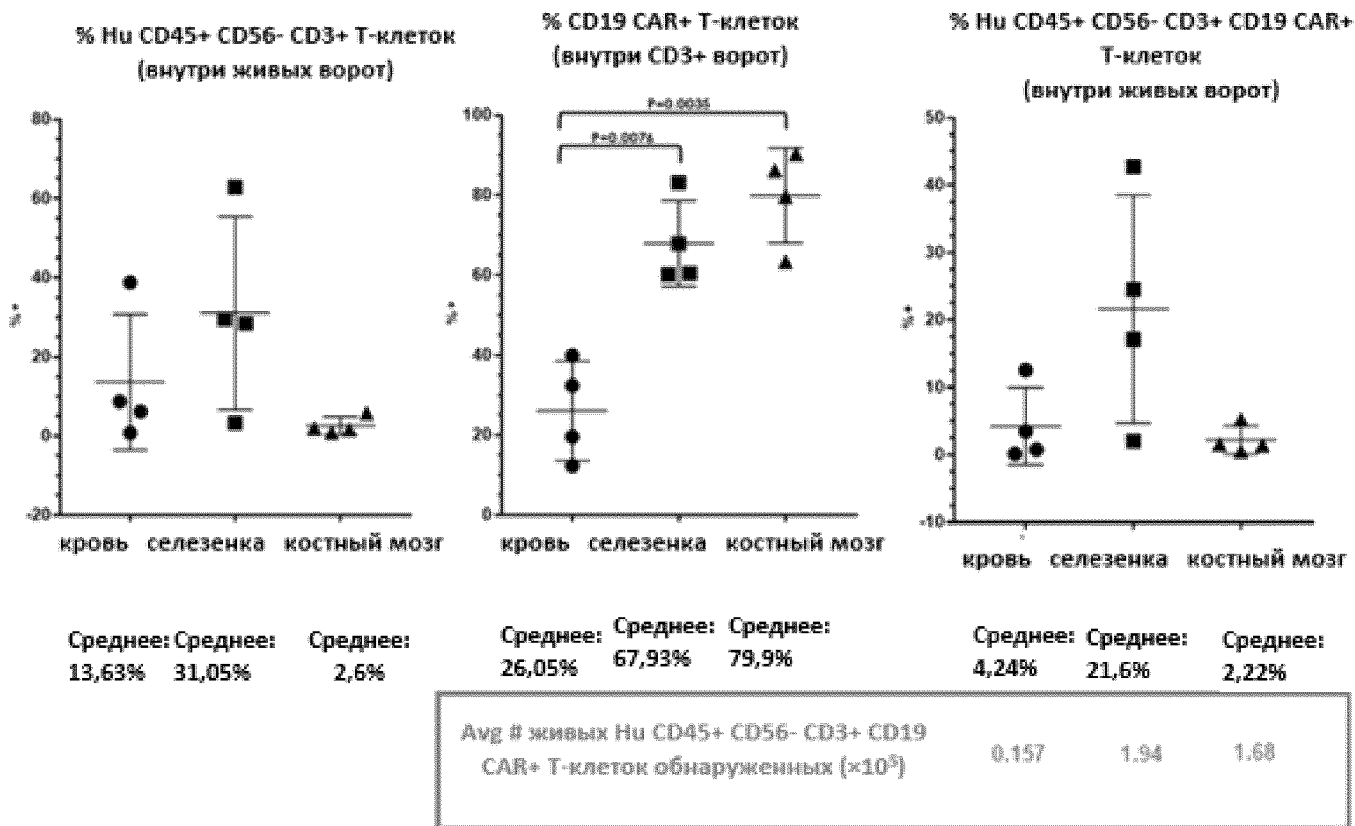
Среднее: Среднее: Среднее:
 0.673×10^6 1.675×10^6 9.905×10^6



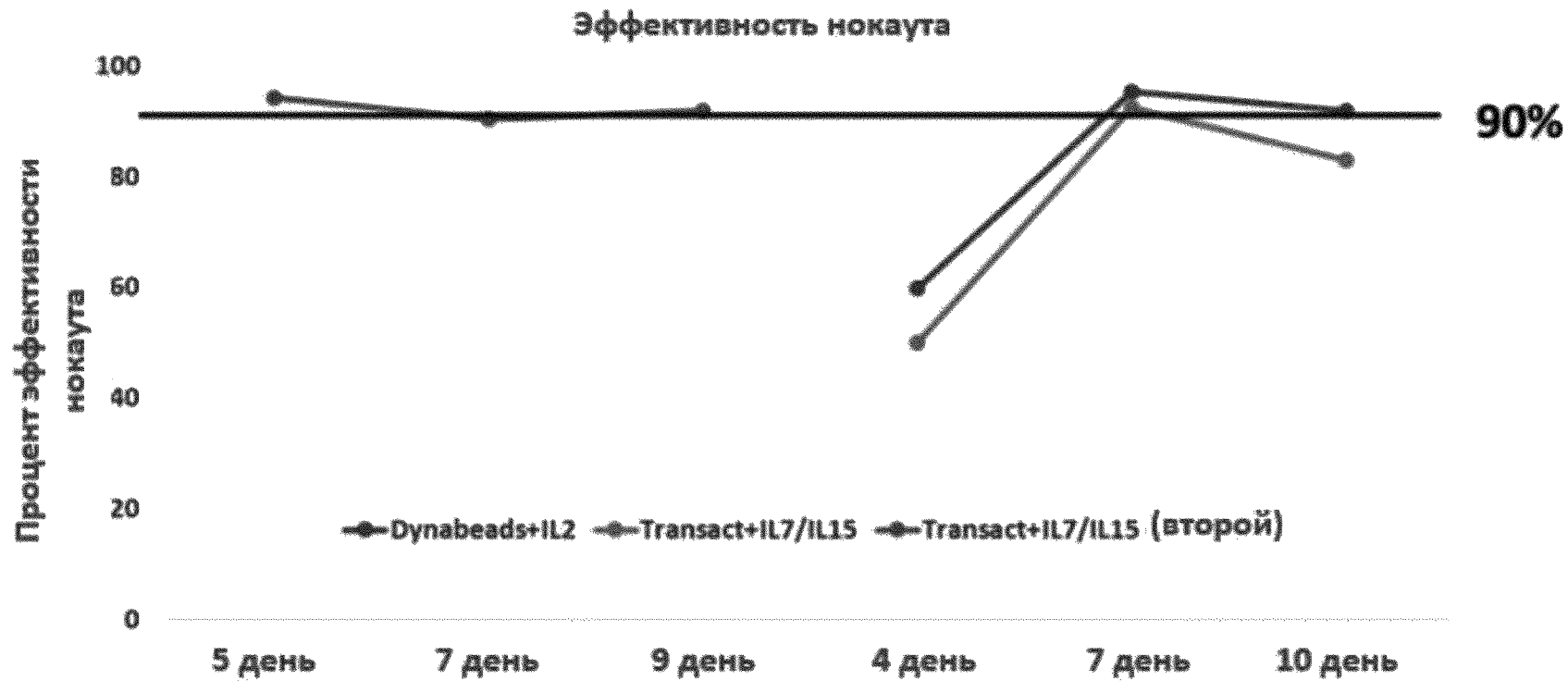
Среднее: Среднее: Среднее:
79.08% 45.88% 86.45%

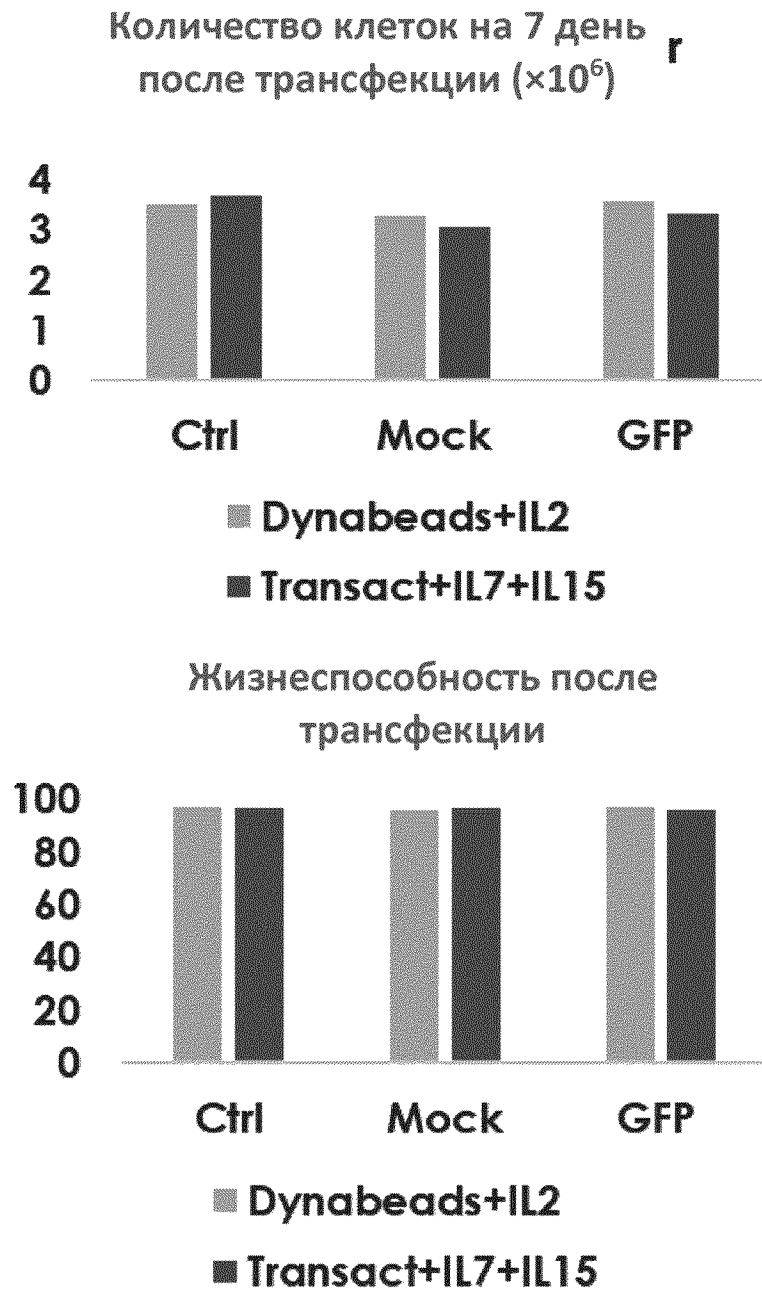
ФИГ. 19А

ФИГ. 19В

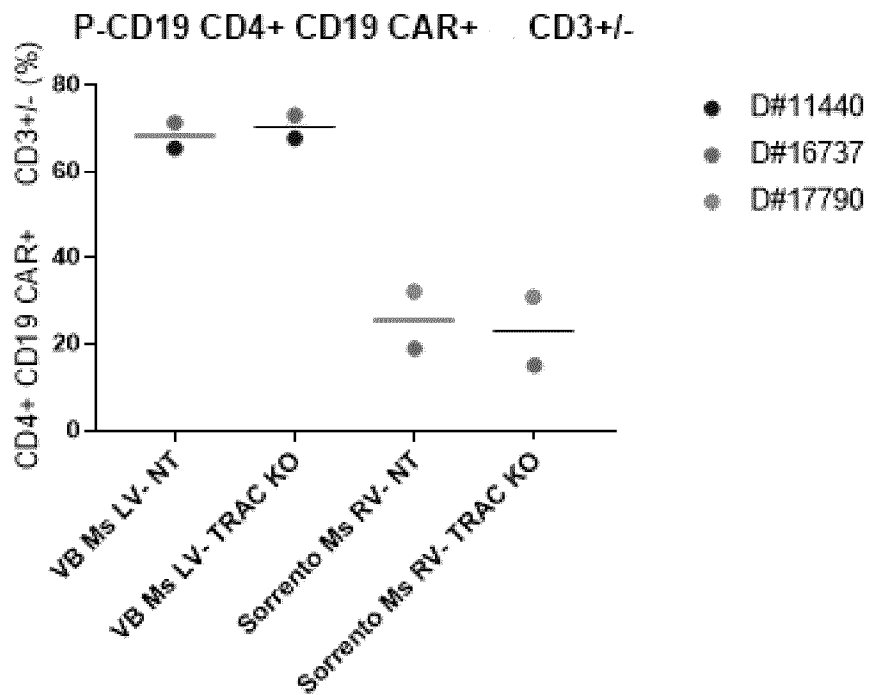
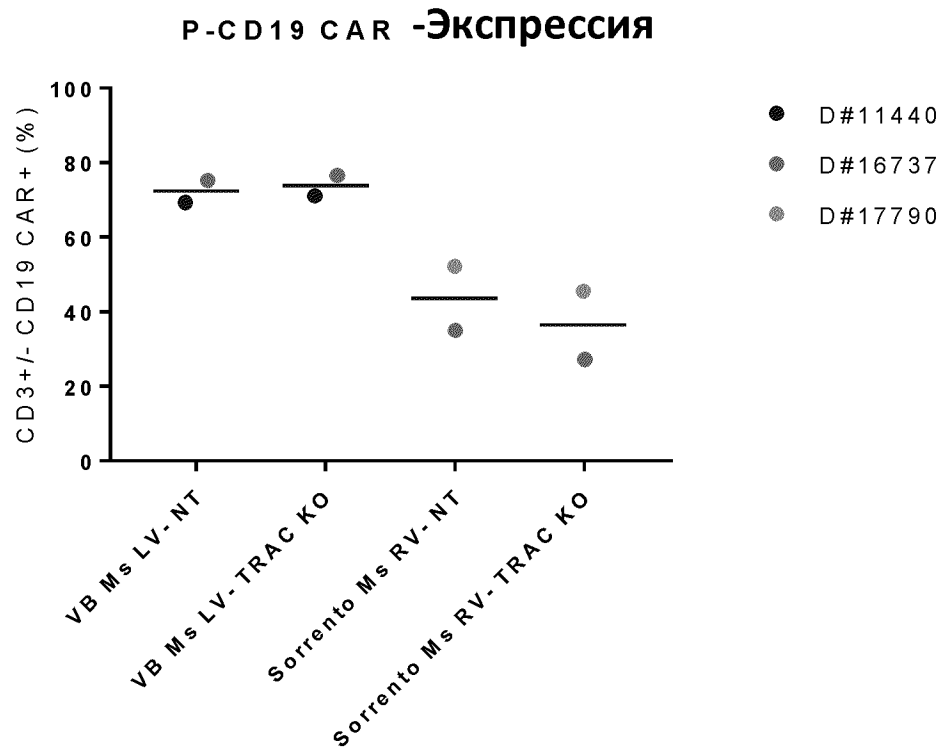


