

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291917** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.06

(22) Дата подачи заявки
2020.12.11

(51) Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

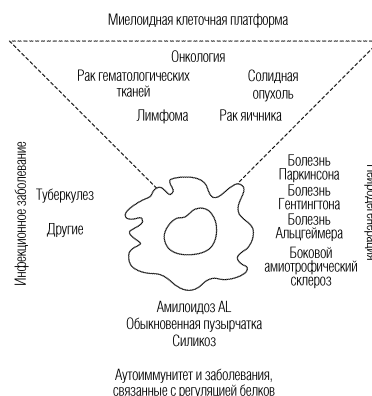
(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ КЛЕТОЧНЫЕ КОМПОЗИЦИИ, ИХ ПРИМЕНЕНИЕ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 62/946,896; 16/826,708; 63/003,617;
63/014,068
(32) 2019.12.11; 2020.03.23; 2020.04.01;
2020.04.22
(33) US
(86) PCT/US2020/064686
(87) WO 2021/119538 2021.06.17
(71) Заявитель:
МАЙЭЛОИД ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Геттс Дэниэл, Ван Юйсяо, Бизариа
Намита, Аустген Катрин, Моррисон
Харви Кейтлин Энн, Таварес Патрик
Мендес (US)

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

(57) Изобретение относится к композициям и способам получения и применения рекомбинантных фагоцитарных клеток-киллеров для иммунотерапии рака или инфекционных заболеваний посредством экспрессии химерного антигенного рецептора, обладающего повышенной фагоцитарной активностью, при этом химерный рецептор кодируется рекомбинантной нуклеиновой кислотой.



202291917

A1

A1

202291917

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ КЛЕТОЧНЫЕ КОМПОЗИЦИИ, **ИХ ПРИМЕНЕНИЕ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ**

ОПИСАНИЕ

Перекрестные ссылки

[0001] В настоящей заявке испрашивается приоритет по заявке США № 16/826 708, поданной 23 марта 2020 г., по предварительной заявке США № 62/946 896, поданной 11 декабря 2019 г., по предварительной заявке США № 63/003 617, поданной 1 апреля 2020 г., и по предварительной заявке США № 63/014,068, поданной 22 апреля 2020 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

[0001.1] Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII была создана 19 января 2021 года под именем 56371-708_601_SL.txt и имеет размер 85,789 байт.

Уровень техники

[0002] Циркулирующие моноциты представляют собой универсальную и динамичную клеточную популяцию, состоящую из нескольких подмножеств, которые различаются по фенотипу, размеру, морфологии и профилям транскрипции и определяются их локализацией в крови. Эти дискретные подмножества моноцитов у людей можно различить по экспрессии CD14 и CD16, а у мышей – по экспрессии Ly6C, CCR2 и CX3CR1. У людей CD14⁺CD16⁻ (классические) моноциты составляют примерно 85% циркулирующего пула моноцитов, тогда как оставшиеся ~15% состоят из CD14⁺CD16⁺ (промежуточных) и CD14^{lo}CD16⁺ (неклассических) моноцитов. Аналогично, у мышей были описаны две популяции моноцитов: Ly6C^{hi} CCR2⁺ CX3CR1^{int} и Ly6C^{lo} CCR2⁻ CX3CR1^{hi}, представляющие собой классические и неклассические моноциты, соответственно. Для эмиграции моноцитов из костного мозга требуется экспрессия хемокинового рецептора CCR2, который ограничен CD14⁺CD16⁻-классическими моноцитами.

[0003] Миелоидные клетки эффективно рекрутируются к участку инфекции или патогенеза. Классические моноциты быстро рекрутируются к участкам, где присутствует рак, инфекции, аутоиммунные поражения и повреждения, причем моноциты проявляют значительную функциональную пластичность, дифференцируясь в ряд нижестоящих

клеток, таких как дендритные клетки и макрофаги. В стационарном состоянии классические моноциты пополняют резидентные периферические клетки, происходящие из моноцитов. Однако некоторые эндогенные факторы и факторы тканевого окружения оказывают влияние на эффективность макрофагов и регулируют ее при уничтожении патогена и поддержании сильного иммунного ответа при помощи иммунологической памяти.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

[0004] Клеточная терапия с использованием миелоидных клеток, включая макрофаги и дендритные клетки, привлекательна для разработки, поскольку эти клетки действуют как мостик между врожденным и адаптивным иммунитетом. С одной стороны, объединение воспалительных активностей этих клеток, включая, например, фагоцитоз, продукцию цитокинов, продукцию хемокинов, презентацию/перекрестную презентацию антигена и активацию Т-клеток, может произвести революцию в лечении рака. Использование иммунорегуляторных способностей этих клеток также перспективно для лечения многочисленных аутоиммунных заболеваний, а также нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и другие нарушения накопления белка.

[0005] В настоящем документе предложены композиции и способы использования миелоидных клеток, в частности, подкласса миелоидных клеток в качестве вакцин или в качестве терапевтических противомикробных средств. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка, в частности подкласс миелоидных клеток, описанный в заявке, подвергается дополнительным преобразованиям *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка, в частности, подкласс миелоидных клеток, дополнительно модифицируется для экспрессии рекомбинантного белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки получают от донора-человека. В некоторых вариантах осуществления миелоидная клетка используется для аутологичной клеточной терапии.

[0006] Предыдущее применение миелоидных клеток в терапевтическом контексте обычно относилось к дендритным клеткам. Дендритные клетки использовались в качестве вакцин для иммунотерапии. Дендритные клетки для такого применения обычно получали из моноцитов или макрофагов *ex vivo*.

[0007] Исторически получение макрофагов и дендритных клеток зависело от положительного отбора моноцитов CD14⁺ из крови и последующего культивирования в MCSF (макрофаги) или GMCSF+IL4 (или другие факторы) в течение более 5 дней. Этот процесс приводит к созреванию моноцитов в макрофаги или дендритные клетки,

соответственно. Этот процесс приводит к изменениям в этих клетках, которые снижают многие ключевые функции, необходимые для миграции в очаги заболевания. Такие клетки использовались для противоопухолевых вакцин и других целей. Хотя эти клетки, по-видимому, обладают сильными функциональными способностями *in vitro*, при введении их хозяевам возникает множество проблем, в том числе: короткая продолжительность жизни при повторном введении людям; подавление важных хемокиновых рецепторов, необходимых для проникновения в места воспаления/опухоли, что приводит к плохому перемещению; необходимость культивирования более 5 дней (обычно по меньшей мере 7 дней) для подготовки их к применению *in vivo*.

[0008] Эти проблемы потенциально привели к субоптимальным результатам в клинических исследованиях, в которых тестировали применение макрофагов и ДК. Это произошло не потому, что исходные клетки не были способны оказывать действие, а потому, что процессы, используемые для получения этих клеток, снизили их активность. Описанные здесь процессы фокусируются на использовании активности CD14⁺ моноцитов без изменения их внутренних способностей. Описанные здесь процессы фокусируются на использовании активности моноцитов CD14⁺/CD16⁻ без изменения их внутренних способностей.

[0009] С учетом вышеизложенного, в настоящем документе предлагаются способы и композиции для получения из биологического образца, полученного от человека, например крови (без необходимости какой-либо формы мобилизации стволовых клеток), популяции миелоидных клеток, которые демонстрируют способность дифференцироваться в нижестоящие клетки-предшественники, способность перемещаться к участкам рака, инфекции, воспаления, нейродегенеративных и аутоиммунных поражений, а также способность дифференцироваться в ряд нижестоящих эффекторных клеток. Эти клетки могут быть модифицированы с использованием химерного антигенного рецептора и/или для экспрессии растворимых факторов и/или для презентации молекул и антигенов другим звеньям иммунной системы, при этом клетки сохраняют свои функции предшественников и способность дифференцироваться *in vivo*.

[0010] В настоящем документе также предлагаются способы и композиции для создания пула миелоидных клеток, которые можно сконструировать или модифицировать для терапевтических целей (например, для загрузки антигеном, модификации с помощью CAR и т. д.).

[0011] Кроме того, в настоящем документе предлагаются способы получения пула миелоидных клеток, которые можно замораживать и размораживать для последующего использования (например, как указано выше).

[0012] В настоящем документе предложена композиция, содержащая *ex vivo* популяцию CD14+/CD16- клеток, где популяция CD14+/CD16- клеток представляет собой популяцию клеток, полученную генно-инженерным путем, и/или содержащую экзогенный агент.

[0013] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция клеток CD14+/CD16- представляет собой популяцию клеток человека.

[0014] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция клеток *ex vivo* представляет собой CD11b+ клетки и CD14+ клетки, в которых отсутствует экспрессия CD16.

[0015] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция клеток представляет собой популяцию неполяризованных или недифференцированных миелоидных клеток.

[0016] В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую белок или пептид, который экспрессируется в клетке из популяции CD14+/CD16- клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенный агент не индуцирует или не препятствует плюрипотентности или стволовости или индукции этих процессов в клетке или в соседних клетках.

[0017] В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP). В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP содержит: (i) внеклеточный антигенсвязывающий домен и (ii) трансмембранный домен, где внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен функционально связаны. В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP содержит: (а) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, и (б) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP дополнительно содержит один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов, функционально связанных с трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления изобретения белок или пептид, экспрессируемый на поверхности мембраны, содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном или болезнетворным агентом. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой раковый антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой микробный патогенный антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP содержит внутриклеточный домен, полученный из фагоцитарного рецептора или рецептора-мусорщика. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов

содержат домен рекрутирования киназы. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен представляет собой CD5-связывающий домен или HER2-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен получают из CD8 трансмембранного домена, CD28 трансмембранного домена или CD68 трансмембранного домена.

[0018] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует белок или пептид, усиливающий иммунный ответ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует биспецифический или триспецифический активатор. В некоторых вариантах осуществления изобретения белок или пептид содержит один или несколько антигенов или их фрагментов. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген из одного или несколько антигенов слит с эндосомальной нацеливающей последовательностью. В некоторых вариантах осуществления антиген из одного или нескольких антигенов содержит секреторную последовательность. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует первый антиген, который слит с эндосомальной нацеливающей последовательностью, и второй антиген, содержащий секреторную последовательность.

[0019] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует белок или пептид, который секретируется клеткой в популяции CD14+/CD16-клеток.

[0020] В некоторых вариантах осуществления изобретения первый антиген и второй антиген кодируются одним и тем же геном.

[0021] В некоторых вариантах осуществления изобретения белок или пептид представляет собой эндосомально процессированный белок.

[0022] В некоторых вариантах осуществления изобретения белок или пептид представляет собой эпитоп антигена, который экспонируется на клеточной поверхности.

[0023] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой вирусный, бактериальный антиген, антиген простейших или грибов.

[0024] В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую белок или пептид, который представляет собой цитоплазматический белок или пептид.

[0025] В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую белок или пептид, который является иммуногенным.

[0029] В некоторых вариантах осуществления изобретения *ex vivo* популяция человеческих клеток состоит по меньшей мере из 1×10^7 клеток.