ФИГ. 20А

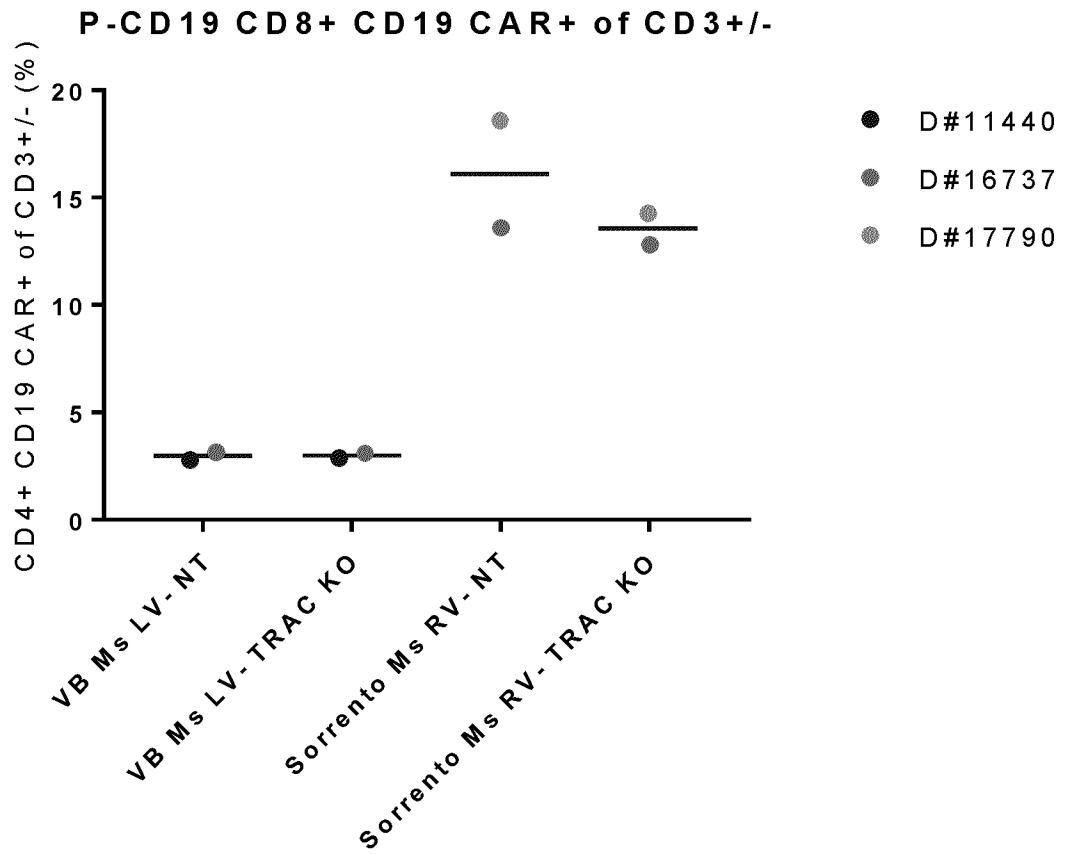




ФИГ. 20В

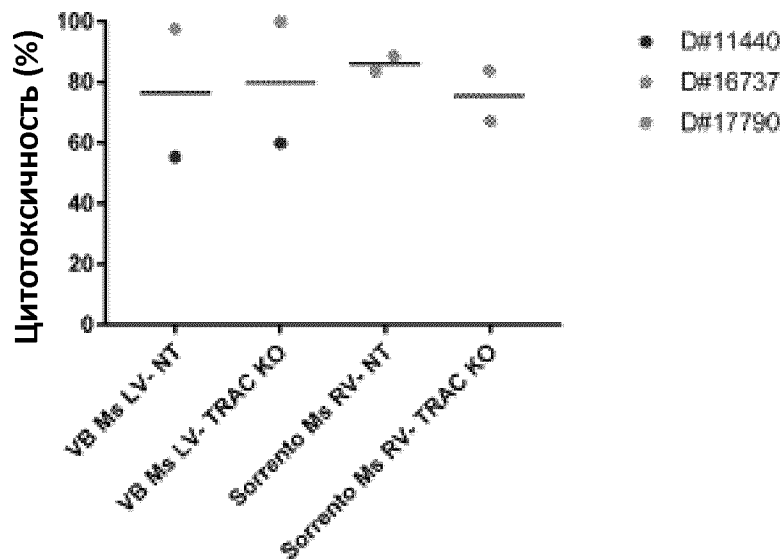


ФИГ. 22А

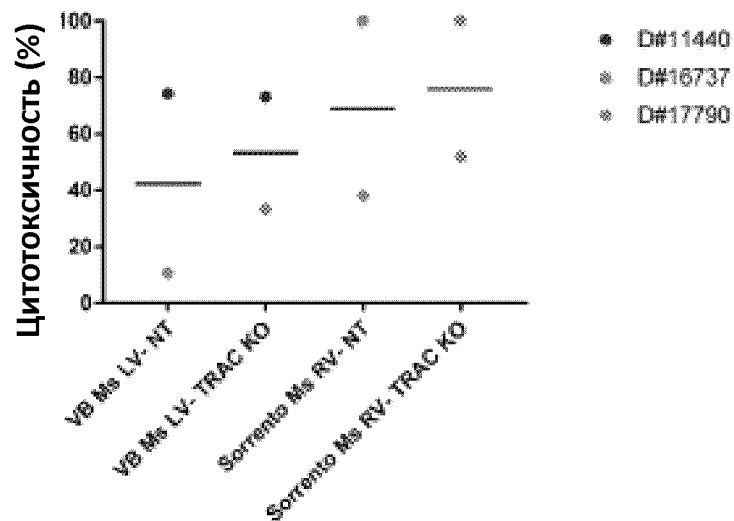


ФИГ. 22В

P-CD19 CAR ACEA 24-ч Цитотоксичность vs. Daudi
(E:T 2,5:1)



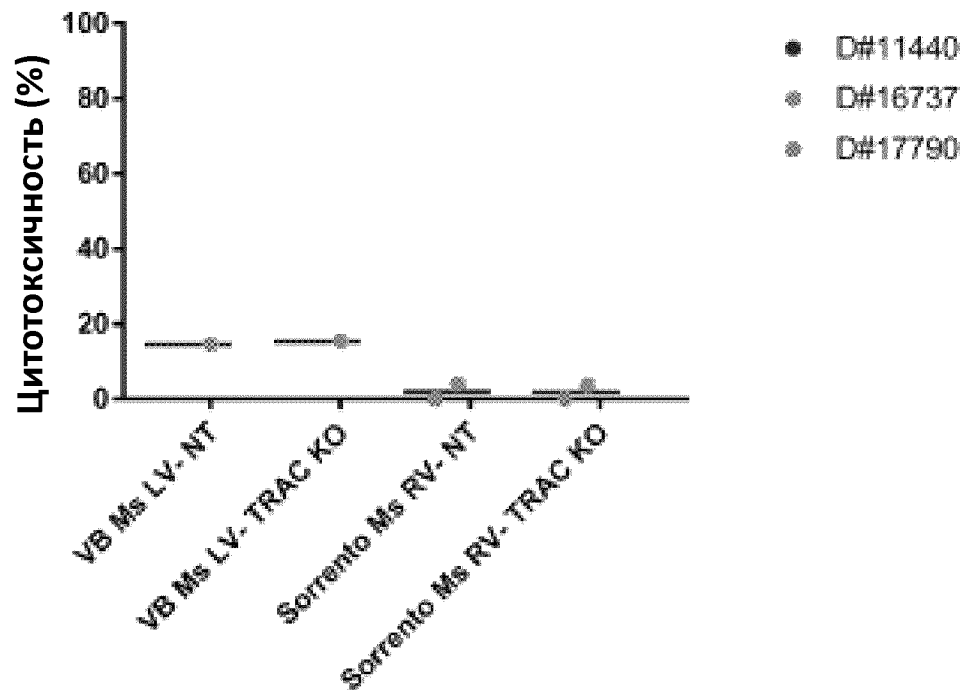
P-CD19 CAR ACEA 24-ч Цитотоксичность vs. Nalm6
(E:T 2,5:1)



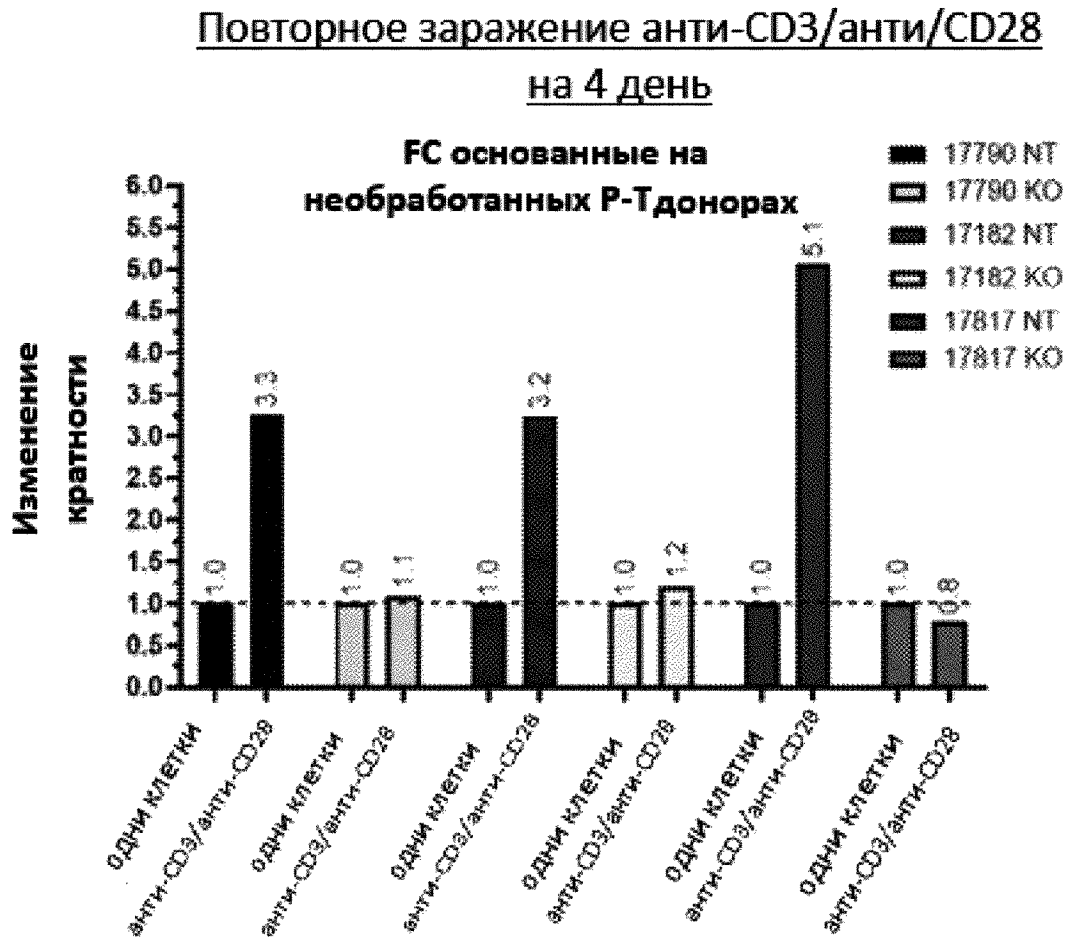
ФИГ. 23А

37/74

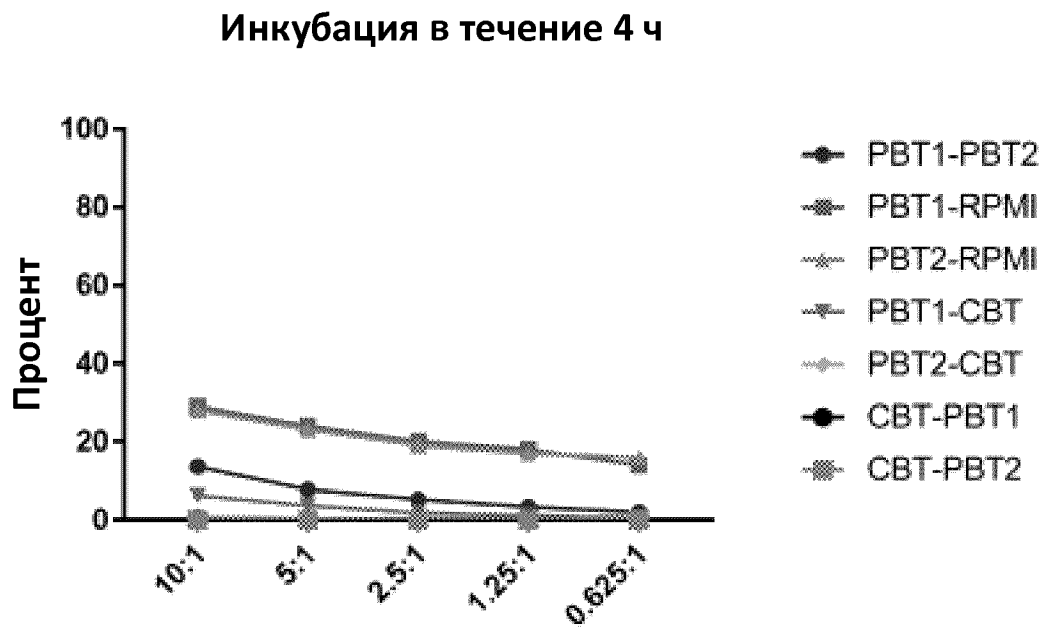
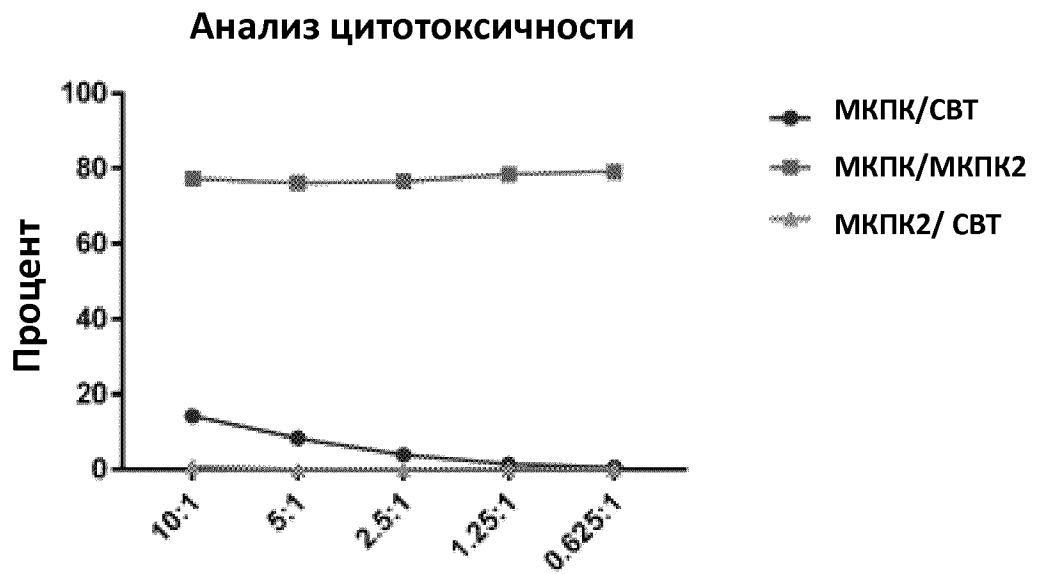
**P-CD19 CAR ACEA 24-ч Цитотоксичность vs. K562
(E:T 2,5:1)**



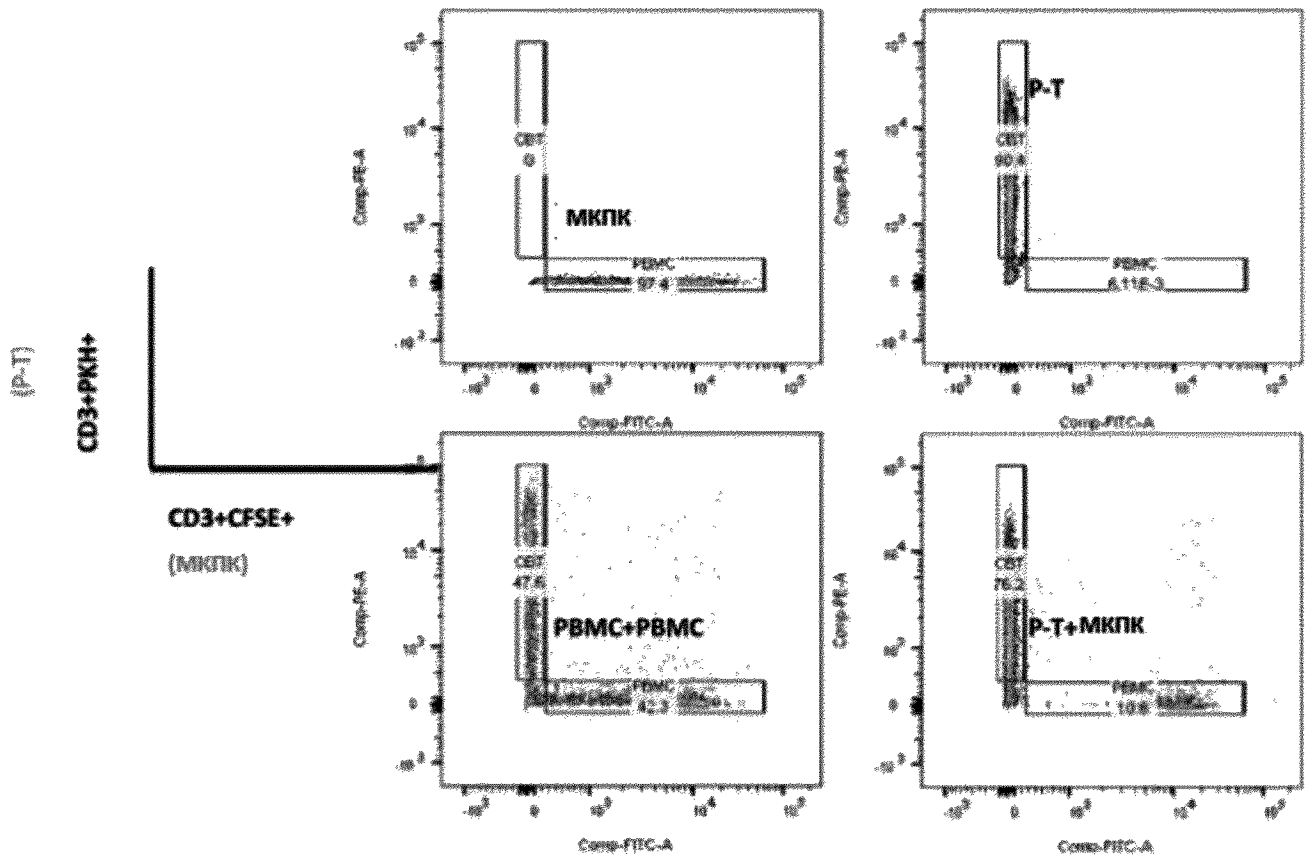
ФИГ. 23В



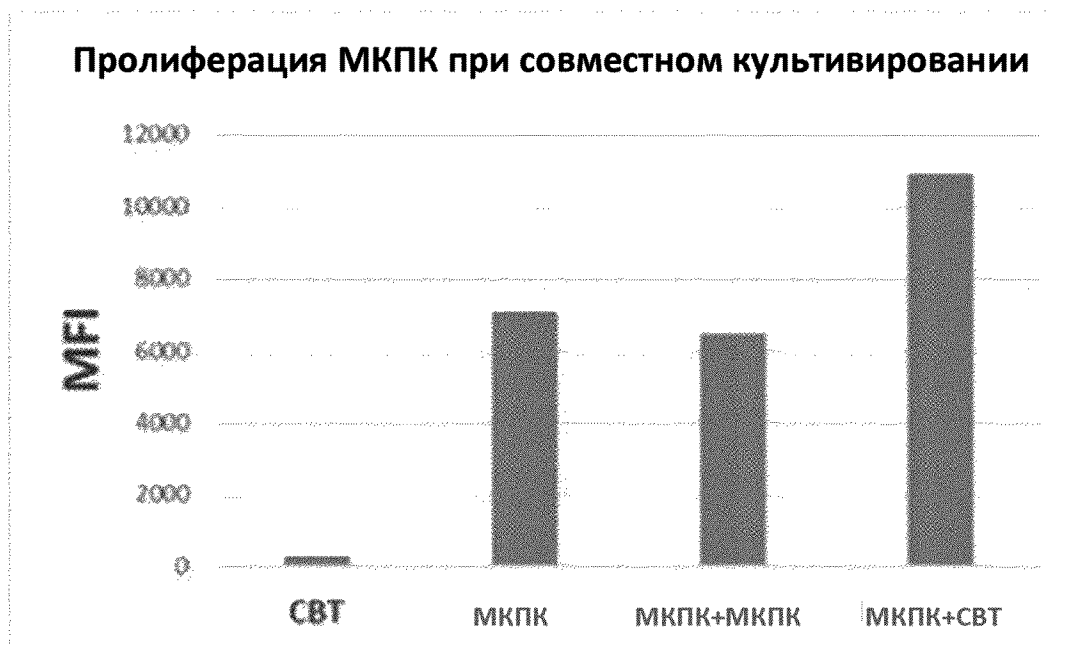
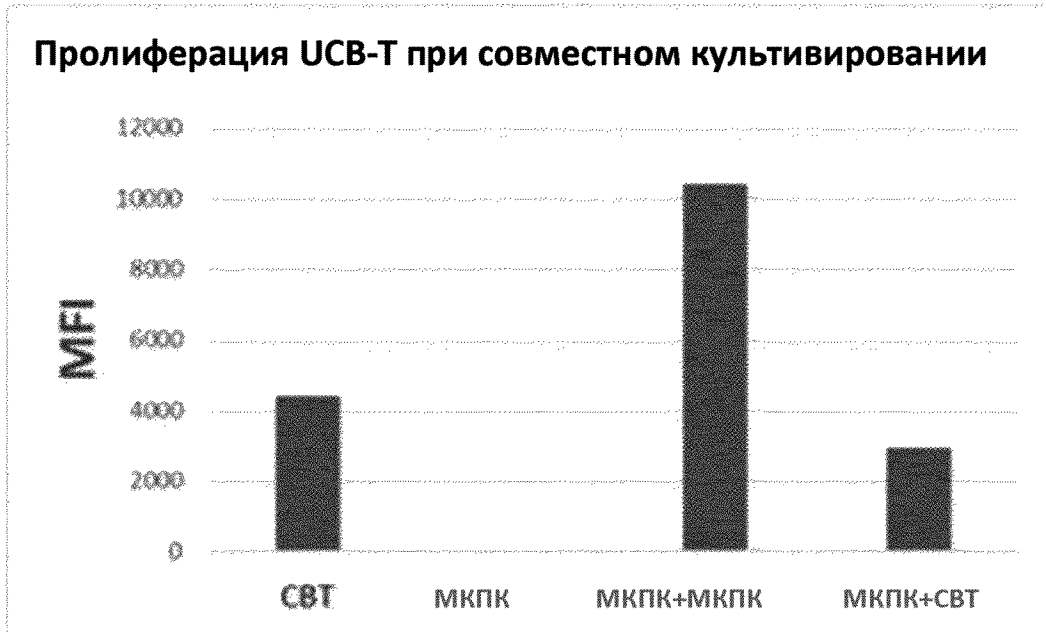
ФИГ. 24



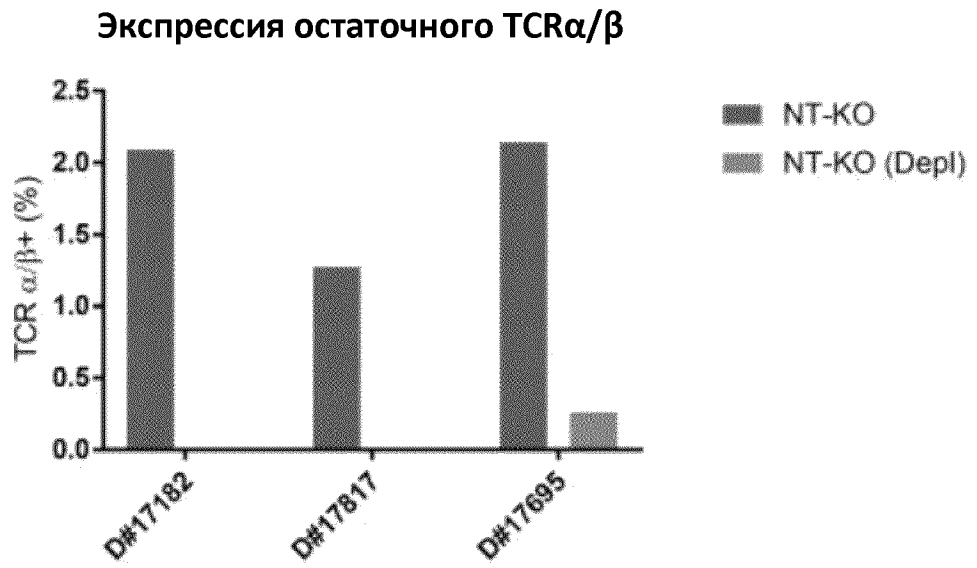
ФИГ. 25



ФИГ. 26А

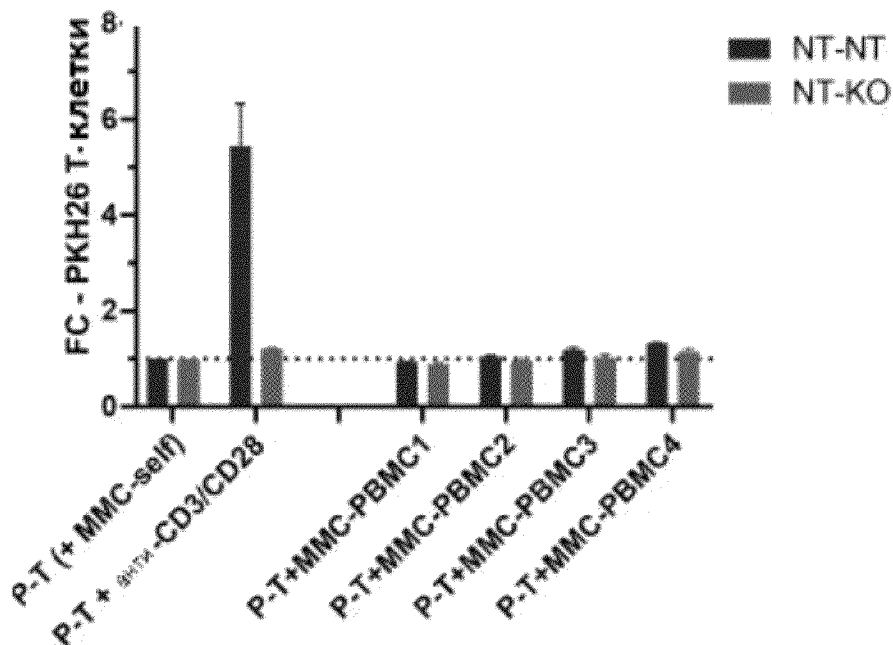


ФИГ. 26В

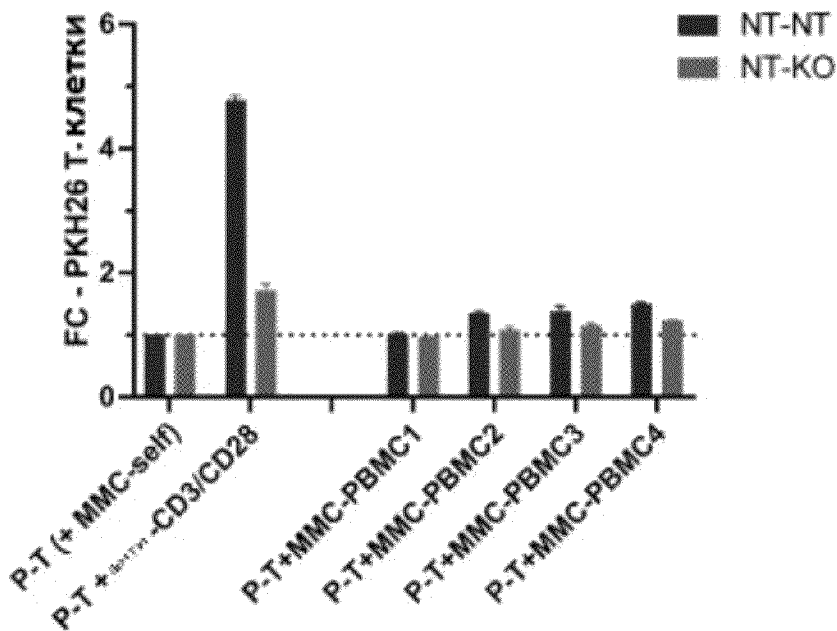


ФИГ. 27

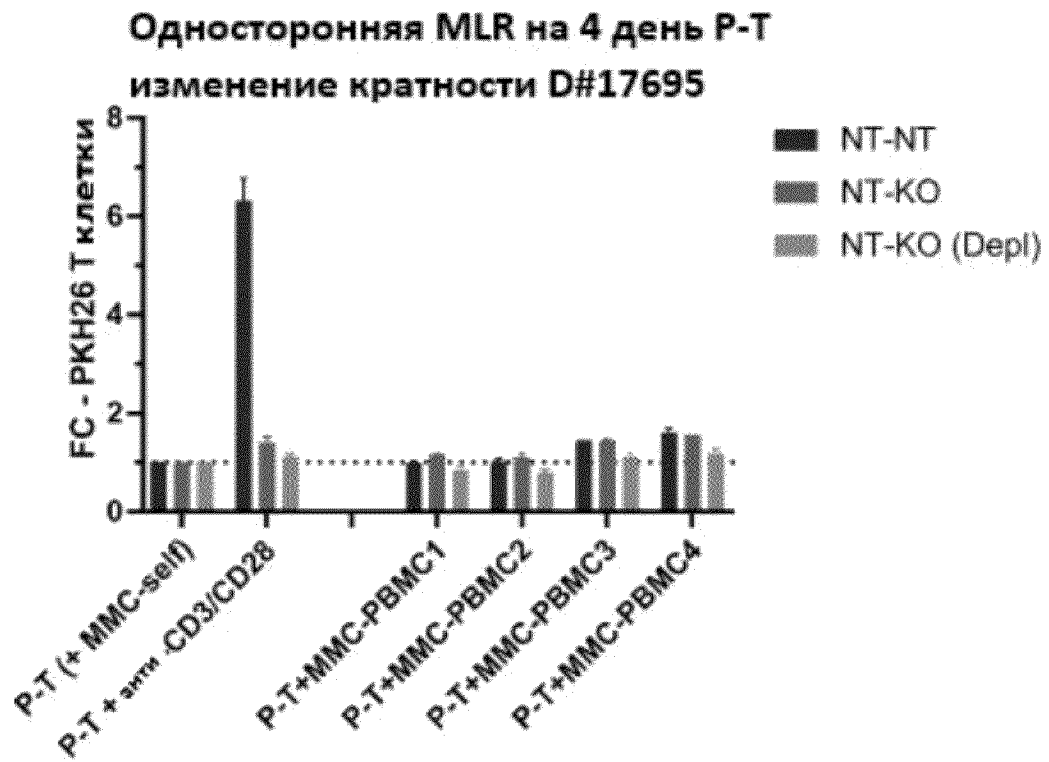
Односторонняя MLR на 4 день P-T
изменение кратности D#17182