[0030] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая (a) популяцию человеческих клеток, содержащую рекомбинантную нуклеиновую кислоту, причем рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), причем (i) по меньшей мере 50% клеток в популяции человеческих клеток представляют собой CD14+ и CD16- клетки, и (ii) менее 10% клеток в популяции человеческих клеток представляют собой дендритные клетки; и (b) фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD11b+ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD14+/CD11b+ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD11b+/CD16- клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD14+/CD11b+/CD16- клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD56+ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее 50 %, менее 20 %, менее 10 % или менее 5 % клеток в популяции клеток представляют собой CD56+ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD42b+ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее 50%, менее 20%, менее 10% или менее 5% клеток в популяции клеток представляют собой CD42b+ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее 50%, менее 20%, менее 10% или менее 5% клеток в популяции клеток представляют собой CD3+ клетки.

[0031] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления изобретения, описанных выше, где CFP содержит: (a) внеклеточный домен, содержащий: (i) scFv, который специфически связывается с CD5 или HER2, и (ii) шарнирный домен, полученный из CD8 или CD28, или внеклеточного домена CD68, или их часть; (b) CD8 трансмембранный домен, CD28 трансмембранный домен или CD68 трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный домен, содержащий по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена, при этом по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена содержат (i) первый внутриклеточный сигнальный домен, полученный из FcγR или FcεR, и (ii) второй внутриклеточный сигнальный домен, который: (A) содержит домен рекрутирования PI3-киназы (PI3K) или (B) получен из CD40.

[0032] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция клеток человека представляет собой клетки, полученные генно-инженерным путем *ex vivo*.

[0033] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая: (a) популяцию человеческих клеток, содержащую рекомбинантную нуклеиновую кислоту, причем рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую последовательность, кодирующую антигенный пептид, где: (i) по меньшей мере 50% клеток в популяции человеческих клеток представляет собой CD14⁺ и CD16⁻ клетки, и (ii) менее 10% клеток в популяции человеческих клеток представляют собой дендритные клетки; и (b) фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD11b⁺. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD14⁺/CD11b⁺ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD11b⁺/CD16⁻ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD14⁺/CD11b⁺/CD16⁻ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD56⁺ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее 50 %, менее 20 %, менее 10 % или менее 5 % клеток в популяции клеток представляют собой CD56⁺ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD42b⁺ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее 50%, менее 20%, менее 10% или менее 5% клеток в популяции клеток представляют собой CD42b⁺ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее 50%, менее 20%, менее 10% или менее 5% клеток в популяции клеток представляют собой CD3⁺ клетки.

[0034] В некоторых вариантах осуществления изобретения CD14⁺ и CD16⁻ клетки из популяции человеческих клеток экспонируют микробный антиген или его фрагмент, соединенный с молекулой МНС класса I или молекулой МНС класса II на клеточной поверхности.

[0035] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую антигенный пептид, выбранный из группы, состоящей из CMVpp65 пептида, мутантного пептида R132H изоцитратдегидрогеназы 1 (IDH) пептида, TRP2 пептида и антигенного пептида SARS-CoV-2.

[0036] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует первый антиген, слитый с эндосомальной нацеливающей последовательностью, и второй антиген, содержащий секреторную последовательность.

[0037] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген эндосомально процессируется клетками CD14+ и CD16-.

[0038] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки популяции человеческих клеток выделяют из биологического образца субъекта.

[0039] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки выделяют из периферической крови.

[0040] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки сконструированы *ex vivo*.

[0041] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит популяцию клеток, где (а) по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CCR2+ и/или CCR5+ клетки; (б) по крайней мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD63+ клетки; (с) по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD56-, CD3- и/или CD19- клетки; и (d) менее 40% клеток в популяции клеток представляют собой клетки-макрофаги.

[0042] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция клеток представляет собой популяцию неполяризованных или недифференцированных миелоидных клеток.

[0043] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит от примерно 10^7 клеток до примерно 10^{10} клеток.

[0044] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки фармацевтической композиции подвергались двум или менее циклам замораживания/оттаивания.

[0045] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки фармацевтической композиции культивировали *ex vivo* в течение менее 48 часов после выделения из биологического образца или его обогащения.

[0046] В некоторых вариантах осуществления изобретения жизнеспособность клеток фармацевтической композиции перед введением составляет более 80%, более 85%, более 90% или более 95%.

[0047] В настоящем документе предложен способ лечения микробной инфекции у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

[0048] В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно, до введения, включает подготовку CD14+ и CD16- клеток, экспрессирующих микробный антиген, причем способ включает: (i) выделение CD14+ и CD16- клеток из биологического

образца или их обогащение, (ii) введение в клетку рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую по меньшей мере один антиген, для экспрессии и презентации антигена на поверхности клетки.

[0049] В настоящем документе предложен способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

[0050] В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно включает подготовку CD14⁺ и CD16⁻ клеток, экспрессирующих CFP, до введения, причем способ включает: (i) выделение CD14⁺ и CD16⁻ клеток из биологического образца или их обогащение, (ii) введение в клетку рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую CFP.

[0051] В некоторых вариантах осуществления изобретения введение в клетку рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает проведение электропорации клетки.

[0052] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой РНК.

[0053] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

[0054] В некоторых вариантах осуществления изобретения до введения в клетку рекомбинантную нуклеиновую кислоту связывают с одним или несколькими липидами в водной смеси.

[0055] В некоторых вариантах осуществления изобретения до введения клетки фармацевтической композиции подвергают двум или менее циклам замораживания/оттаивания.

[0056] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки фармацевтической композиции культивируют *ex vivo* в течение менее 48 часов до введения.

[0057] В некоторых вариантах осуществления изобретения в течение 48 часов после введения в клетки рекомбинантной нуклеиновой кислоты при культивировании *in vitro* фармацевтическую композицию вводят человеку или замораживают для последующего введения.

[0058] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяцию человеческих клеток культивируют *ex vivo* в течение менее 36 часов, менее 24 часов, менее 18 часов, менее 12 часов или менее 6 часов до введения.

[0059] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит в популяции клеток по меньшей мере 10^7 клеток.

[0060] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит в популяции клеток по меньшей мере 10^8 клеток.

[0061] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит в популяции клеток по меньшей мере 10^9 клеток.

[0062] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию вводят однократно.

[0063] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию вводят более одного раза.

[0064] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию вводят один раз каждые две недели, один раз каждые 4 недели, один раз каждые 6 недель, один раз каждые 8 недель, один раз каждые 10 недель, один раз каждые 12 недель, один раз каждые 16 недель, один раз каждые 20 недель, один раз каждые 20 недель, один раз каждые 24 недели или один раз в год.

[0065] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки являются аутологичными по отношению к субъекту.

[0066] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки фармацевтической композиции могут: (a) после введения субъекту дифференцироваться в эффекторные клетки; (b) после введения проникать в пораженный участок субъекта или мигрировать в пораженный участок субъекта; и/или (c) после введения субъекту имеют продолжительность жизни по меньшей мере 5 дней.

[0067] В настоящем документе предлагается применение описанной здесь композиции для получения терапевтического средства на основе клеток для лечения заболевания или состояния, при этом заболевание или состояние представляет собой рак, инфекцию или аутоиммунное заболевание. В настоящем документе предлагается применение описанной здесь композиции для лечения рака, инфекционного заболевания или аутоиммунного заболевания.

[0068] В настоящем документе предложен способ отрицательной селекции клеток для получения описанной здесь фармацевтической композиции, причем способ включает: (a) приведение биологического образца, взятого у человека, в контакт с антителом к CD16 и одним или несколькими антителами, выбранными из анти-CD56 антитела, анти-CD3-антитела и анти-CD19-антитела, и (b) отбор клеток биологического образца, которые не связались с анти-CD16-антителом, не связались с анти-CD56-антителом, анти-CD3-антителом и/или анти-CD19-антителом, (c) введение в клетки, отобранные на стадии (b), рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую CFP, с получением популяции клеток, где: (i) по меньшей мере 50% клеток в популяции

клеток представляют собой CD14⁺ клетки и CD16⁻ клетки, и (ii) менее 10% клеток в популяции клеток представляют собой дендритные клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает проточную цитометрию или сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

[0069] В настоящем документе предложена вакцинная композиция, содержащая популяцию CD14⁺/CD16⁻ клеток, содержащую рекомбинантную нуклеиновую кислоту, где клетки культивировали *ex vivo* в течение менее 48 часов.

[0070] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит эндосомальную нацеливающую последовательность, при этом эндосомальная нацеливающая последовательность представляет собой LAMP1 последовательность.

[0071] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит секреторную последовательность, которая представляет собой последовательность секреторного сигнального пептида сигнальной последовательности человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), сигнальной последовательности тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина, сигнальной последовательности легкой цепи человеческого иммуноглобулина, сигнальной последовательности человеческого сывороточного альбумина, сигнальной последовательности человеческого азуроцидина или сигнальной последовательности человеческого цистатина.

[0072] В настоящем документе предложен способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом человека, включающий: введение человеку описанной здесь фармацевтической композиции.

[0073] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция CD14⁺/CD16⁻ клеток представляет собой полученную генно-инженерным путем популяцию клеток, которые были генетически модифицированы для обеспечения стабильной экспрессии экзогенного гена. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация может быть проведена для стабильной интеграции гена или его фрагмента в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения для стабильной интеграции гена или его фрагмента в геном клетки может быть использована система транспозонов. В некоторых вариантах осуществления изобретения транспозон представляет собой ретротранспозон.

[0074] В настоящем документе предложена композиция, содержащая популяцию клеток, причем популяция клеток представляет собой полученную генно-инженерным путем популяцию миелоидных клеток человека и/или содержит экзогенный агент, причем более 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD14⁺ и/или CD16⁻ клетки и при этом:

(a) более 50% клеток в популяции клеток экспрессируют CCR2 и/или CCR5; (b) более 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD63+ клетки; (c) более 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD56-, CD3- и/или CD19- клетки; (d) менее 40% клеток в популяции клеток представляют собой клетки-макрофаги и/или менее 10% клеток в популяции клеток представляют собой дендритные клетки (DC); и/или (e) экзогенный агент содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) или антигенный пептид, и/или (f) в популяции клеток передача тонического сигнала через CAR отсутствует.

[0075] В настоящем документе предложена композиция, содержащая популяцию клеток, причем популяция клеток представляет собой полученную генно-инженерным путем популяцию CD14+ и/или CD16- клеток, и где (a) популяция клеток представляет собой неполяризованные миелоидные клетки; (b) после введения субъекту популяция клеток дифференцируется в эффекторные клетки; (c) после введения популяция клеток проникает в пораженный участок субъекта или мигрирует в пораженный участок субъекта; и/или (d) после введения субъекту популяция клеток имеет продолжительность жизни по меньшей мере 5 дней.

[0076] В настоящем документе также предложена фармацевтическая композиция, содержащая описанную здесь композицию и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0077] В настоящем документе также предложен способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий: введение нуждающемуся в этом субъекту описанной здесь фармацевтической композиции.