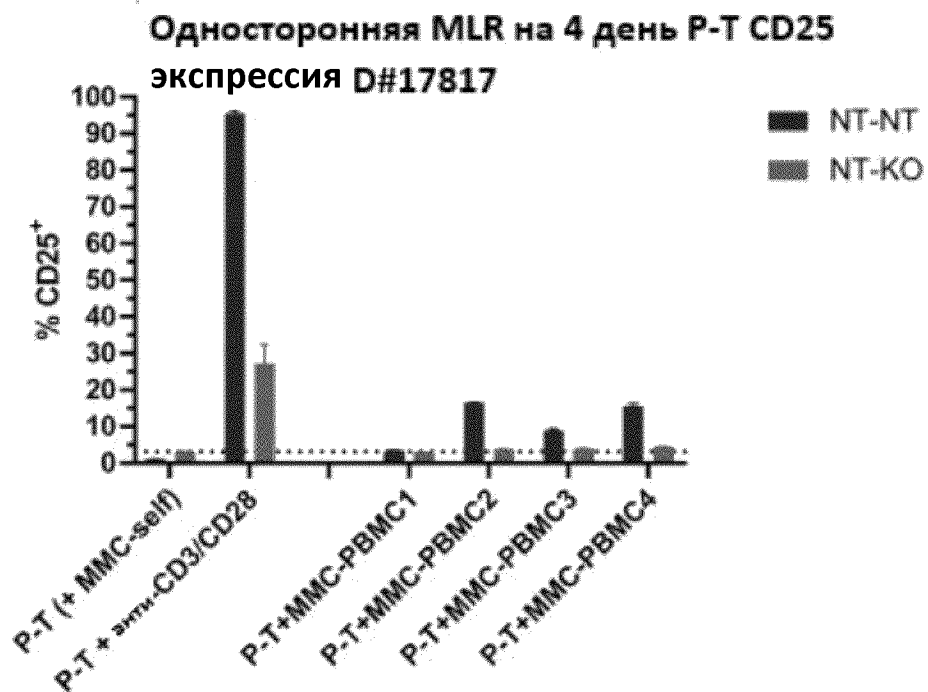
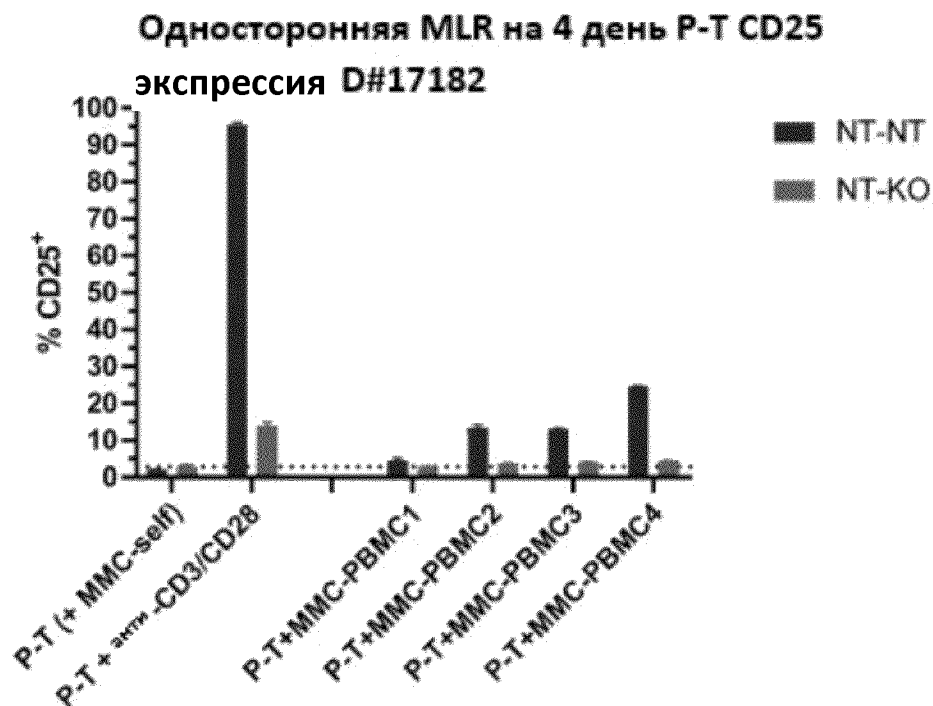
Односторонняя MLR на 4 день P-T
изменение кратности D#17817



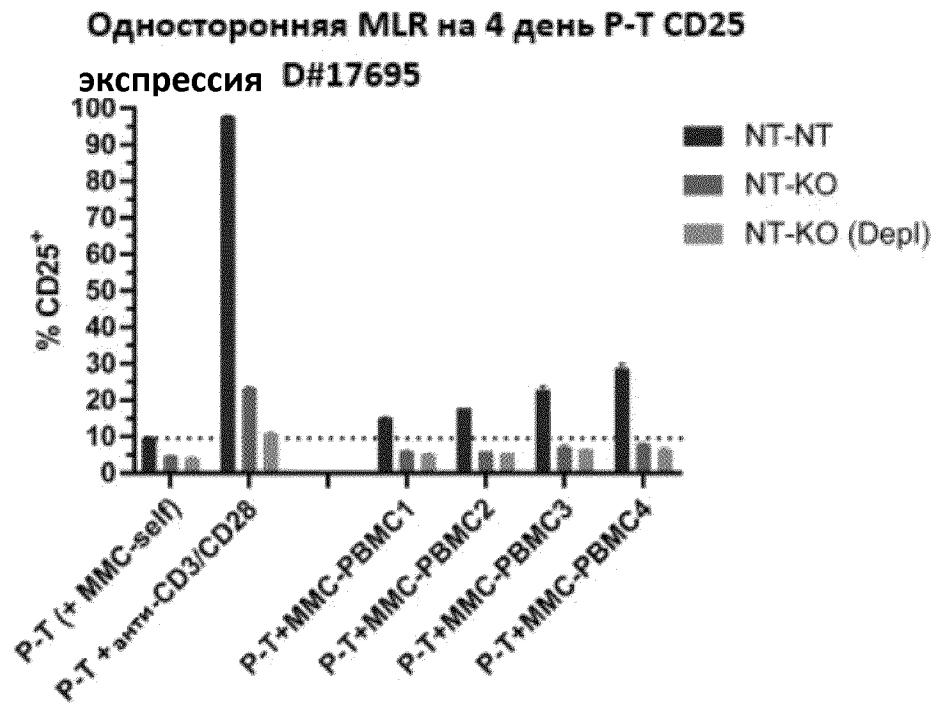
ФИГ. 28А



ФИГ. 28В

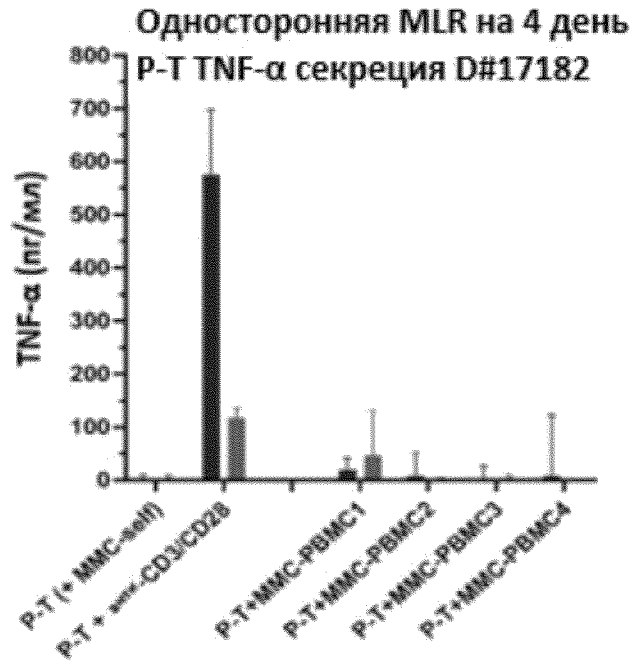
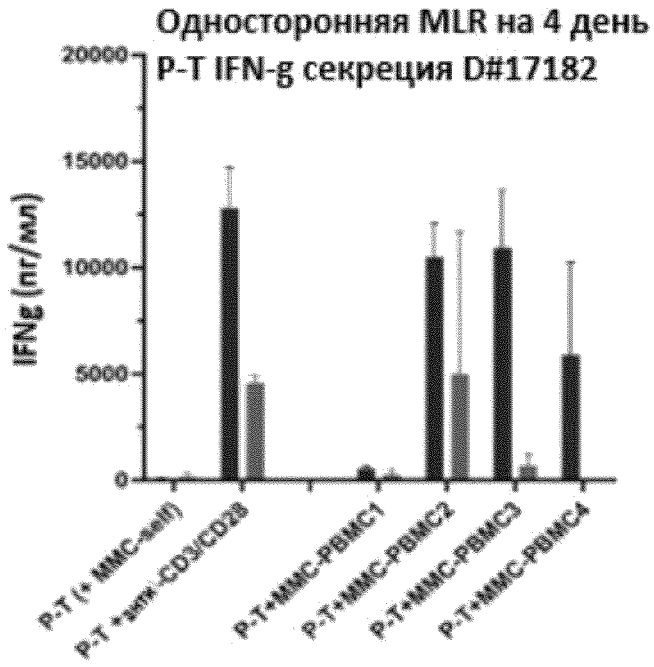


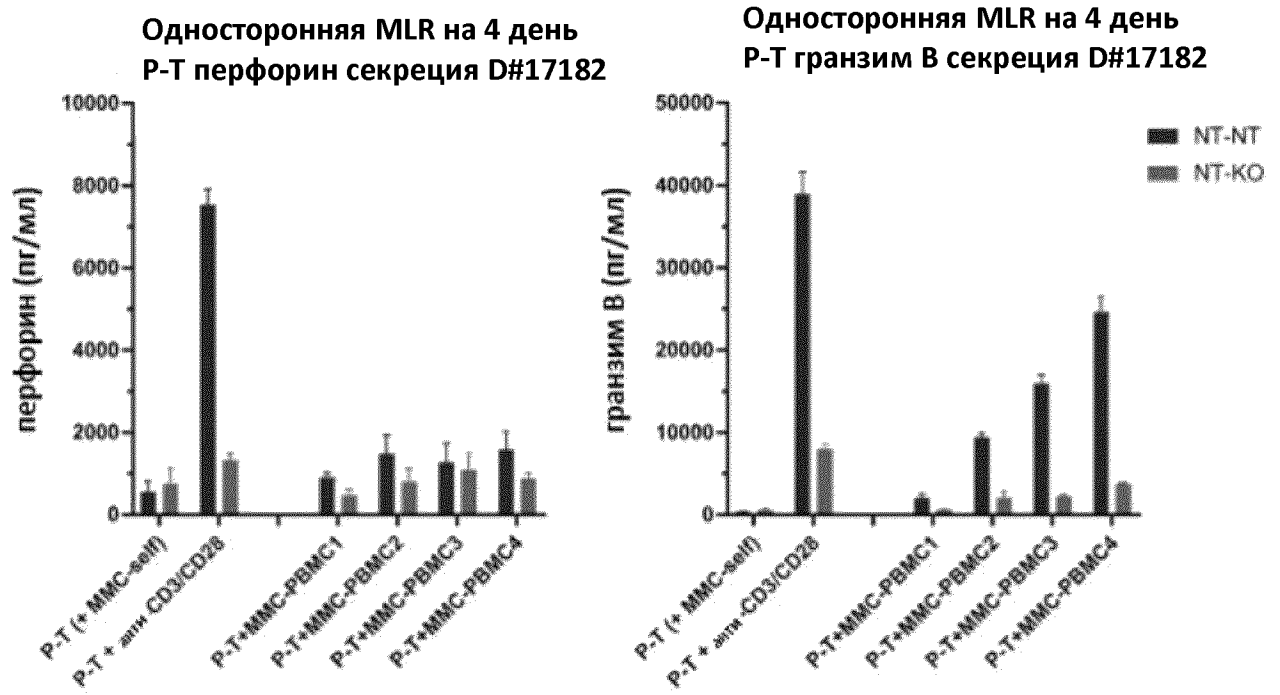
ФИГ. 29А



ФИГ. 29В

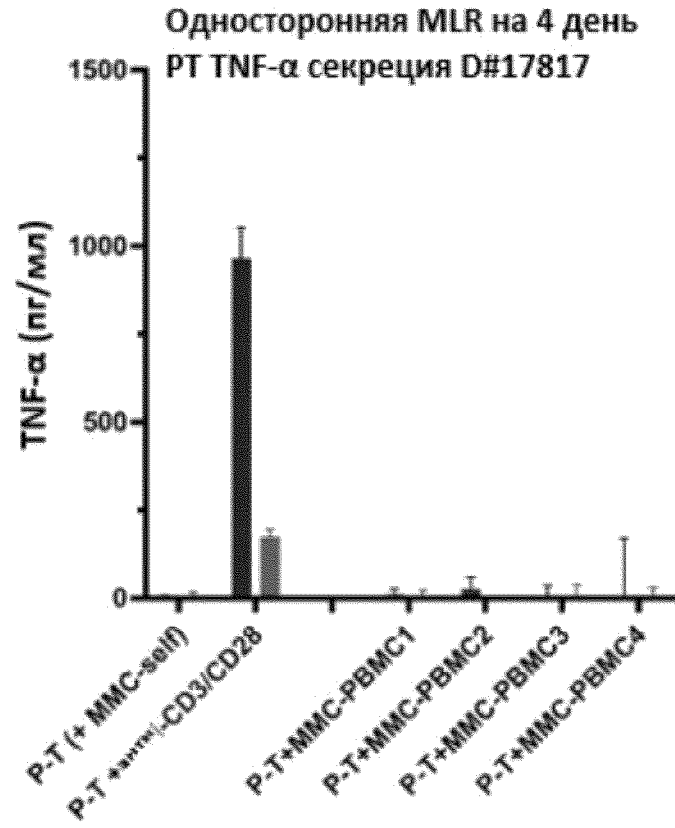
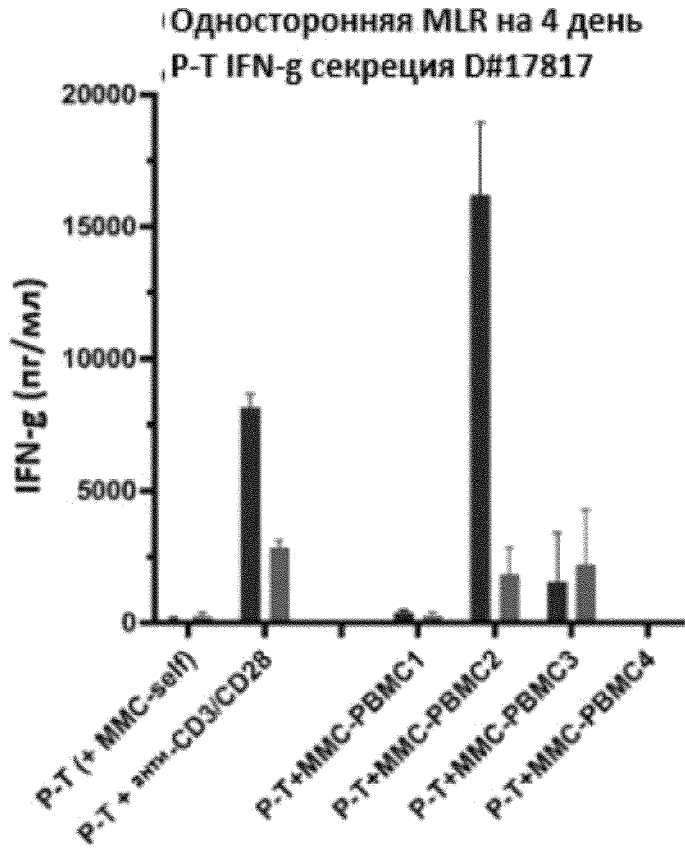
ФИГ. 30А