[0078] В настоящем документе предложен способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий: введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей популяцию клеток, где популяция клеток представляет собой полученную генно-инженерным путем популяцию клеток, и/или содержит экзогенный агент, причем популяция клеток представляет собой CD14+, CD11b+ и/или CD16- клетки, и где: (a) фармацевтическую композицию вводят субъекту в течение 72 часов после (i) введения в популяцию клеток экзогенного агента или (ii) получения популяции клеток генно-инженерным путем; (b) популяцию миелоидных клеток культивируют *ex vivo* в течение менее 48 дней до введения; (c) популяцию клеток получают способом, который не включает мобилизацию стволовых клеток; и/или (d) популяцию клеток получают негативной селекцией.

[0079] В настоящем документе предложен способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий: введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей миелоидную клетку, где миелоидная клетка (a) характеризуется

одним или несколькими из: (i) сильной экспрессией CD14; (ii) низкой или недетектируемой экспрессией CD16; (iii) экспрессией CCR2 и/или CCR5; (iv) способностью дифференцироваться в несколько подтипов миелоидной линии при воздействии одного или нескольких подходящих стимулов; и (b) содержит экзогенный агент, причем при модификации экзогенным агентом *ex vivo* экзогенный агент не изменяет состояние дифференциации или поляризации миелоидной клетки.

[0080] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CD16⁻ (CD16-отрицательную) или CD16^{low} (с низким содержанием CD16).

[0081] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CD16⁻ клетку.

[0082] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CD14⁺ (CD14-положительную) клетку.

[0083] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CD11b⁺ (CD11b-положительную) клетку.

[0084] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CCR2⁺ (CCR2-положительную) и/или CCR5⁺ (CCR5-положительную) клетку.

[0085] В некоторых вариантах осуществления изобретения после введения фармацевтической композиции субъекту миелоидная клетка способна дифференцироваться в эффекторную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения после введения фармацевтической композиции миелоидная клетка способна мигрировать в пораженный участок тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения после введения фармацевтической композиции миелоидная клетка способна проникать в пораженный участок субъекта.

[0086] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CD14⁺/CCR2⁺ (CD14 и CCR2 дважды положительную) клетку.

[0087] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CD14⁺/CCR5⁺ (CD14 и CCR5 дважды положительную) клетку.

[0088] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CD14⁺/CCR2⁺/CCR5⁺ (CD14, CCR2 и CCR5 трижды положительную) клетку.

[0089] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CD63⁺ (CD63-положительную) клетку.

[0090] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой эффекторную миелоидную клетку, содержащую экзогенный агент или модифицированную *ex vivo*; например, модифицированную для обеспечения экспрессии экзогенного гена, например, подвергнутую геномной модификации для обеспечения стабильной экспрессии экзогенной нуклеиновой кислоты, или временной экспрессии экзогенной нуклеиновой кислоты, или иным образом *ex vivo* модифицированную агентом для выполнения функции, при этом любая такая модификация не направлена на индукцию, ингибирование или изменение стволовости или способности клеток к самообновлению, путей старения или изменения путей дифференциации.

[0091] В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, пептид, углевод, липид или малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенный агент содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую пептид, где пептид представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), например CFP, описанный в настоящем документе.

[0092] В некоторых вариантах осуществления изобретения на момент введения фармацевтической композиции миелоидную клетку культивируют *in vitro* менее 2 дней.

[0093] В некоторых вариантах осуществления изобретения на момент введения фармацевтической композиции миелоидная клетка сохраняет клеточную пластичность.

[0094] В некоторых вариантах осуществления изобретения на момент введения миелоидная клетка экспрессирует CAR.

[0095] В некоторых вариантах осуществления изобретения на момент введения фармацевтической композиции в миелоидной клетке не происходит тонической передачи сигналов посредством CAR, CFP или антигенного пептида.

[0096] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяцию миелоидных клеток получают способом, включающим воздействие *in vitro* на выделенное множество миелоидных клеток.

[0097] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяцию миелоидных клеток получают способом, который не включает мобилизацию стволовых клеток.

[0098] В некоторых вариантах осуществления изобретения множество миелоидных клеток выделяют из биологического образца путем негативной селекции с использованием опосредованного антителами связывания одной или нескольких миелоидных клеток в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения негативную селекцию проводят с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления изобретения множество выделенных миелоидных клеток представляют

собой (i) CD3- (отрицательные), (ii) CD16- (отрицательные) или CD16low, (iii) CD19- (отрицательные); (iv) CD56- (отрицательные); и (v) CD14+ (положительные). В некоторых вариантах осуществления изобретения множество выделенных миелоидных клеток представляют собой CD11b+, CD14+, CD16-, CD3-, CD19-, CD56- и CD42b- клетки.

[0099] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция миелоидных клеток представляет собой CD16-/CD56-/CD3-/CD19-клетки, которые получены посредством негативной селекции множества миелоидных клеток из биологического образца.

[0100] В некоторых вариантах осуществления изобретения биологический образец представляет собой образец периферической крови. В некоторых вариантах осуществления изобретения биологический образец представляет собой образец, полученный в результате афереза. В некоторых вариантах осуществления изобретения биологический образец является гетерологичным или аутологичным по отношению к субъекту, которому вводят фармацевтическую композицию, содержащую миелоидную клетку.

[0101] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% миелоидных клеток из популяции миелоидных клеток являются недифференцированными. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% миелоидных клеток из популяции миелоидных клеток являются неполяризованными. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция миелоидных клеток содержит моноциты M0. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция миелоидных клеток содержит моноциты M1. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция миелоидных клеток содержит моноциты M2.

[0102] В некоторых вариантах осуществления изобретения субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или состояние выбрано из рака, инфекции, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания, метаболического заболевания, нейродегенеративного заболевания и моногенного, полигенного или многофакторного заболевания или расстройства. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или состояние представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или состояние представляет собой бактериальную, вирусную, микологическую или паразитарную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или состояние представляет собой нейродегенеративное заболевание.

[0103] В настоящем документе предложен способ выделения или обогащения терапевтически эффективных миелоидных клеток, включающий: (а) негативную селекцию терапевтически эффективных миелоидных клеток из биологического образца, содержащего миелоидные клетки, путем (i) контакта биологического образца с одним или несколькими

антителами, включающими анти-CD16 антитело, анти-CD56 антитело, анти-CD3 антитело и/или анти- CD19 антитело, и (ii) отбор или выделение клеток биологического образца, которые не связаны одним или несколькими антителами, тем самым выделяя или концентрируя терапевтически эффективные миелоидные клетки, которые остаются относительно не поврежденными в результате осуществления способа.

[0104] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективные миелоидные клетки выделяют из биологического образца с помощью положительной селекции. Например, терапевтически эффективные миелоидные клетки могут быть выделены из биологического образца при помощи связывания клеток с анти-CD14 антителом.

[0105] В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенные терапевтически эффективные миелоидные клетки представляют собой CD14⁺ клетки.

[0106] В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенные терапевтически эффективные миелоидные клетки представляют собой CD14^{hi} клетки.

[0107] В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенные терапевтически эффективные миелоидные клетки представляют собой CD11b⁺ клетки.

[0108] В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенные терапевтически эффективные миелоидные клетки представляют собой CD16⁻ или CD16^{low} клетки.

[0109] В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенные терапевтически эффективные миелоидные клетки сохраняют способность дифференцироваться в подмножества миелоидной линии в ответ на подходящий стимул.

[0110] В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенные терапевтически эффективные миелоидные клетки способны к дальнейшей дифференциации в поляризованные моноциты, макрофаги, DC1, DC2, DC3, DC4, DC5, DC6 дендритные клетки или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенные терапевтически эффективные миелоидные клетки сохраняют способность поляризоваться в фенотипы M1 и M2 в ответ на подходящий стимул.

[0111] В настоящем документе предложен способ получения популяции миелоидных клеток для лечения нуждающегося в этом субъекта, включающий: (i) выделение или обогащение множества миелоидных клеток из биологического образца, при этом множество миелоидных клеток проявляет клеточную пластичность; (ii) *in vitro* воздействие на множество миелоидных клеток, выделенных из биологического образца, с использованием экзогенного агента и получение популяции миелоидных клеток; при этом *in vitro* воздействие не изменяет клеточную пластичность множества миелоидных клеток;

и (iii) получение терапевтической композиции, содержащей популяцию миелоидных клеток и приемлемый эксципиент.

[0112] В некоторых вариантах осуществления изобретения субъектом является человек.

[0113] В некоторых вариантах осуществления изобретения биологический образец представляет собой образец периферической крови, образец, полученный в результате афереза, образец, полученный в результате лейкофереза, или образец пуповинной крови. В некоторых вариантах осуществления изобретения биологический образец получают от субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения биологический образец получают от подходящего донора-человека.

[0114] В некоторых вариантах осуществления изобретения выделение или обогащение множества миелоидных клеток из биологического образца включает выделение или обогащение CD14⁺ клеток с помощью негативной селекции.

[0115] В некоторых вариантах осуществления изобретения негативная селекция достигается путем контакта клеток в человеческом образце с одним или несколькими антителами, выбранными из группы, состоящей из анти-CD16 антитела, анти-CD56 антитела, анти-CD3 антитела и анти-CD19 антитела, и иммобилизации или удаления из человеческого образца клеток, которые связаны с одним или несколькими антителами.

[0116] В некоторых вариантах осуществления изобретения негативную селекцию проводят с помощью проточной цитометрии или FACS.

[0117] В некоторых вариантах осуществления изобретения множество миелоидных клеток, выделенных из биологического образца, представляют собой CD14⁺ клетки и не экспрессируют CD3, CD19, CD56, CD42b и/или CD16.

[0118] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки являются недифференцированными или неполяризованными.

[0119] В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, пептид, углевод, липид или малую молекулу.

[0120] В некоторых вариантах осуществления изобретения воздействие включает генно-инженерную модификацию множества миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения воздействие включает введение во множество миелоидных клеток рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую пептид.

[0121] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой РНК.

[0122] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

[0123] В некоторых вариантах осуществления изобретения при введении нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую пептид, популяция миелоидных клеток экспрессирует пептид.

[0124] В некоторых вариантах осуществления изобретения пептид представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

[0125] В некоторых вариантах осуществления изобретения пептид содержит: (i) трансмембранный домен; (ii) внеклеточную область, содержащую по меньшей мере мишень-связывающий домен, который связывается с поверхностным компонентом второй клетки; и (iii) внутриклеточную область, содержащую один или несколько сигнальных доменов.

[0126] В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая клетка представляет собой больную клетку или раковую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения больная клетка представляет собой инфицированную клетку.

[0127] В некоторых вариантах осуществления изобретения пептид содержит по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный домен фагоцитоза.

[0128] В некоторых вариантах осуществления изобретения внутриклеточный фагоцитарный сигнальный домен функционально связан с внеклеточным связывающимся с мишенью доменом, и активируется при связывании внеклеточного связывающего мишень домена с поверхностным компонентом второй клетки.

[0129] В некоторых вариантах осуществления изобретения введение рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает введение посредством электропорации или нуклеопорации. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает введение посредством химической доставки. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота стабильно инкорпорирована в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения инкорпорация осуществляется посредством активации одного или нескольких ферментов, выбранных из транспозазы, интегразы, эндонуклеазы, рекомбиназы и обратной транскриптазы.

[0130] В некоторых вариантах осуществления изобретения получение композиции включает суспендирование клеток в фармацевтически приемлемом эксципиенте.

[0131] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция миелоидных клеток сохраняет клеточную пластичность и способность дифференцироваться в несколько миелоидных линий после воздействия подходящих стимулов.

[0132] В некоторых вариантах осуществления изобретения в популяции миелоидных клеток отсутствует тоническая передача сигналов с помощью CAR. Популяция миелоидных клеток, описанная выше, может экспрессировать функциональный CAR и способна к CAR-опосредованному антиген-специфическому ответу. В некоторых вариантах осуществления изобретения приемлемый эксципиент представляет собой буфер, среду для культивирования клеток, содержащую питательные вещества, ДМСО, глицерин или их комбинацию.

[0133] В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию замораживают для последующего использования. В некоторых вариантах осуществления изобретения *ex vivo* способ адаптирован для проведения менее чем за 12 часов, менее чем за 10 часов, менее чем за 8 часов, менее чем за 6 часов, менее чем за 4 часа или менее чем за 2 часа. В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию замораживают в течение 1, или 2, или 3, или 4 часов после введения экзогенной рекомбинантной нуклеиновой кислоты в выделенные клетки.

[0134] В некоторых вариантах осуществления изобретения способ занимает 2 часа или менее.

[0135] В некоторых вариантах осуществления изобретения множество миелоидных клеток подвергают генной модификации и/или изменению, в результате чего получают популяцию миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения множество миелоидных клеток вводят в контакт с одним или несколькими антигенными пептидами, с получением популяции миелоидных клеток, нагруженных антигеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция миелоидных клеток может быть получена примерно за 6 часов или менее. В некоторых вариантах осуществления изобретения полученная популяция миелоидных клеток является недифференцированной или неполяризованной, проявляет клеточную пластичность и/или в ней отсутствует тоническая передача сигналов.

[0136] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция миелоидных клеток для клеточной терапии включает любой один или несколько из: (a) более примерно 50% живых клеток в популяции, которые представляют собой CD14+CD16- клетки; (b) более примерно 50% живых клеток в популяции, которые представляют собой CCR2+ и/или CCR5+ клетки; (c) менее 50% живых клеток в популяции, которые экспрессируют один или несколько из CD64, CD68, CD80, CD86, CD163, CD206, CD200R, CD31, CD71, CLEC9A, CD1C и AXL/SIGLEC6; (d) моноцит M0, (e) моноцит M1, (f) моноцит M2, (g) дендритную клетку и (h) пре-дендритную клетку или дендритную клетку-предшественник.

[0137] В настоящем документе предложена популяция миелоидных клеток для применения в клеточной терапии, включающая недифференцированные или неполяризованные клетки, которые были выделены из биологического образца и подвергнуты дальнейшим воздействиям *in vitro* с использованием внешнего агента, выбранного из рекомбинантной нуклеиновой кислоты, пептида, углевода, соединения и малой молекулы, где миелоидные клетки в популяции миелоидных клеток представляют собой CD14⁺CD16⁻ клетки; или представляют собой CD14^{hi} и CD16^{lo} клетки; и проявляют одно или несколько из следующих: (i) клеточную пластичность, (ii) способность дифференцироваться в несколько миелоидных линий, (iii) способность мигрировать *in vivo* в пораженную ткань, (iv) способность инфильтрировать больную ткань и (v) способность изолировать и/или разрушать больную клетку, ткань или организм.

[0138] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяцию миелоидных клеток выделяют с помощью негативной селекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, пептид, углевод, липид или малую молекулу.

[0139] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка из популяции миелоидных клеток содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту с последовательностью, кодирующей пептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка из популяции миелоидных клеток содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту с последовательностью, кодирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка из популяции миелоидных клеток экспрессирует CAR, проявляющий CAR-опосредованную активацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка из популяции миелоидных клеток экспрессирует CAR и в ней отсутствует тоническая передача сигналов с помощью CAR.

[0140] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка из популяции миелоидных клеток представляет собой CD14⁺ клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка из популяции миелоидных клеток представляет собой CD16⁻ клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка из популяции миелоидных клеток представляет собой CD14^{high}CD16^{low} клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка из популяции миелоидных клеток представляет собой CD56⁻ клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка из популяции миелоидных клеток представляет собой CD3⁻ клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка из популяции миелоидных клеток представляет собой CD19⁻ клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка из популяции миелоидных клеток экспрессирует один или несколько хемокиновых рецепторов. В

некоторых вариантах осуществления изобретения клетка из популяции миелоидных клеток экспрессирует CCR2. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка из популяции миелоидных клеток экспрессирует CCR5. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка из популяции миелоидных клеток экспрессирует CCR2 и CCR5. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка из популяции миелоидных клеток представляет собой CD14⁺ и CD16-CD56-CD3-CD19⁻ клетку.

[0141] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая популяцию миелоидных клеток.

[0142] В настоящем документе предложена популяция миелоидных клеток для применения в терапии рака.

[0143] В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем документе предложена популяция миелоидных клеток для применения в терапии нейродегенеративных заболеваний. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка в популяции проявляет повышенную иммуногенность после введения в качестве клеточной терапии по сравнению с клеткой, на которую не воздействовали *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка в популяции проявляет повышенную клеточную миграцию в пораженную ткань после введения в качестве клеточной терапии по сравнению с клеткой, на которую не воздействовали *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка в популяции проявляет повышенную фагоцитарную активность после введения в качестве клеточной терапии по сравнению с клеткой, на которую не воздействовали *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка в популяции проявляет повышенную цитотоксичность после введения в качестве клеточной терапии по сравнению с клеткой, на которую не воздействовали *in vitro*.

[0144] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция миелоидных клеток предназначена для применения в качестве монотерапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция миелоидных клеток предназначена для применения в составе комбинированной терапии.

[0145] В настоящем документе предложен способ получения человеческих миелоидных клеток для лечения нуждающегося в этом человека, включающий: (i) получение множества миелоидных клеток, содержащих недифференцированные или неполяризованные миелоидные клетки, из аллогенного или аутологичного биологического образца с помощью отрицательной селекции с использованием множества антител, содержащих по меньшей мере анти-CD16 антитело, анти-CD3 антитело, анти-CD56 антитело и анти-CD19 антитело; (ii) конструирование, культивирование, стабилизацию, активацию, обогащение и/или

размножение клеток, полученных на стадии (i); и (iii) введение клеток со стадии (ii) субъекту; причем промежуток времени от получения на стадии (i) до введения на стадии (iii) составляет менее примерно 3 дней.

[0146] В некоторых вариантах осуществления изобретения биологический образец представляет собой образец периферической крови.

[0147] В некоторых вариантах осуществления изобретения биологический образец представляет собой образец, полученный в результате афереза.

[0148] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки со стадии (ii) представляют собой CD14⁺CD16⁻ или CD14^{hi} и CD16^{lo} клетки.

[0149] В одном аспекте в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая (a) популяцию клеток, содержащих рекомбинантную нуклеиновую кислоту, где рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), или последовательность, кодирующую антигенный пептид, причем: (i) по крайней мере 60% клеток в популяции клеток представляют собой CD14⁺ и CD16⁻ клетки, и (ii) менее 10% клеток в популяции клеток представляют собой дендритные клетки; и (b) фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CCR2⁺ и/или CCR5⁺ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD63⁺ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD56⁻, CD3⁻ и/или CD19⁻ клетки, и при этом менее 40% клеток в популяции клеток представляют собой клетки-макрофаги.

[0150] В одном из аспектов в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая (a) популяцию клеток, содержащую рекомбинантную нуклеиновую кислоту, где рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), или последовательность, кодирующую антигенный пептид, причем: (i) не менее 70% клеток в популяции клеток представляют собой CD14⁺ и CD16⁻ клетки, и (ii) менее 10% клеток в популяции клеток представляют собой дендритные клетки; и (b) фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CCR2⁺ и/или CCR5⁺ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD63⁺ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD56⁻, CD3⁻ и/или

CD19- клетки, и при этом менее 40% клеток в популяции клеток представляют собой клетки-макрофаги.

[0151] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки, описанные в настоящем документе, модифицированы *ex vivo* для получения вакцины. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки модифицируют для получения профилактической вакцины. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки модифицируют для получения терапевтической вакцины. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный полинуклеотид инкорпорирован в миелоидную клетку, описанную выше, где миелоидная клетка представляет собой CD14+ клетку, например, CD14+/CD16- клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка экспрессирует пептид или белок, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует один или несколько антигенов патогена, например микробного патогена, такого как патогенный вирус или вирусная частица, бактерии, грибковый патоген, плазмодиальный патоген и другие.

[0152] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный полинуклеотид содержит последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие один или несколько вирусных эпитопов. Полинуклеотиды инкорпорированы в миелоидную клетку, как описано в данной заявке, причем миелоидная клетка представляет собой CD14+ клетку, например, CD14+/CD16- клетку. Затем миелоидная клетка экспрессирует вирусный антиген на своей поверхности. Вирусный антиген презентруется лимфоциту, чтобы активировать иммунную реакцию. Такие миелоидные клетки, экспрессирующие вирусный антиген, могут быть дополнительно модифицированы для усиления одной или нескольких функций миелоидных клеток, например миграции, образования цитокинов и/или воспалительного ответа. Описанные здесь миелоидные клетки могут эффективно мигрировать в лимфатические узлы, где экспрессированные антигены презентуются большому количеству Т-клеток, для создания устойчивого иммунитета. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки, описанные в настоящем документе, могут экспрессировать высокие уровни хемокиновых рецепторов, таких как рецепторы CCR2, для эффективной миграции в лимфатические узлы. Лимфатические узлы не только содержат лимфоциты, но также являются резервуарами наивных Т-клеток, которые способствуют выработке новой специфичности Т-клеток к антигену, презентируемому миелоидной клеткой.

[0153] В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеиновая кислота содержит последовательность, которая кодирует полноразмерный вирусный белок,

например вирусный антигенный белок. Полинуклеиновую кислоту инкорпорируют в миелоидную клетку для экспрессии вирусных антигенов или антигенных эпитопов. В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеиновая кислота содержит последовательность, которая кодирует рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный белок содержит несколько антигенных эпитопов, где один или несколько антигенов или антигенных эпитопов кодируются последовательно. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит промежуточные последовательности между двумя последовательностями, кодирующими эпитоп, где промежуточные последовательности могут быть линкерами, например, линкерами, имеющими последовательности, чувствительные к действию посттрансляционной пептидазы. В некоторых вариантах осуществления изобретения продукт трансляции нуклеиновой кислоты способен к упрощенному переносу в лизосомы и деградации на эпитопы и презентируется на поверхности миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота содержит таг или пептид, которые облегчают лизосомальную доставку.