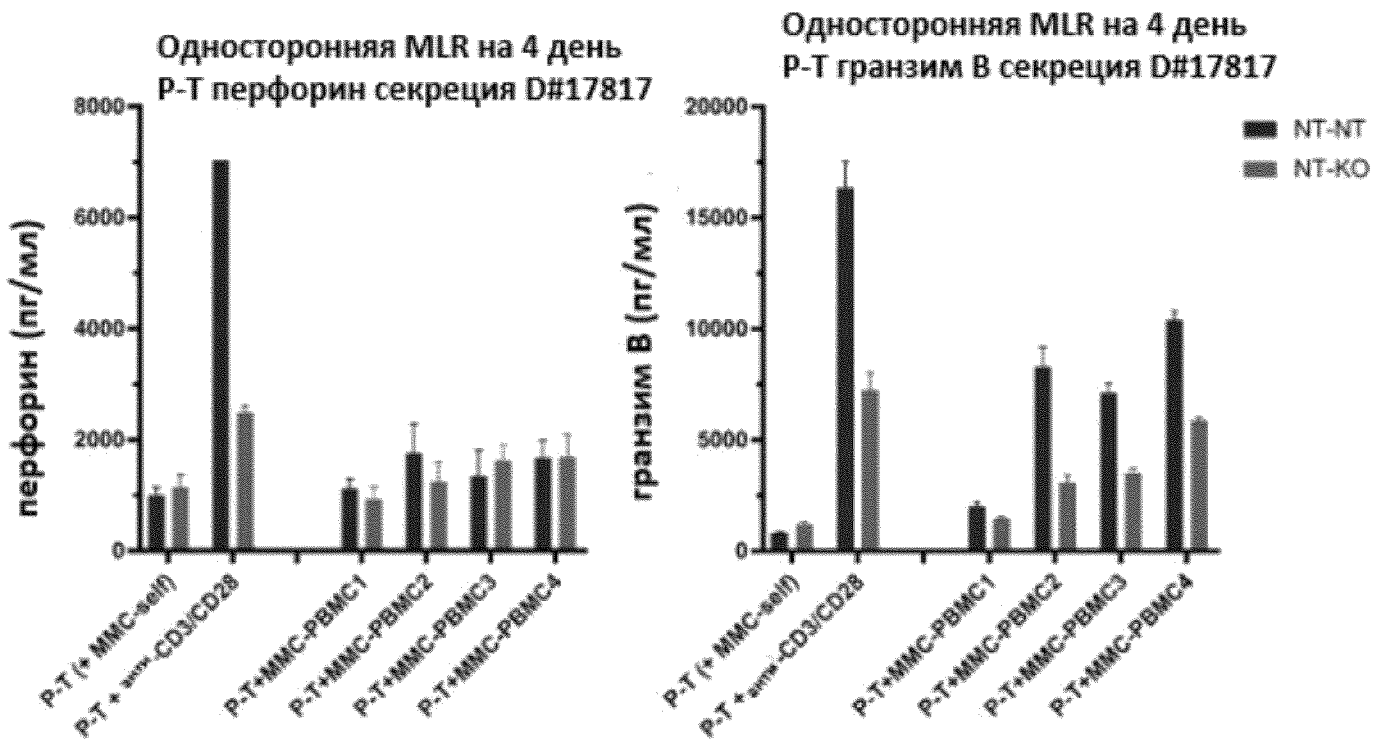


ФИГ. 30В

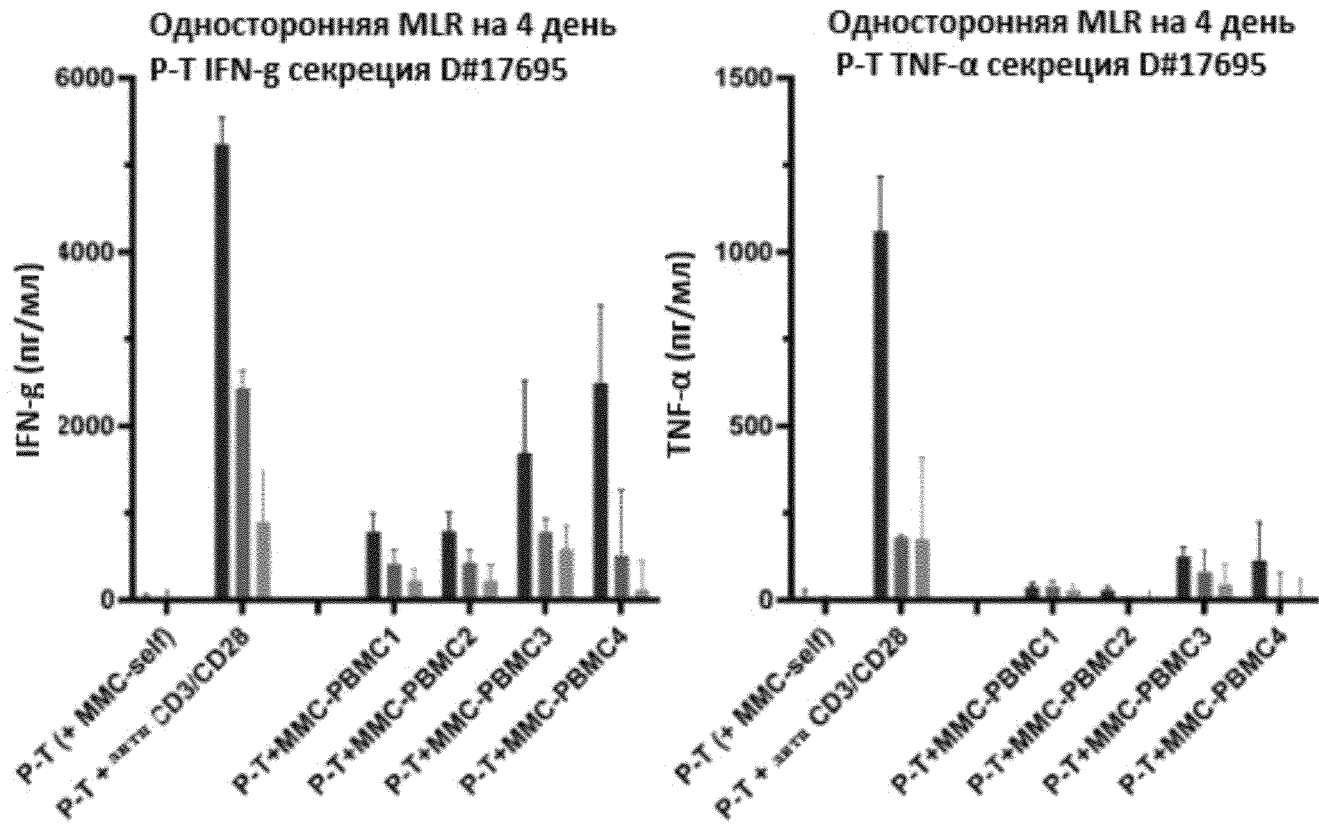
ФИГ. 30С



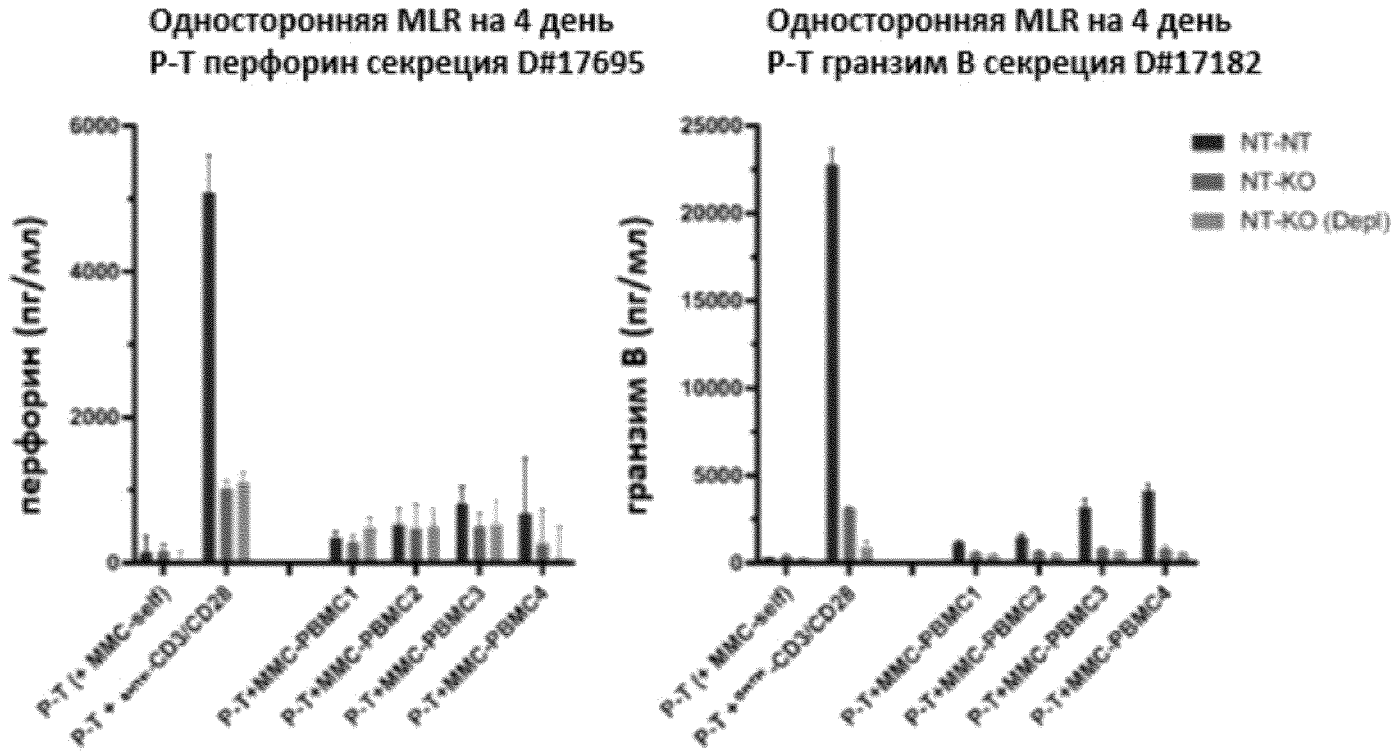
ФИГ. 30D



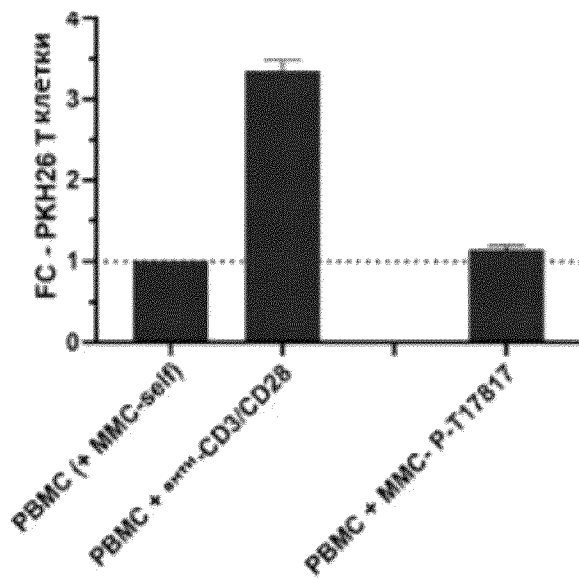
ФИГ. 30Е



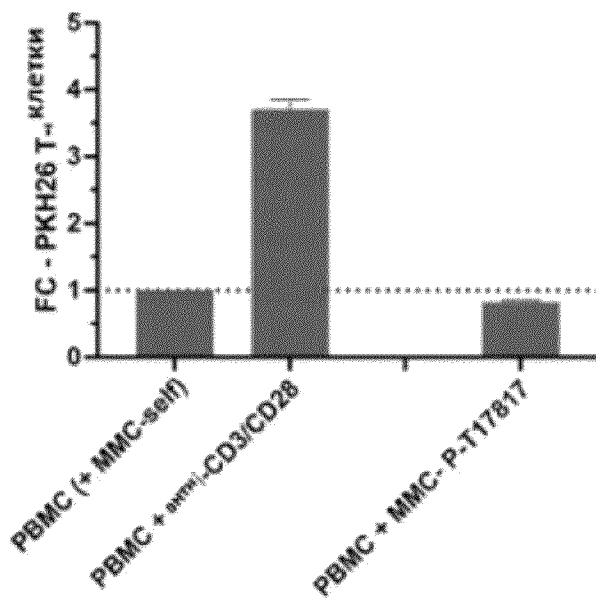
ФИГ. 30F



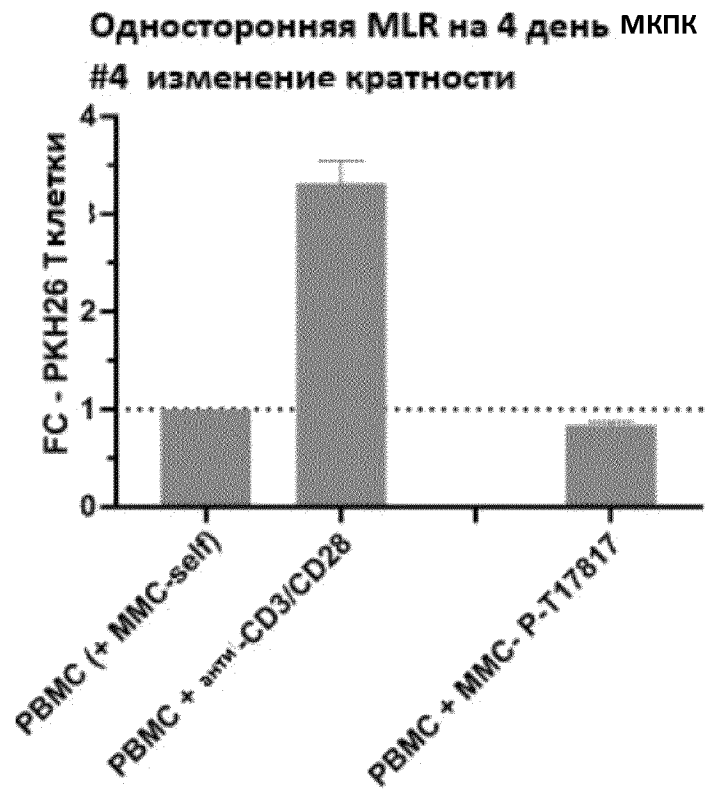
Односторонняя MLR на 4 дегМКПК #1
изменение кратности