[0154] В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеиновая кислота содержит последовательности, кодирующие несколько последовательностей эпитопов.

[0155] В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус представляет собой вирус гриппа. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус представляет собой вирус гепатита С (HCV). В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус представляет собой ВИЧ, ВПЧ, вирус Денге, вирус герпеса, CMV или любой подходящий вирус. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус представляет собой коронавирус.

[0156] В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус представляет собой коронавирус. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирусный антиген представляет собой коронавиральный антиген, например антиген шиповидного белка (S), антиген нуклеопротеина (NP или N), антиген неструктурного белка (NSP).

[0157] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяцию миелоидных клеток получают для разработки вакцины, как описано в настоящем документе, причем миелоидную клетку в популяции миелоидных клеток дополнительно модифицируют путем инкорпорирования в клетку полинуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую экзогенный или рекомбинантный белок или пептид, и миелоидная клетка экспрессирует рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), где CFP содержит внеклеточный домен и трансмембранный

домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения в популяции миелоидных клеток отсутствует передача тонических сигналов через CFP. В некоторых вариантах осуществления изобретения внеклеточный домен содержит область, которая может связываться с патогеном или патогенным антигеном.

[0158] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую CFP, где CFP содержит: (a) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, и (b) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен представляет собой CD5-связывающий домен или HER2-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP дополнительно содержит внутриклеточный домен, полученный из фагоцитарного рецептора или рецептора-мусорщика. В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP содержит: (a) внеклеточный домен, содержащий: (i) scFv, который специфически связывается с CD5 или HER2, и (ii) шарнирный домен, полученный из CD8 или CD28, или внеклеточный домен CD68, или его часть; (b) трансмембранный домен CD8, трансмембранный домен CD28 или трансмембранный домен CD68; и (c) внутриклеточный домен, содержащий по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена, где по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена содержат (i) первый внутриклеточный сигнальный домен, полученный из FcγR или FcεR, и (ii) второй внутриклеточный сигнальный домен, который: (A) содержит домен рекрутирования PI3-киназы (PI3K) или (B) получен из CD40.

[0159] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую антигенный пептид, где антигенный пептид представляет собой CMVpp65 пептид.

[0160] В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен представляет собой антитело или его функциональный фрагмент, который связывается с патогенным антигеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка, экспрессирующая химерный слитый белок, доставляется в организм, такой как организм человека, пациента или субъекта для терапии, при этом миелоидная клетка может связываться с патогеном в организме, например, человека или субъекта, фагоцитирует и лизует патоген; тем самым снижая патогенную нагрузку или устраняя патогенную нагрузку из ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидную клетку дополнительно модифицируют для усиления ее фагоцитарной функции. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка экспрессирует один или несколько активирующих факторов, иммуногенов, цитокинов или хемокинов для

активации миелоидной клетки аутокринным образом или для активации соседних иммунных клеток паракринным образом. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка, экспрессирующая химерный слитый белок, может связываться с патогеном, фагоцитировать и лизировать патоген и представлять антиген резидентным Т-клеткам, которые активируют мощный иммунный ответ и иммунологическую память.

[0161] В одном аспекте в настоящем документе предложен способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий: введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей миелоидную клетку, описанную выше. Введение может проводиться локально или системно. Введение может быть осуществлено подкожно, внутривенно или другими подходящими способами.

[0162] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки в популяции клеток: (a) после введения субъекту дифференцируются в эффекторные клетки; (b) после введения проникают в пораженный участок субъекта или мигрируют в пораженный участок субъекта; или (c) после введения субъекту имеют продолжительность жизни по меньшей мере 5 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция клеток получена от субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию вводят субъекту в течение 72 часов после введения в популяцию клеток рекомбинантной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция клеток культивируется *ex vivo* в течение менее 48 часов перед введением.

[0163] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки, описанные в настоящем документе, например CD14⁺ клетки, например, CD14⁺/CD16⁻ клетки, описанные в настоящем документе, выделяют, как описано в описании и примерах, и нагружают вирусными антигенами, например антигенами коронавируса, и используют для введения нуждающемуся в этом субъекту. Такие миелоидные клетки эффективно презентуют антигены Т-клеткам *in vivo* и, поэтому могут быть непосредственно использованы для вакцинации субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки, описанные в настоящем документе, такие как описанные в настоящем документе CD14⁺/CD16⁻ клетки, нагружены вирусными антигенами или антигенными пептидами, например антигенами коронавируса или антигенными пептидами, и могут быть использованы для стимуляции Т-клеток *ex vivo*, например, в условиях *in vitro* стимуляции Т-клеток, а стимулированные Т-клетки, в свою очередь, используют для терапии.

[0164] В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем документе описана популяция миелоидных клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного гена, например, CFP, или антигена, или антигенсвязывающего белка, кодируемого рекомбинантной нуклеиновой кислотой, для применения в клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем документе описана популяция миелоидных клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного гена, например, CFP, для применения в иммунотерапии, например, в качестве противораковых вакцин. В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем документе описана популяция миелоидных клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного гена, например, CFP, для получения фармацевтической композиции. Популяция миелоидных клеток может содержать рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую экзогенный белок, например CFP, или антиген, при этом популяция миелоидных клеток экспрессирует экзогенный белок, и по меньшей мере 50% клеток в популяции представляют собой CD14⁺ и CD16⁻ клетки, и менее 10% клеток в популяции представляют собой дендритные клетки.

[0165] В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные в настоящем документе полинуклеотидные конструкции, которые кодируют один или несколько антигенных пептидов, можно использовать непосредственно для вакцинации субъекта, например, путем внутривенного введения полинуклеиновой кислоты в подходящей дозе и с подходящим интервалом времени. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные в настоящем документе полинуклеотидные конструкции, которые кодируют один или несколько антигенных пептидов, могут быть использованы для получения антигенов, например, посредством трансляции *in vitro*, и могут быть использованы в качестве антигенов для вакцинации нуждающегося в этом субъекта, например, путем внутривенного введения антигенных пептидов в подходящей дозе и с подходящим интервалом времени.

[0166] В одном аспекте в настоящем документе предложена фармацевтическая вакцинная композиция, содержащая *ex vivo* популяцию человеческих клеток, содержащую рекомбинантную нуклеиновую кислоту, где рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), при этом: (i) по меньшей мере 50% клеток в *ex vivo* популяции человеческих клеток представляют собой CD14⁺ и CD16⁻-клетки, и (ii) менее 10% клеток в *ex vivo* популяции человеческих клеток представляют собой дендритные клетки; и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в *ex vivo* популяции человеческих клеток представляют собой CCR2⁺ и/или CCR5⁺ клетки. В

некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в *ex vivo* популяции человеческих клеток представляют собой CD63+ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в *ex vivo* популяции человеческих клеток представляют собой CD56-, CD3- и/или CD19- клетки.

[0167] В некоторых вариантах осуществления изобретения менее 40% клеток в *ex vivo* популяции человеческих клеток являются клетками-макрофагами.

[0168] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая вакцинная композиция содержит *ex vivo* популяцию человеческих клеток, где по меньшей мере 50% клеток в *ex vivo* популяции человеческих клеток представляют собой CCR2+ и/или CCR5+ клетки; по меньшей мере 50% клеток в *ex vivo* популяции человеческих клеток представляют собой CD63+ клетки; по меньшей мере 50% клеток в *ex vivo* популяции человеческих клеток представляют собой CD56-, CD3- и/или CD19- клетки; и/или менее 40% клеток в *ex vivo* популяции человеческих клеток представляют собой клетки-макрофаги.

[0169] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит мРНК.

[0170] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую CFP, и в *ex vivo* популяции человеческих клеток отсутствует передача тонического сигнала через CFP. В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP содержит: (a) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, и (b) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом.

[0171] В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен представляет собой CD5-связывающий домен или HER2-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP дополнительно содержит внутриклеточный домен, полученный из фагоцитарного рецептора или рецептора-мусорщика. В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP содержит: (a) внеклеточный домен, содержащий: scFv, который специфически связывается с CD5 или HER2, и шарнирный домен, полученный из CD8, или CD28, или внеклеточный домен CD68, или его часть; (b) трансмембранный домен CD8, трансмембранный домен CD28 или трансмембранный домен CD68; и (c) внутриклеточный домен, содержащий по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена, при этом по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена содержат первый внутриклеточный сигнальный домен, полученный из FcγR или FcεR, и второй внутриклеточный сигнальный домен, который содержит домен рекрутирования PI3-киназы (PI3K) или получен из CD40.

[0172] Также в настоящем документе предложен описанный в настоящем документе способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта человека, причем способ включает: введение описанной в настоящем документе фармацевтической композиции субъекту-человеку.

[0173] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки *ex vivo* популяции человеческих клеток: (a) после введения субъекту дифференцируются в эффекторные клетки; (b) после введения проникают в пораженный участок субъекта или мигрируют в пораженный участок субъекта; или (c) после введения субъекту имеют продолжительность жизни по меньшей мере 5 дней.

[0174] В некоторых вариантах осуществления изобретения *ex vivo* популяция человеческих клеток получена от субъекта-человека.

[0175] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию вводят субъекту-человеку в течение 72 часов после того, как рекомбинантная нуклеиновая кислота была введена в *ex vivo* популяцию человеческих клеток или замораживают для последующего использования. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию вводят субъекту-человеку в течение 48 часов после того, как рекомбинантная нуклеиновая кислота была введена в *ex vivo* популяцию человеческих клеток или замораживают для последующего использования. В некоторых вариантах осуществления изобретения *ex vivo* воздействие на клетки ограничено менее чем 72 часами, менее чем 48 часами, менее чем 36 часами или менее чем 24 часами в целом. В некоторых вариантах осуществления изобретения *ex vivo* популяцию человеческих клеток культивируют *ex vivo* в течение менее 48 часов до введения.

[0176] В некоторых аспектах в настоящем документе предложен способ отрицательной селекции клеток для получения фармацевтической композиции, способ включает: (a) приведение в контакт биологического образца, взятого у человека, с анти-CD16 антителом и одним или несколькими антителами, выбранными из анти-CD56 антитела, анти-CD3 антитела и анти-CD19 антитела, и (b) сбор клеток биологического образца, которые не связались с анти-CD16 антителом и не связаны с одним или несколькими антителами, (c) введение рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую CFP в клетки, собранные на стадии (b), с получением популяции клеток, где: (i) по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD14+ и CD16 клетки, и (ii) менее 10% клеток в популяции клеток представляют собой дендритные клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает проточную цитометрию.

[0177] В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен представляет собой раковый антигенсвязывающий домен.

[0178] В некоторых вариантах осуществления изобретения *ex vivo* популяция человеческих клеток фармацевтического препарата включает по меньшей мере 1×10^7 клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен представляет собой раковый антигенсвязывающий домен.