Односторонняя MLR на 4 дегМКПК #2#2
изменение кратности

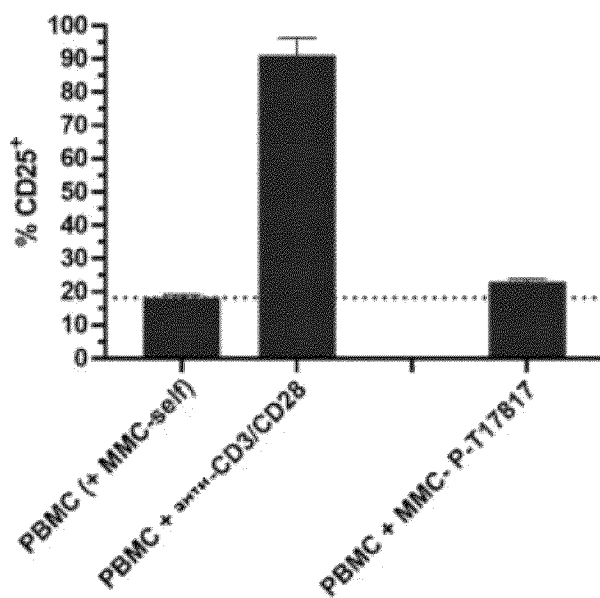


ФИГ. 31А

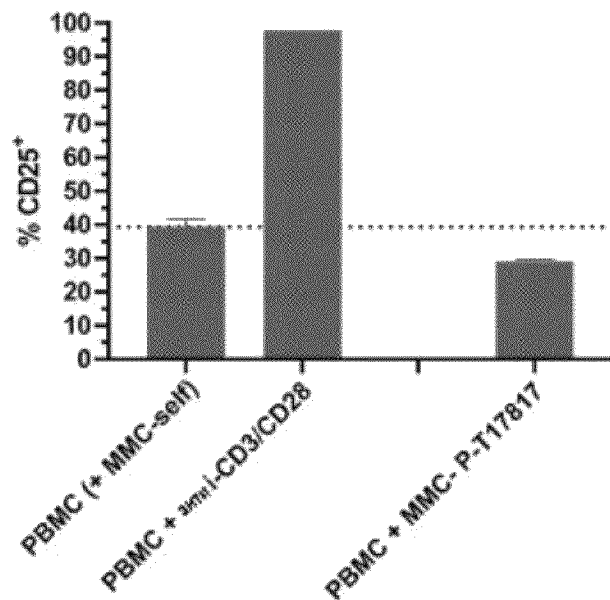


ФИГ. 31В

Односторонняя MLR на 4 день #1 CD25 экспрессия

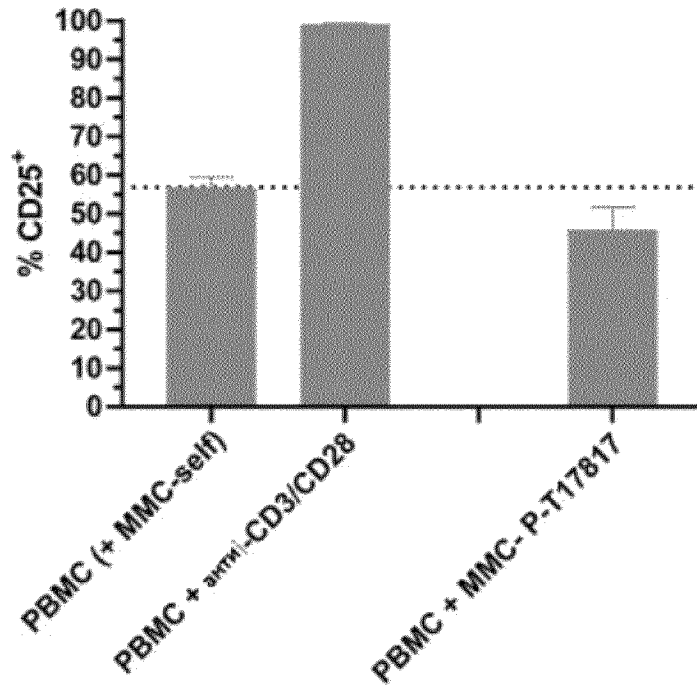


Односторонняя MLR на 4 день #2 CD25 экспрессия



ФИГ. 32А

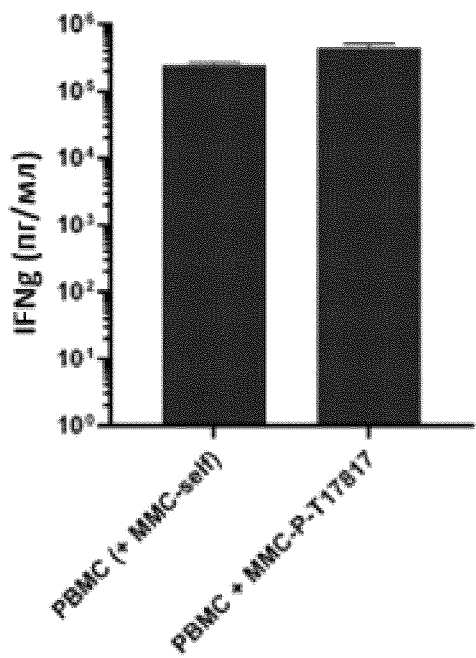
Односторонняя MLR на 4 день МКПК #4 CD25 экспрессия