[0179] Дополнительные аспекты и преимущества настоящего раскрытия для специалистов в данной области техники со всей очевидностью будут следовать из последующего подробного описания, в котором показаны и описаны только иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения. Как будет понятно, настоящее раскрытие может быть реализовано в других или отличающихся вариантах осуществления изобретения, и некоторые его детали допускают модификации в различных очевидных аспектах, все без отступления от настоящего раскрытия. Соответственно, фигуры и описание следует рассматривать как иллюстративные по своему характеру, а не как ограничивающие.

Включение посредством ссылки

[0180] Все публикации, патенты и заявки на получение патента, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы в отношении каждой отдельной публикации, патента или заявки на получение патента было конкретно и в индивидуальном порядке указано, что они включены посредством ссылки. В тех случаях, когда публикации и патенты или заявки на получение патента, включенные посредством ссылки, противоречат раскрытию, содержащемуся в описании, описание предназначено для замены и/или имеет преимущество в отношении любого такого противоречащего материала.

Краткое описание чертежей

[0181] Новые признаки изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет получено при обращении к последующему подробному описанию, в котором излагаются иллюстративные варианты осуществления изобретения, в которых используются принципы изобретения, и прилагаемым чертежам (здесь также «фиг.»), из которых:

[0182] На **ФИГ.1** представлен схематический обзор клинического способа, касающегося выделенных миелоидных клеток.

[0183] На **ФИГ. 2** изображена схематическая диаграмма, показывающая примеры применения описанных здесь миелоидных эффекторных клеток.

[0184] На **ФИГ. 3** представляет собой схематическое изображение потенциала дифференцировки клеток, экспрессирующих высокие уровни CD14 (CD14^{hi} клетки).

[0185] На **ФИГ. 4** приведены таблицы, показывающие общее количество использованных клеток и клеток, выделенных с помощью опосредованной антителами селекции, выделения или обогащения CD14⁺ клеток из продукта, полученного в результате афереза, а также процентное содержание указанных клеточных подтипов. Верхняя панель – до селекции; нижняя панель – после селекции.

[0186] На **ФИГ. 5А** показаны данные, полученные при проведении проточной цитометрии до выделения или обогащения CD14⁺ клеток. Клетки анализировали на маркеры CD14, CD16, CD19 и CD56.

[0187] На **ФИГ. 5В** показаны данные, полученные при проведении проточной цитометрии после выделения или обогащения CD14⁺ клеток. Клетки анализировали на маркеры CD14, CD16, CD19 и CD56.

[0188] На **ФИГ. 6** показаны данные, полученные при проведении проточной цитометрии после выделения или обогащения CD14⁺ клеток. Клетки анализировали на маркеры CD14 и CD56.

[0189] На **ФИГ. 7** показаны данные, демонстрирующие дифференцировку CD14⁺ клеток в M0, M1 и M2 клетки в присутствии стимулов поляризации.

[0190] На **ФИГ. 8А** показаны микрофотографии M0, M1 и M2 поляризованных CD14⁺ клеток при культивировании в течение 24 часов в присутствии стимулов поляризации.

[0191] На **ФИГ. 8В** показаны микрофотографии M0, M1 и M2 поляризованных CD14⁺ клеток при культивировании в течение 48 часов в присутствии стимулов поляризации.

[0192] На **ФИГ. 9А** показаны данные проточной цитометрии для экспрессии CD206 в CD14⁺ клетках в присутствии стимулов поляризации.

[0193] На **ФИГ. 9В** показаны данные проточной цитометрии для экспрессии CD14 и CD16 в CD14⁺ клетках в присутствии стимулов поляризации.

[0194] На **ФИГ. 9С** показаны данные проточной цитометрии для экспрессии CCR2 в CD14⁺ клетках в присутствии стимулов поляризации.

[0195] На **ФИГ. 10** представлено схематическое изображение получения эффекторных миелоидных клеток.

[0196] На **ФИГ. 11** показаны данные проточной цитометрии, демонстрирующие экспрессию CAR в CD14⁺ клетках в указанное время после введения рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

[0197] На **ФИГ. 12** представлена схематическая диаграмма обработки CD14⁺ клеток поляризационным стимулом для проверки поляризационного потенциала клеток.

[0198] На **ФИГ. 13А** показаны данные проточной цитометрии, демонстрирующие изменения уровней экспрессии CD14 (слева) и CD16 (справа) в клетках, экспрессирующих или не экспрессирующих CAR, и в присутствии стимула поляризации.

[0199] На **ФИГ. 13В** показаны данные проточной цитометрии, демонстрирующие изменения уровней экспрессии CD206 (слева) и CD163 (справа) в клетках, экспрессирующих или не экспрессирующих CAR, и в присутствии стимула поляризации.

[0200] На **ФИГ. 13С** показаны данные проточной цитометрии, демонстрирующие изменения уровней экспрессии PDL1 (слева) и CCR2 (справа) в клетках, экспрессирующих или не экспрессирующих CAR, и в присутствии стимула поляризации.

[0201] На **ФИГ. 13D** показаны данные проточной цитометрии, демонстрирующие изменения уровней экспрессии МНСI (вверху) и МНСII (внизу) в клетках, экспрессирующих или не экспрессирующих CAR, и в присутствии стимула поляризации.

[0202] На **ФИГ. 14А** представлена схема последовательности операций для типичного функционального анализа: клетки ТНР-1, экспрессирующие HER-2-специфичный CAR, стимулируют поляризационным стимулом, приводят в контакт с гранулами, покрытыми HER2, и анализируют высвобождение цитокинов и хемокинов в ТНР-1 клетках с использованием набора для мультиплексного анализа Luminox.

[0203] На **ФИГ. 14В** показаны данные, полученные в результате анализа ТНР-1 клеток с использованием Luminox в иллюстративном эксперименте, аналогичном приведенному на фиг. 14А для указанных хемокинов.

[0204] На **ФИГ. 14С** представлена схема последовательности операций для типичного функционального анализа: выделенные человеческие миелоидные клетки, экспрессирующие HER-2-специфичный CAR, стимулировали поляризационным стимулом, приводили в контакт с гранулами, покрытыми HER2, и анализировали высвобождение цитокинов и хемокинов миелоидными клетками с использованием набора для мультиплексного анализа Luminox.

[0205] На **ФИГ. 14D** показаны данные, полученные в результате анализа выделенных миелоидных клеток человека с использованием Luminox в иллюстративном эксперименте, аналогичном описанному на фиг. 14С для указанных хемокинов.

[0206] На **ФИГ. 15А** представлена схема последовательности операций для типичного функционального анализа: эффекторные миелоидные клетки, экспрессирующие HER-2-специфичный CAR, стимулировали поляризационным стимулом, приводили в контакт с опухолевыми клетками, экспрессирующими HER2, или опухолевыми клетками, не экспрессирующими HER-2 (например, клетками H9), и анализировали высвобождение цитокинов и хемокинов HER-2-CAR миелоидными клетками с использованием набора для

мультиплексного анализа Luminex. В качестве альтернативы эффекторные миелоидные клетки, экспрессирующие C5-CAR, подвергали такой же обработке и приводили в контакт с H9 Т-клетками лимфомы или нелимфомными клетками (например, опухолевыми клетками, экспрессирующими HER-1) и анализировали, как описано выше.

[0207] На **ФИГ. 15Bi** показаны данные, полученные в результате анализа Luminex в эксперименте, описанном на **ФИГ. 15A**, для секреции CCL3, IL6 и IL10.

[0208] На **ФИГ. 15Bii** показаны данные, указывающие на то, что уровни CD80 или CD206 не изменяются при обработке, указанной на фиг. 15A.

[0209] На **ФИГ. 16A** показаны результаты анализа фагоцитоза. Клетки THP-1 трансдуцировали HER-2-специфичным CAR, который содержит внеклеточную субъединицу FLAG (обнаруженную с помощью анти-FLAG антитела, меченого зеленой флуоресценцией), и приводили в контакт с экспрессирующими HER-2 клетками SKOV3 (линия клеток рака яичников), которые экспрессируют красный флуоресцентный белок. Дизайн CAR графически представлен на рисунке слева. Клетки THP-1 стимулировали РМА или контролем. Визуализацию проводили после конъюгации FLAG с флуоресцентным антителом.

[0210] На **ФИГ. 16B** показаны результаты анализа фагоцитоза с использованием трансдуцированных лентивирусом первичных эффекторных миелоидных клеток, экспрессирующих HER-2-специфичный CAR, и проточной цитометрии, выполненной для количественной оценки миелоидных клеток, поглощенных опухолью.

[0211] На **ФИГ. 16C** показаны результаты анализа фагоцитоза на полученных с помощью микроскопа изображениях, где миелоидные клетки (макрофаги, красный флуоресцентный) поглощают негативную мишень для фагоцитоза, клетки Jurkat, или положительную мишень, экспрессирующие HER-2 SKOV3 клетки-мишени (опухолевые клетки, зеленый).

[0212] На **ФИГ. 17A** представлена схема последовательности действий для создания модели опухоли *in vivo* у мышей с последующими пятью инфузиями эффекторных миелоидных клеток, экспрессирующих опухолеспецифичный CAR. Также были проведены исследования выживаемости, цитометрический анализ и визуализирующие исследования. В одном репрезентативном эксперименте мыши сгруппированы, как показано.

[0213] На **ФИГ. 17B** показаны результаты биовизуализации, показывающие регрессию опухоли у мышей в репрезентативном эксперименте после инфузионного введения одной или трех доз миелоидных клеток по схеме, показанной на **ФИГ. 17A**.

[0214] На **фиг. 17C** и **17D** показаны количественные оценки регрессии опухоли в эксперименте, показанном на **фиг. 17A** и **17B**.

[0215] На **ФИГ. 18A-18B** показаны результаты проточной цитометрии указанных клеточных фракций, полученные во время получения CD5-положительных CAR клеток с использованием протокола 1.

[0216] На **ФИГ. 19A-19B** показаны результаты проточной цитометрии указанных клеточных фракций, полученные во время получения CD5-положительных CAR клеток с использованием протокола 2.

[0217] На **ФИГ. 20** показаны иллюстративные данные, демонстрирующие изменения экспрессии CD14 и CD16 в CD14+/CD16- клетках, трансдуцированных вирусным вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CFP, в течение указанного периода времени.

[0218] На **ФИГ. 21A** показаны иллюстративные данные, демонстрирующие живые клетки, и данные о жизнеспособности после электропорации (EP) ночных культур CD14+/CD16- клеток в присутствии M-CSF (левые столбики) или GM-CSF (правые столбики). Клетки собирали до электропорации (Pre-EP) или после mock-электропорации, или электропорации с рекомбинантной нуклеиновой кислотой, кодирующей один из четырех связывающих CD5 CFP конструкторов: конструктор CD5-FcR-PI3K, конструктор CD5-FcR-CD40, конструктор CD5-FcR-MDA5, конструктор CD5-FcR-MyD88, соответствующие наборы данных обозначены как FcR-PI3K, FcR-CD40, FcR-MDA5 и FcR-MyD88, соответственно.