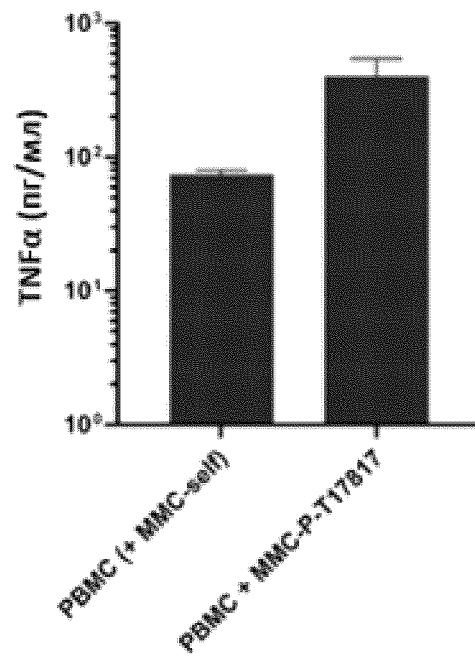
ФИГ. 32В

ФИГ. 33А

Односторонняя MLR на 4 день МКПК#1 IFN- γ секреция

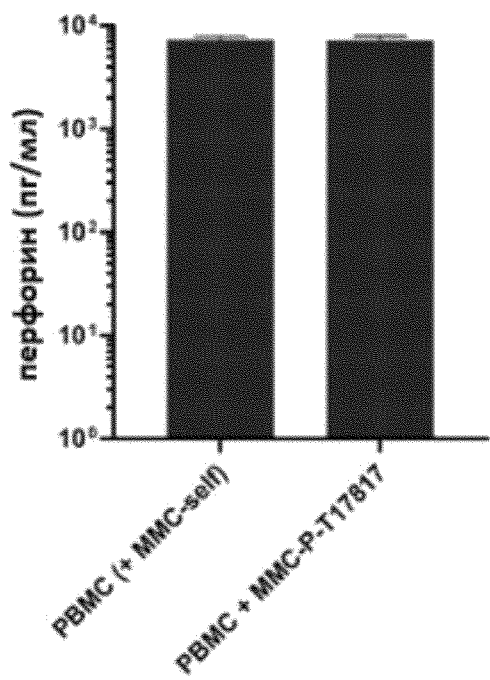


Односторонняя MLR на 4 день МКПК#1 TNF- α секреция

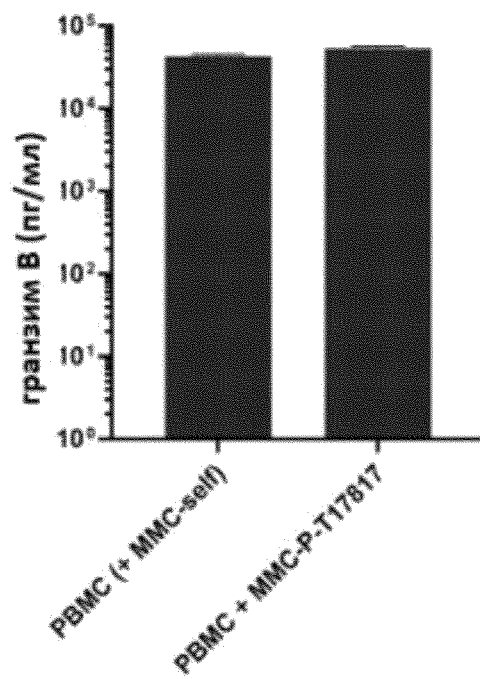


ФИГ. 33В

Односторонняя MLR на 4 день МКПК#1 перфорин секреция

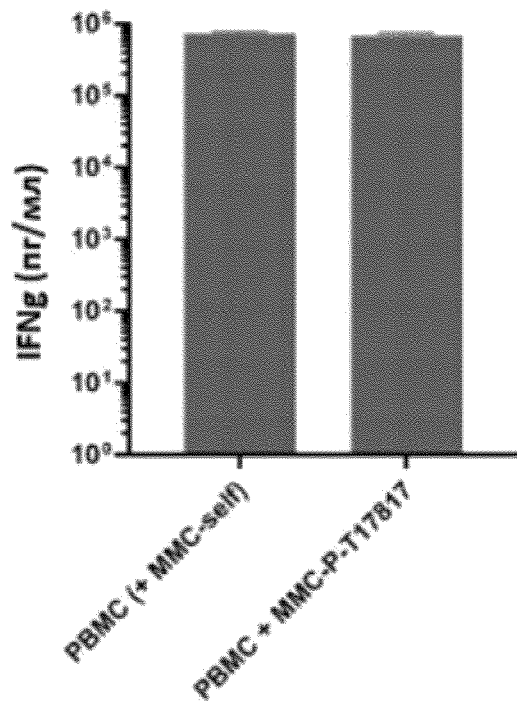


Односторонняя MLR на 4 день МКПК#1 гранзим В секреция

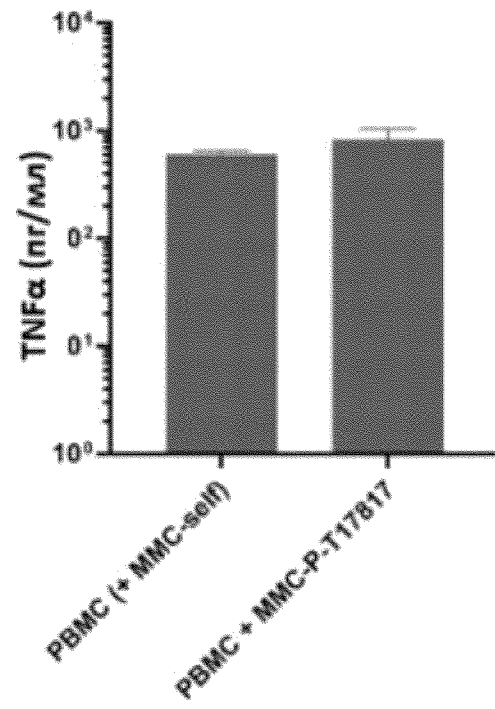


ФИГ. 33С

Односторонняя MLR на 4 день МКПК#1 IFN- γ секреция

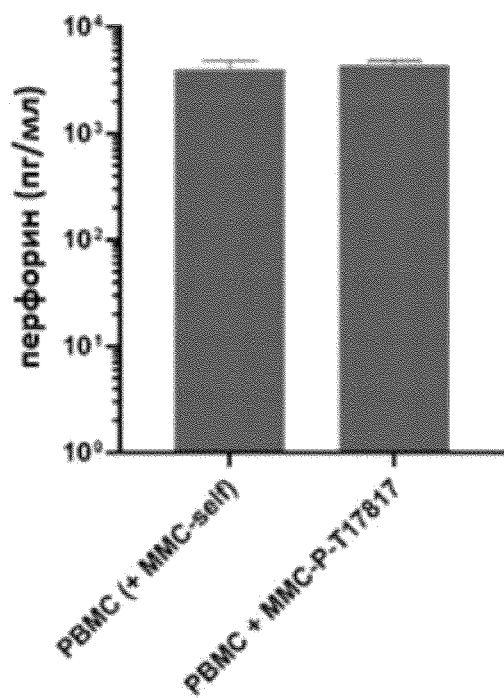


Односторонняя MLR на 4 день МКПК#2 TNF- α секреция

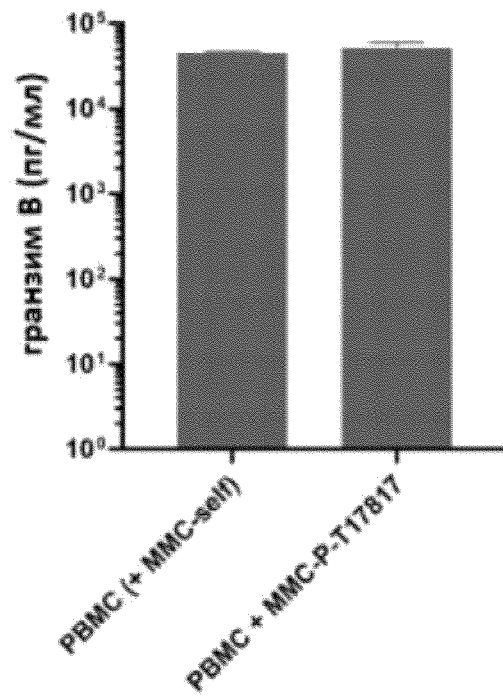


ФИГ. 33Д

Односторонняя MLR на 4 день МКПК#2 перфорин секреция

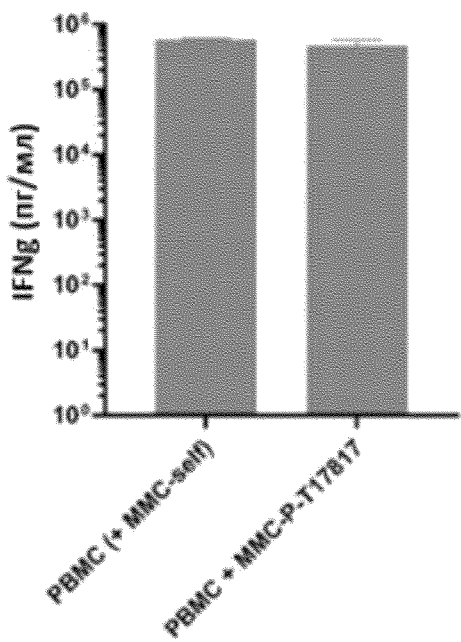


Односторонняя MLR на 4 день МКПК#1 гранзим В секреция

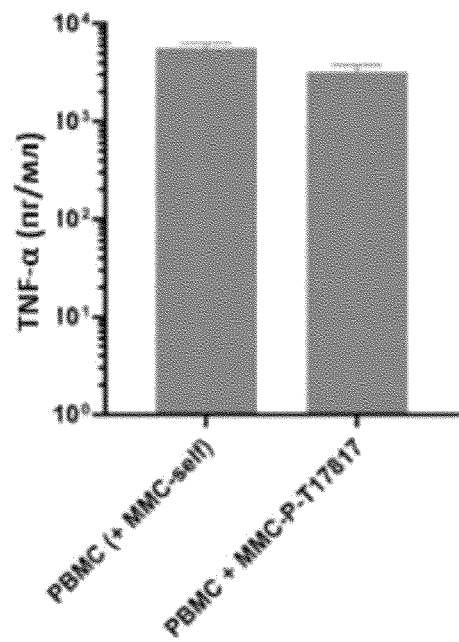


ФИГ. 33Е

Односторонняя MLR на 4 день МКПК#4 IFN- γ секреция

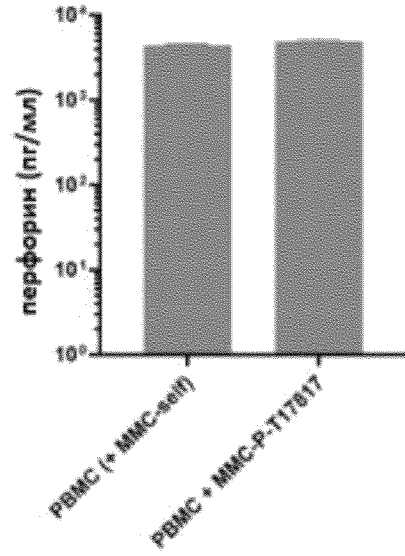


Односторонняя MLR на 4 день МКПК#4 TNF- α секреция

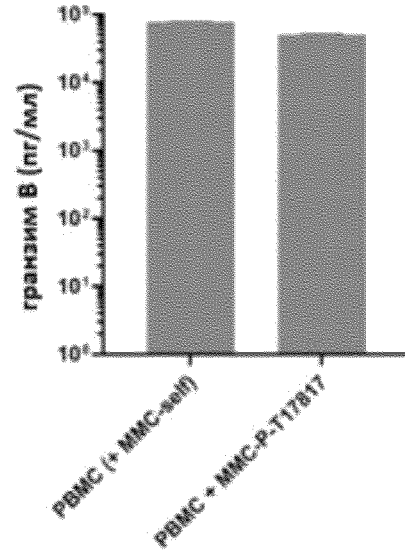


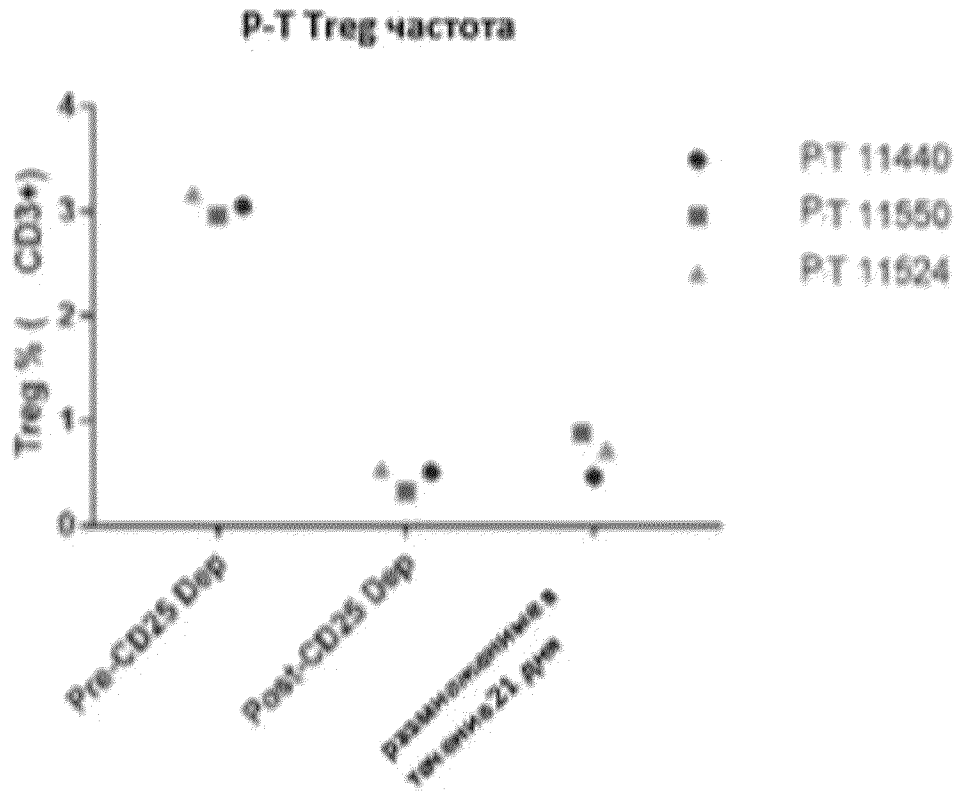
ФИГ. 33F

Односторонняя MLR на 4 день МКПК#4 перфорин секрция



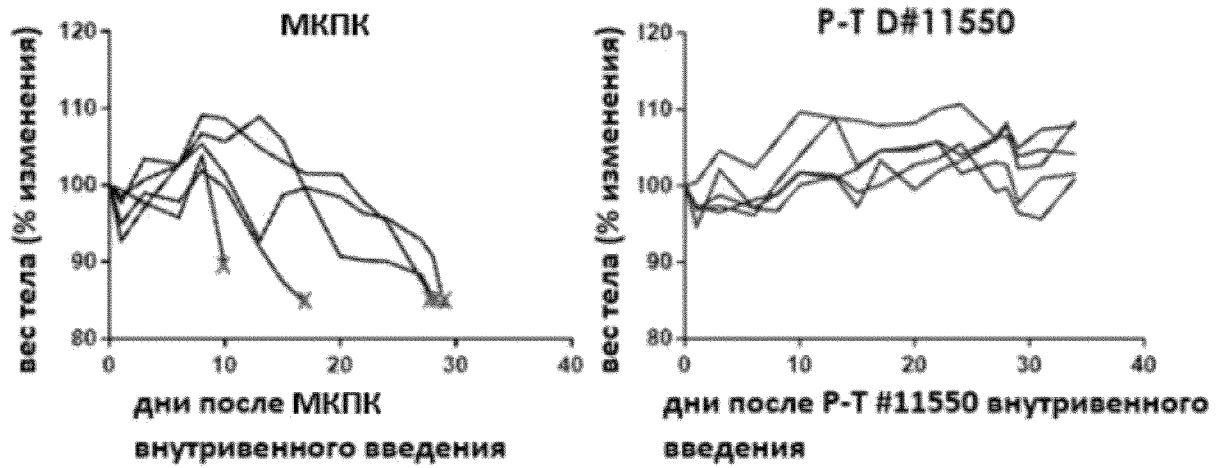
Односторонняя MLR на 4 день МКПК#4 гранзим В секрция



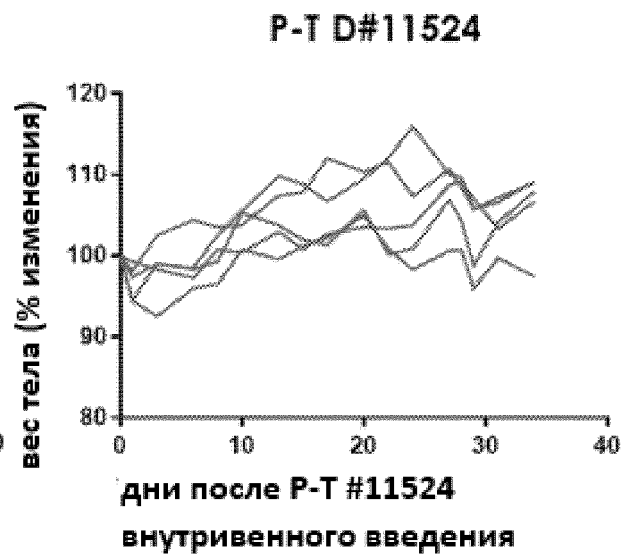
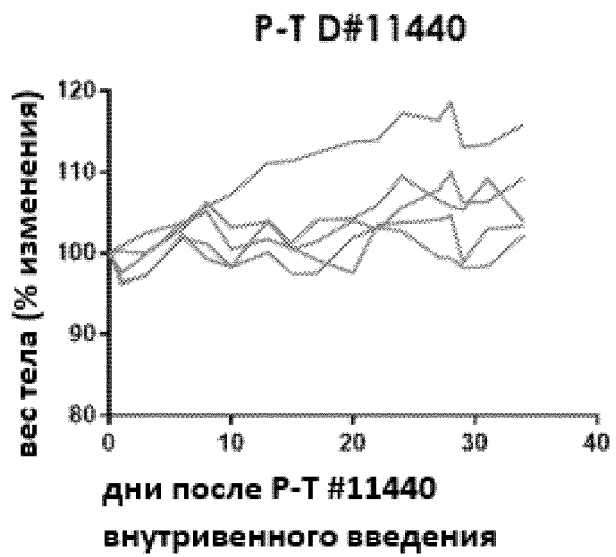