[0219] На **ФИГ. 21B** показаны иллюстративные данные, полученные в результате проточной цитометрии, демонстрирующие уровни экспрессии каждого CFP конструктора, связывающего CD5 (CD5-CFP), когда клетки культивировали в течение ночи в присутствии M-CSF (верхняя панель) или GM-CSF (нижняя панель). На вставке внизу показаны количественные данные в виде точечной диаграммы, отображенные на рисунке в виде гистограммы. Для каждого набора данных: левый столбец — культивирование с M-CSF; правый столбец — культивирование с GM-CSF.

[0220] На **ФИГ. 21C** показаны иллюстративные данные, которые демонстрируют индекс фагоцитоза (%) для каждого набора данных, приведенного на **ФИГ. 21A** или **21B**. Для каждого набора данных: левый столбец — культивирование с M-CSF; правый столбец — культивирование с GM-CSF.

[0221] На **ФИГ. 21D** показаны иллюстративные данные секреции цитокинов для указанной каждой группы. Для каждого набора: левый столбец — культивирование с M-CSF; правый столбец — культивирование с GM-CSF.

[0222] На **ФИГ. 22** показаны иллюстративные данные, полученные в результате проточной цитометрии, показывающие клетки, которые экспрессируют CFP, связывающий CD5 (C5-

CFP) (слева) или CFP, связывающий HER2 (HER2 CFP) (справа), и экспрессию CD14 и CD16.

[0223] На **ФИГ. 23** показаны данные, полученные в результате проточной цитометрии для типичного производственного клеточного цикла в соответствии со способом по настоящему изобретению, показывающие клетки, которые экспрессируют связывающий CD5 CFP через 24 часа после электропорации. Показан эффект культивирования клеток либо в мешках, либо в разных колбах (колба 1 и колба 2).

[0224] На **ФИГ. 24** показаны данные, полученные в результате проточной цитометрии для типичного производственного клеточного цикла в соответствии со способом по настоящему изобретению, показывающие клетки от донора-человека после отмывания, которые иллюстрируют процентное содержание CD14, CD16, CD11b и CD3 клеток по сравнению с цельной кровью донора.

[0225] На **ФИГ. 25A-25D** показаны результаты для типичного производственного клеточного цикла в соответствии со способом по настоящему изобретению, показывающие клетки от одного донора, которые были заморожены после электропорации и протестированы через 0 часов после оттаивания. **ФИГ. 25A** вверху: проточная цитометрия для CD14+ клеток, **ФИГ. 25A** внизу: проточная цитометрия для CD16+ клеток; **ФИГ. 25B** вверху: проточная цитометрия для CD11b+ клеток, **ФИГ. 25B** внизу: проточная цитометрия для CD3+ клеток. **ФИГ. 25C**: экспрессия CFP, связывающего CD5, в клетках через 0 часов после оттаивания (справа). Слева, контроль, трансдуцированный mock. На **ФИГ. 25D** показано окрашивание клеток маркером апоптоза 7AAD, зафиксированное с помощью проточной цитометрии. UNT - нетрансфицированный, CD5 - трансдуцированный CD5-связывающий набор, Mock – трансфицированный mock. UNT и Mock — представляют собой контроли, используемые на рисунке.

[0226] На **ФИГ. 26** показаны результаты примерного производственного клеточного цикла в соответствии со способом по настоящему изобретению, демонстрирующие качество клеток после трансфекции, крайний слева столбец - гейтирование моноцитов; второй столбец - процент отдельных клеток; третий столбец - процент живых клеток; крайний правый столбец - экспрессия CFP, связывающего CD5.

[0227] На **ФИГ. 27A** показана низкая продукция цитокинов в клетках, в которые была доставлена мРНК, кодирующая CFP.

[0228] На **ФИГ. 27B** показана длительная экспрессия CFP в клетках, в которые была доставлена мРНК, кодирующая CFP.

[0229] На **ФИГ. 28** представлен типичный график зависимости относительных единиц флуоресценции (RFU) от времени после инкубации первичных человеческих моноцитов,

экспрессирующих анти-CD5 CFP, с CCL2 в указанных концентрациях, или инкубации без клеток. Увеличение в несколько раз по сравнению с контролем отражает соотношение индуцированного CCL2 хемотаксиса по сравнению с клетками, обработанными только буфером для анализа. Каждая точка на графике представляет собой среднее значение $\pm$ стандартное отклонение для двух повторных ячеек.

[0230] На **ФИГ. 29** представлено полученное с помощью микроскопа флуоресцентное изображение, показывающее биовизуализацию образца опухоли, который был удален через 24 часа после того, как NSG-мышам с опухолью MSTO вводили CD14+клетки, меченые CFSE, полученные от здорового донора Leukorak и трансдуцированные лентивирусным вектором, кодирующим CFP, содержащим внеклеточный HER2-связывающий домен (scFv), внеклеточный Flag-хвост, внеклеточный шарнирный домен, полученный из CD8, CD8 трансмембранный домен, первый внутриклеточный сигнальный домен, полученный из FcR γ , и второй внутриклеточный сигнальный домен, содержащий домен рекрутирования PI3K. Было обнаружено, что трансдуцированные клетки мигрируют в опухоль и накапливаются вокруг опухолевых клеток.

[0231] На **ФИГ. 30** представлены графики, показывающие, что лигирование рецептора запускает повышенные и устойчивые провоспалительные фенотипы.

[0232] На **ФИГ. 31** изображен график с иллюстративными результатами анализа рекрутирования Т-клеток с использованием кондиционированных сред.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

[0233] Все термины следует понимать так, как их понимает специалист в данной области техники. Если не указано иное, все используемые здесь технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится раскрытие.

[0234] Используемые здесь заголовки разделов предназначены только для организационных целей и не должны толковаться как ограничивающие описываемый объект изобретения.

[0235] Хотя различные признаки настоящего изобретения могут быть описаны в контексте единственного варианта осуществления, эти признаки также могут использоваться отдельно или в любой подходящей комбинации. И наоборот, хотя настоящее изобретения в целях ясности может быть описано здесь в контексте нескольких отдельных вариантов осуществления, изобретение также может быть реализовано в одном варианте осуществления.

[0236] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное раскрытие. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, также могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, здесь описаны предпочтительные способы и материалы. Детали одного или нескольких конкретных вариантов осуществления изобретения приведены в нижеследующем описании.

[0237] По всему тексту описания термин «около» или «приблизительно» означает нахождение в допустимом диапазоне ошибок для конкретного значения, определенного специалистом в данной области техники, что будет частично зависеть от того, как значение измеряется или определяется, т.е., от ограничений измерительной системы. Например, в соответствии с практикой в данной области техники, «около» может означать в пределах 1 или более чем 1 стандартного отклонения. Альтернативно, «около» может означать диапазон до 20%, до 10%, до 5% или до 1% от заданного значения. Альтернативно, особенно в отношении биологических систем или процессов, термин может означать значение в пределах порядка, предпочтительно в пределах 5-кратного и более предпочтительно в пределах 2-кратного значения. Когда в заявке и формуле изобретения описаны конкретные значения, если не указано иное, следует считать, что значение термина «около» находится в пределах допустимого диапазона погрешности для конкретной величины. Используемые в данном описании и пункте(ах) формулы изобретения слова «содержащий» (и любые производные слова содержащий, такие как «содержать» и «содержит»), «имеющий» (и любые производные слова имеющий, такие как «иметь» и «имеет»), «включающий» (и любые производные слова включающий, такие как «включает» и «включать») или «содержащий в себе» (и любые производные словосочетания «содержащий в себе», такие как «содержит» и «содержат») являются неограничивающими или открытыми и не исключают дополнительных, неуказанных элементов или стадий способа. Предполагается, что любой вариант осуществления изобретения, обсуждаемый в этом описании, может быть реализован в отношении любого способа или композиции, приведенной в описании, и наоборот. Кроме того, композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для реализации способов по настоящему изобретению.

[0238] «Агент» представляет собой любое низкомолекулярное химическое соединение, антитело, молекулу нуклеиновой кислоты или полипептид или их фрагменты.

[0239] «Изменение» или «замена» — представляет собой увеличение или уменьшение. Изменение может быть всего на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30% или на 40%, 50%, 60% или даже на 70% %, 75%, 80%, 90% или 100%.

[0240] «Антиген» представляет собой молекулу, способную стимулировать иммунный ответ. Антигены, распознаваемые Т-клетками, будь то хелперные Т-лимфоциты (Т-хелперы (ТН) клетки) или цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), распознаются не как интактные белки, а скорее как небольшие пептиды, которые связываются с белками МНС класса I или класса II на поверхности клеток. В ходе естественного иммунного ответа антигены, которые распознаются в соединении с молекулами МНС класса II на антигенпрезентирующих клетках (APC), поступают снаружи клетки, интернализуются и превращаются в небольшие пептиды, которые связываются с молекулами МНС класса II.

[0241] «Антигенпрезентирующая клетка» или «APC» включает профессиональные антигенпрезентирующие клетки (например, В-лимфоциты, макрофаги, моноциты, дендритные клетки, клетки Лангерганса), а также другие антигенпрезентирующие клетки (например, кератиноциты, эндотелиальные клетки, астроциты, фибробласты, олигодендроциты, эпителиальные клетки тимуса, эпителиальные клетки щитовидной железы, глиальные клетки (мозга), бета-клетки поджелудочной железы и эндотелиальные клетки сосудов). Эти клетки являются фагоцитами. Кроме того, APC экспрессирует молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) и может отображать чужеродный антиген в комплексе с МНС на своей поверхности, чтобы вступать в контакт и распознаваться Т-клетками, что запускает активацию Т-клеток и иммунный ответ. Профессиональные антигенпрезентирующие клетки, особенно дендритные клетки, играют ключевую роль в стимуляции наивных Т-клеток, но непрофессиональные антигенпрезентирующие клетки, такие как фибробласты, также могут вносить свой вклад в этот процесс. APC также могут перекрестно презентировать пептидные антигены путем процессинга экзогенных антигенов и презентации процессированных антигенов на молекулах МНС класса I. Антигены, приводящие к белкам, которые распознаются в ассоциации с молекулами МНС класса I, обычно представляют собой белки, которые продуцируются внутри клеток, и эти антигены подвергаются процессингу и связываются с молекулами МНС класса I.

[0242] «Биологический образец» — это любая ткань, клетка, жидкость или другой материал, полученный из организма. Используемый здесь термин «образец» включает биологический образец, такой как любая ткань, клетка, жидкость или другой материал, полученный из организма.