ФИГ. 34А

ФИГ. 34В



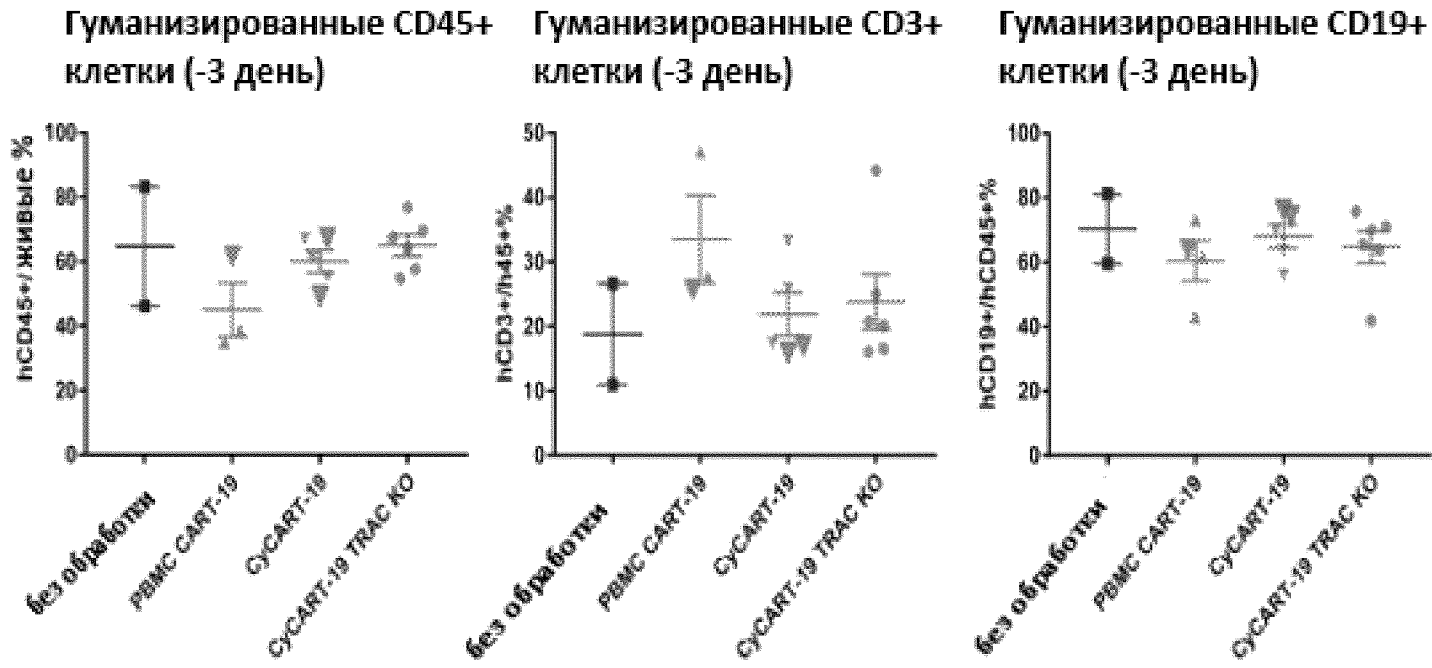
ФИГ. 34С

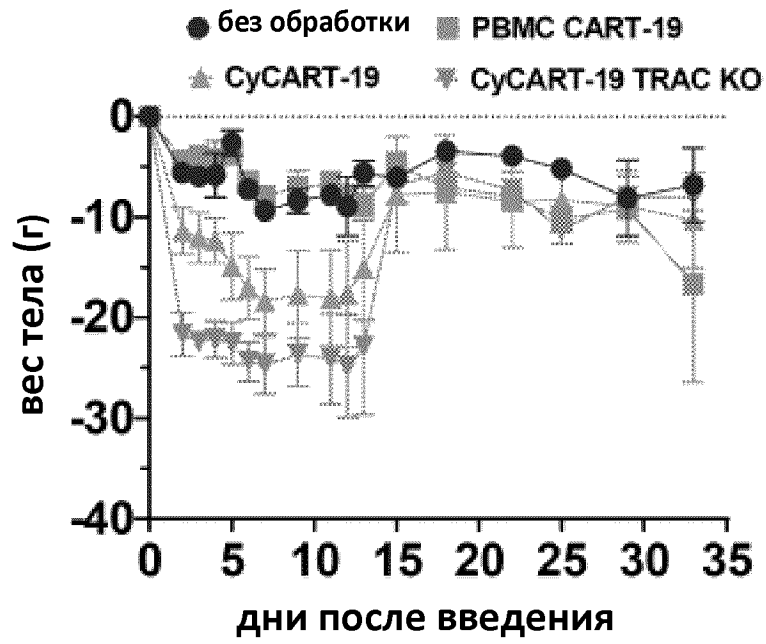




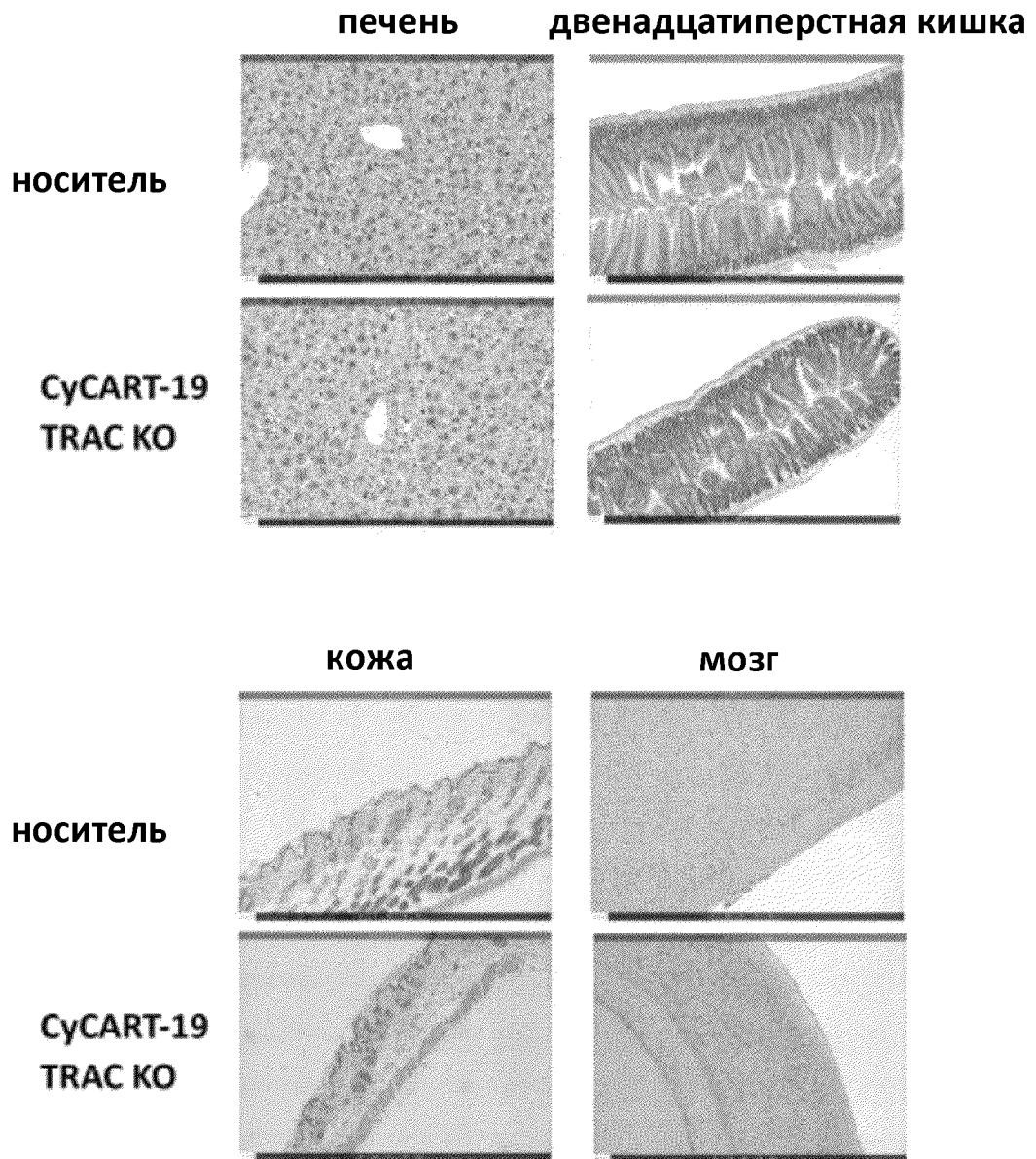
ФИГ. 35

ФИГ. 36

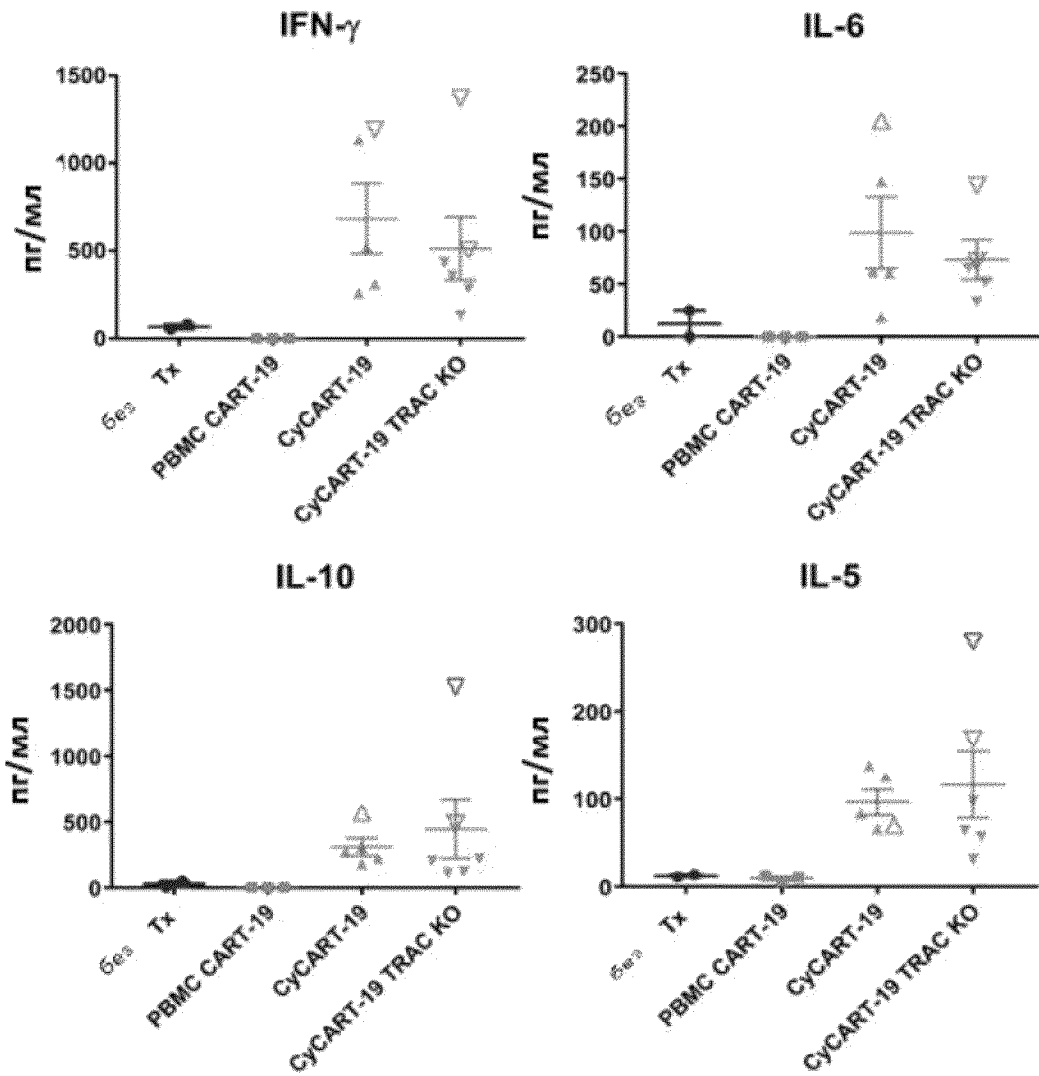




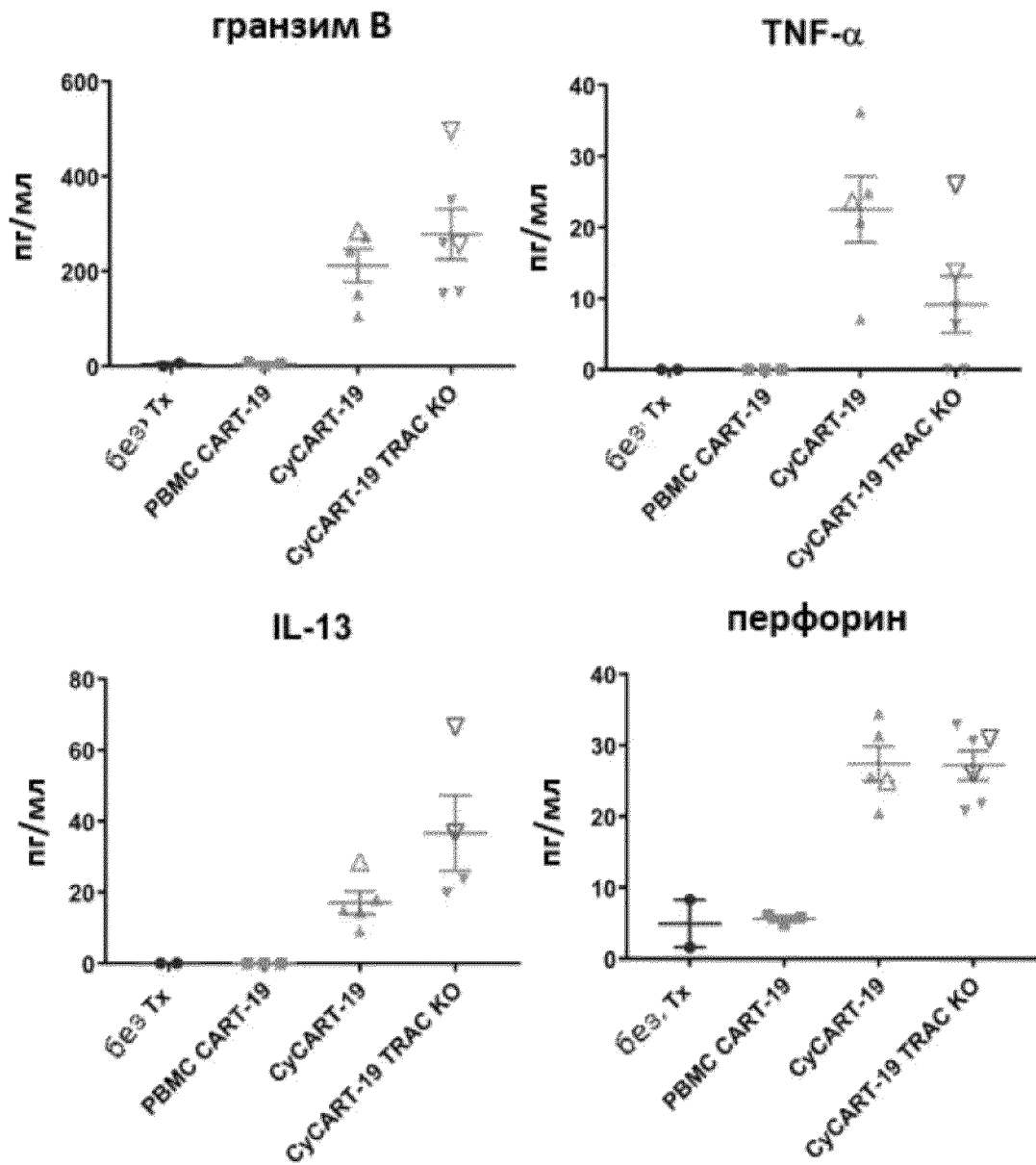
ФИГ. 37



ФИГ. 38

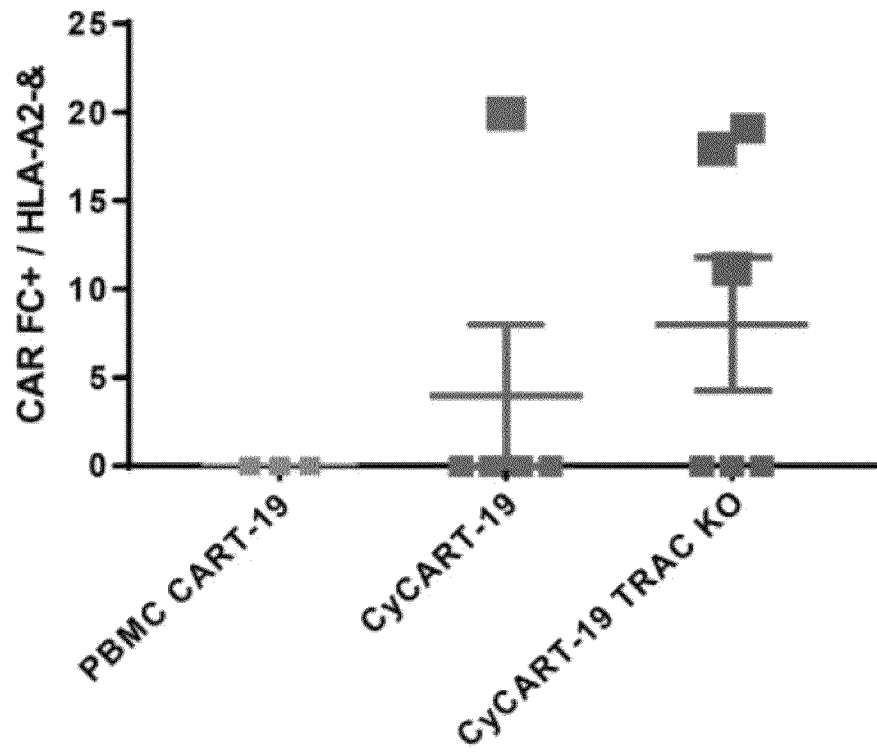


ФИГ. 39А

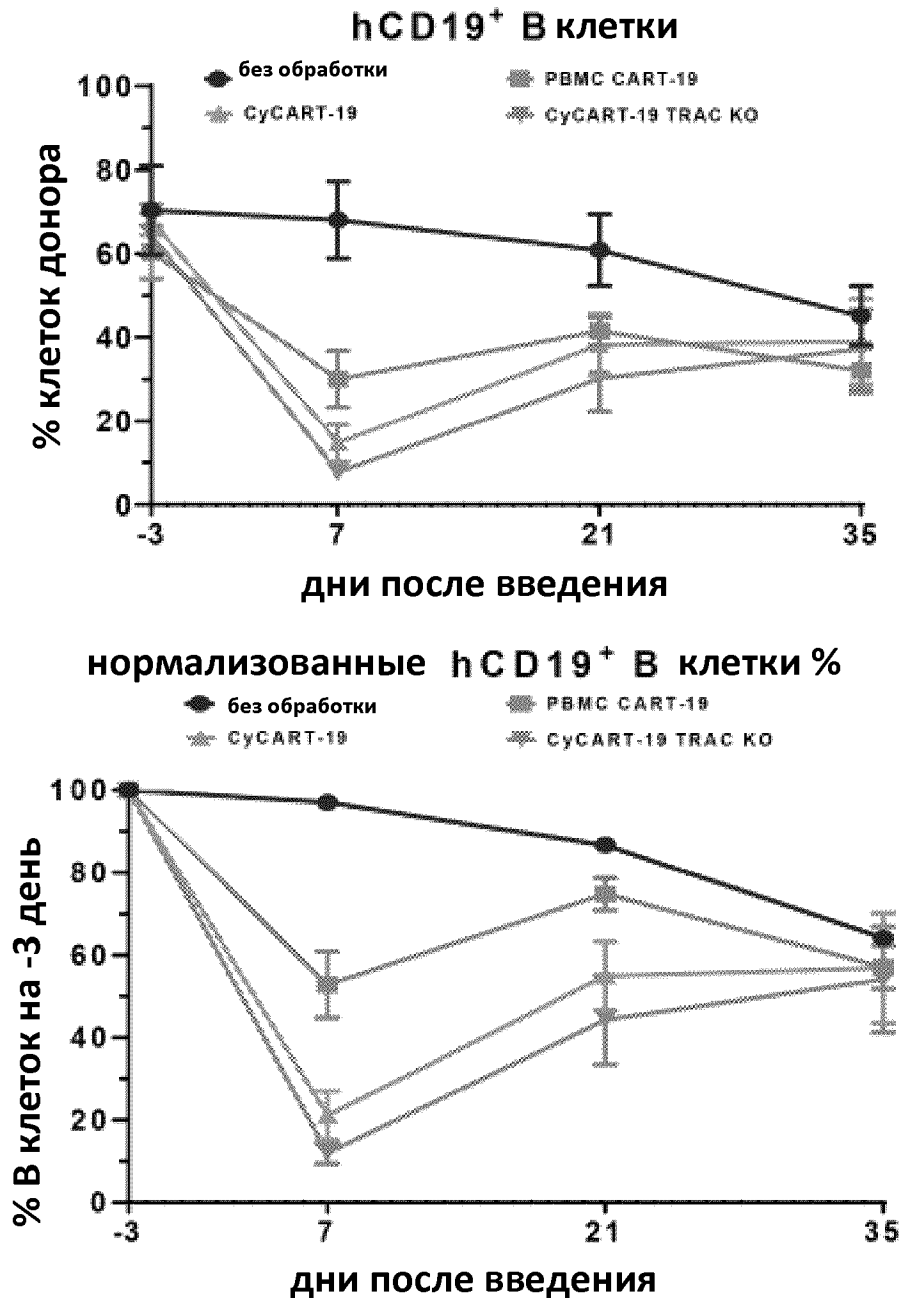


ФИГ. 39В

7 день : CAR Fc+ / HLA-A2-%



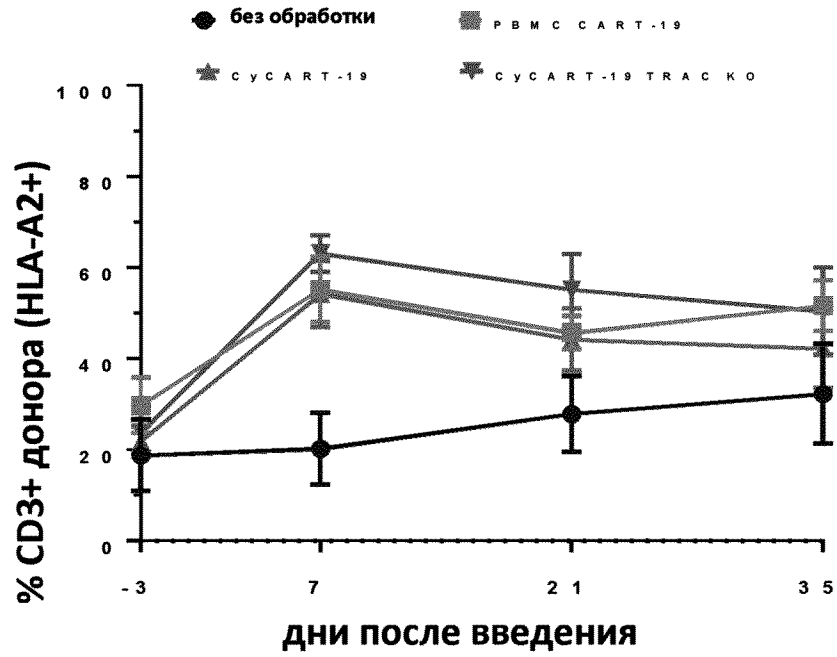
ФИГ. 40



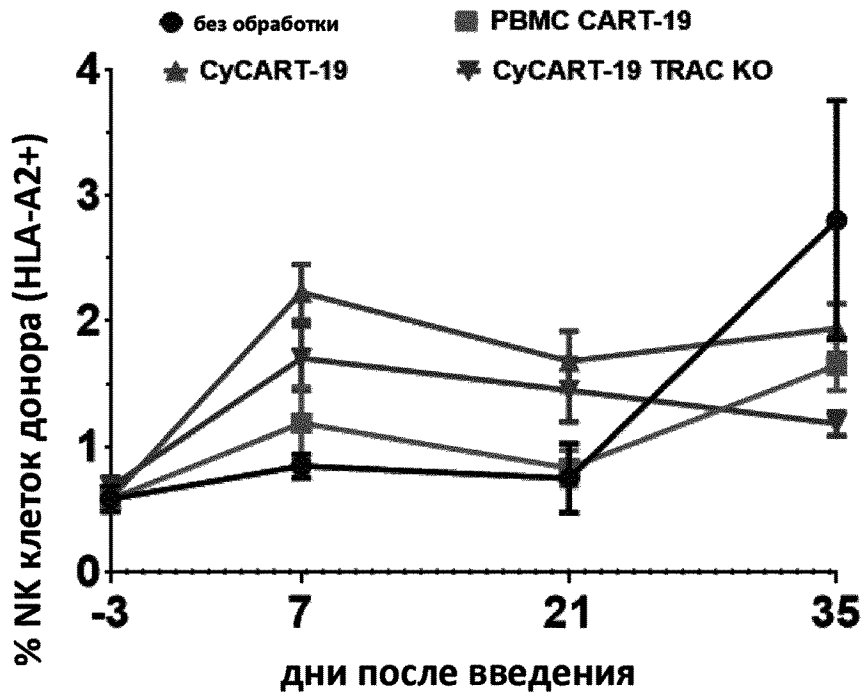
ФИГ. 41

74/74

CD3⁺ %



NK %



ФИГ. 42