[0243] Используемый здесь термин «клетка» представляет собой биологическую единицу организма, например, эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка может представлять собой прокариотическую клетку (например, бактерию или клетку водоросли), как это становится ясно из контекста, например, в случае выращивания плазмиды в клетке *E.coli*. В других вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой эукариотическую клетку, такую как клетка млекопитающего, клетка ткани или органа. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой клетку, полученную от пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой клетку лошади, свиньи, кошки, собаки, овцы или любую клетку, полученную из организма. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой миелоидную клетку, такую как моноцит, макрофаг, дендритная клетка, предшественник моноцита, например, CD14+ клетка. В некоторых вариантах осуществления изобретения CD14+ клетка не экспрессирует CD16 (CD14+/CD16-). Клетка, не экспрессирующая CD14, представляет собой CD14- клетку. Специалист в данной области может интерпретировать CD14+ клетку, как клетку миелоидного происхождения. Аналогично, CD3 клетка или взаимозаменяемо обозначаемая, как CD3+ клетка, представляет собой лимфоцит или лимфоидную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка или моноцит может быть антигенпрезентирующей клеткой, фагоцитирующей клеткой или литической клеткой, которая лизует клетку, которую она фагоцитирует.

[0244] Недифференцированная миелоидная клетка может быть миелоидной клеткой-предшественником или клеткой, подобной предшественнику; или клеткой, которая не дифференцировалась в моноциты поздней стадии (например, промежуточный или неклассический фенотип моноцитов), или иметь фенотип макрофагов, или фенотип DC. Неполяризованная миелоидная клетка может быть миелоидной клеткой, которая не была поляризована в фенотипы M1 или M2. Характеристики M1 и M2 хорошо известны в данной области.

[0245] «Химерный рецептор» представляет собой рецептор, который содержит одну или несколько областей, доменов или фрагментов, которые изначально отсутствуют в нативном рецепторе. Например, внеклеточный домен, трансмембранный домен, оба этих домена или их фрагменты могут быть заменены в химерном рецепторе на белок, отличный от белка нативного рецептора, который составляет остальную часть рецептора. Химерный рецептор обычно представляет собой рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный рецептор представляет собой слитый белок. В настоящем документе

«химерный слитый белок» означает слитый белок, в котором один или несколько фрагментов, областей, доменов или их частей, происходящих из нативного белка, заменены одним или несколькими фрагментами, областями, доменами, или их частями, происходящими из одного или более различных ненативных белков. Химерный слитый белок может быть получен посредством слияния различных частей, областей, фрагментов или доменов различных белков. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный слитый белок представляет собой рецептор. В некоторых вариантах осуществления изобретения термин химерный рецептор может взаимозаменяемо использоваться для обозначения химерного слитого белка, при этом химерный слитый белок (CFP) имеет внеклеточный домен (ECD), трансмембранный домен (TM, или TMD, или TD) и/или внутриклеточный домен (ICD). В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP можно взаимозаменяемо называться CAR, химерным антигенным рецептором. В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP или CAR могут представлять собой химерный рецептор, содержащий один или несколько доменов, фрагментов, сегментов или их частей, происходящих из фагоцитарного рецептора. В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP может взаимозаменяемо называться фагоцитарным или связывающим рецептор (PR) слитым белком (PFP). Как правило, CFP получают с помощью технологии рекомбинантных ДНК. CFP представляет собой рекомбинантный белок. Точно так же CAR или PFP получают с помощью технологии рекомбинантных ДНК, и они представляют собой рекомбинантные белки. В некоторых вариантах осуществления изобретения мишенью для химерного рецептора может быть раковый антиген на раковой клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения мишенью может быть CD5. В некоторых вариантах осуществления изобретения мишенью может быть HER2. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения химерный рецептор или химерный слитый белок, который связывается с определенной мишенью, может обозначаться, как «связывающий» мишень, например, CD5-связывающий CFP может называться CD5-связывающим или, взаимозаменяемо, анти-CD5 CFP или анти-CD5 CFP связывающей молекулой. Связывающим, при использовании в данном контексте, может быть CFP, имеющий определенную мишень для связывания.

[0246] Термин «иммунный ответ» включает опосредованные Т-клетками и/или В-клетками иммунные ответы, обусловленные модуляцией костимуляции Т-клеток. Примеры иммунных ответов включают Т-клеточные ответы, например, продукцию цитокинов и клеточную цитотоксичность. Кроме того, термин «иммунный ответ» включает иммунные ответы, на которые косвенно влияет активация Т-клеток, например, производство антител

(гуморальные ответы) и активацию чувствительных к цитокинам клеток, например, макрофагов.

[0247] Термин «электропорация» означает процесс внедрения, например, экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку, сопровождаемый электрическим импульсом, создающим градиент напряжения на клеточной мембране, который позволяет нуклеиновой кислоте временно проникать сквозь мембрану клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения электропорация может проводиться для внедрения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей CFP, в клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления изобретения электропорация может проводиться для внедрения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей CFP, в миелоидную клетку, такую как человеческая миелоидная клетка. Электропорация может представлять собой нуклеопорацию или нуклеофекцию. Как известно специалистам в данной области техники, электропорация может проводиться в соответствии с рекомендациями производителя электропоратора (например, Amaxa Nucleofector Technology, Lonza), основанными на типе клеток и типе и природе встраиваемой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения встраиваемая нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК и РНК (например, мРНК или циркуРНК), и может представлять собой плазмидную ДНК или непротеинизированную ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения электропорация может рассматриваться как форма трансфекции. Количество клеток, среда, программа электропорации и восстановление клеток после электропорации оптимизируются для каждого типа клеток и используемого конструкта.

[0248] Как определено в настоящем документе, термин «эпитоп» включает любую белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом, пептидом антитела и/или антителоподобной молекулой (включая, но не ограничиваясь Т-клеточными рецепторами).

[0249] Используемый в настоящем документе термин «рекрутер» (“engager”) представляет собой полипептид, белок или конъюгированный белок, который содержит связывающий домен для связывания со определенной мишенью, например, с белком клеточной поверхности, антигеном, рецептором и т. п., так что при связывании со своей мишенью рекрутер соединяется с клеткой. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекрутер может содержать два или более специфических связывающих домена, так что он может соединяться с двумя или более мишенями, и когда мишени для связывания находятся в двух или более различных клетках, рекрутер соединяет две или более клетки-мишени, с двумя или более отдельными клетками. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекрутер может содержать два рекрутирующих элемента с двумя

связывающими доменами, специфичными для двух неидентичных мишеней (биспецифический рекрутер). В некоторых вариантах осуществления изобретения рекрутер может содержать три рекрутирующих элемента с тремя разными связывающими доменами, специфичными к трем неидентичным мишеням связывания (триспецифический рекрутер). Биспецифические или триспецифические рекрутеры связываются с мишенями на двух или более типах клеток. Например, один связывающий домен (или связывающийся) может связываться с моноцитом или поверхностным белком клетки макрофага, а другой связывающий домен может связываться с раковой клеткой, инфицированной клеткой или некротизированной клеткой, таким образом, рекрутер соединяет две клетки так, что фагоцитирующая клетка может после этого фагоцитировать клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекрутер взаимодействует с молекулой клеточной поверхности на клетке, что может активировать или деактивировать клетку. Связывающие домены могут содержать те же компоненты, что и связывающие домены, описанные в другом месте, или их фрагменты, например, вариабельный домен, CDR или комбинацию CDR и каркасных областей антитела, или scFv или их фрагменты, которые могут специфически связываться с молекулой-мишенью, такой как антиген, белок клеточной поверхности, рецептор и т. д.

[0250] Рекомбинантная клетка может представлять собой клетку, которая подверглась модификациям для усиления функции, например, с помощью методов генной инженерии, или для экспрессии одного или нескольких экзогенных белков, таких как слитый белок, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетка, в контексте данного документа, относится к миелоидной клетке, которая экспрессирует трансген или которая подверглась редактированию гена. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетка или рекомбинантная миелоидная клетка представляет собой миелоидную клетку, которая экспрессирует рекомбинантный слитый белок, такой как слитый белок фагоцитарного рецептора. В некоторых вариантах осуществления изобретения слитый белок фагоцитарного рецептора, в контексте данного документа (CAR), содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный к антигену клетки-мишени, слитый с фагоцитарным рецептором. Клеткой-мишенью является, например, раковая клетка. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная фагоцитарная клетка после поглощения раковой клетки может презентировать на своей клеточной поверхности раковый антиген для активации Т-клетки.

[0251] Эффекторная миелоидная клетка может представлять собой миелоидную клетку или миелоидную клетку-предшественник, которая функционально подходит для

дальнейшего включения в фармацевтическую композицию для клеточной терапии, которая осуществляется путем введения фармацевтической композиции нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторную миелоидную клетку выделяют из биологического образца (и/или концентрируют), например, как моноклеарные клетки периферической крови, и она может подвергаться дополнительным модификациям, например, для экспрессии трансгена, или содержать экзогенно отредактированный геном, и обладает характеристиками, которые могут включать, но не ограничиваются следующими: способность специфически фагоцитировать и уничтожать клетки-мишени или патогены; способность к дальнейшей дифференцировке в ответ на сигнал, запускающий дифференцировку, способность к дальнейшей активации в ответ на сигнал активации; клетка является относительно долгоживущей, имеет большую продолжительность жизни по сравнению с терминально дифференцированными миелоидными клетками; могут мигрировать в лимфатические узлы при введении *in vivo*.

[0252] «Лиганд» представляет собой молекулу, которая способна образовывать комплекс с рецептором. В соответствии с настоящим изобретением лиганд следует понимать как представляющий собой, например, белок, гликопротеин, углевод, липопротеин или любой компонент, который связывается с рецептором. В некоторых вариантах осуществления изобретения рецептор имеет специфичный лиганд. В некоторых вариантах осуществления изобретения рецептор может неспецифическим образом связываться со своим лигандом, и в этом случае он может связываться с несколькими лигандами, которые сходны, по меньшей мере по структурной конфигурации, распределении заряда или любым другим физико-химическим характеристикам. Лиганд может быть биомолекулой. Лиганд может быть абиотическим материалом, например, TiO_2 является лигандом для рецептора-мусорщика SRA1.

[0253] «Фагоцитоз» в контексте настоящего документа может использоваться взаимозаменяемо с термином «поглощение». Процесс фагоцитоза тесно связан с иммунным ответом и, что наиболее важно, представляет собой первый этап иммунного ответа, которым является презентация антигена. Процессинг экзогенных антигенов следует за их поглощением профессиональными антигенпрезентирующими клетками посредством своего рода эндоцитоза. Фагоцитоз также облегчает презентацию антигена: антигены из фагоцитированных клеток или патогена, в том числе раковые антигены, процессируются и презентуются на клеточной поверхности APC.

[0254] В соответствии с настоящим изобретением, «фагоцитарная клетка» - это клетка, которая экспрессирует рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую фрагмент,

который связывается с антигеном или эпитопом на раковой клетке, поглощает раковую клетку, удаляя ее из организма.

[0255] Термин «антитело» в контексте настоящего документа включает IgG (в том числе IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая IgA1 и IgA2), IgD, IgE, IgM и IgY, и подразумевается, что он включает полноразмерные антитела, в том числе полноразмерные одноцепочечные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты (Fab). Антигенсвязывающие фрагменты антител включают, но не ограничиваются следующими: Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd (состоящий из VH и CH1), одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), одноцепочечные антитела, дисульфид-связанный вариабельный фрагмент (dsFv) и фрагменты, содержащие или VL домен, или VH домен. Антитела могут быть получены из любого животного. Антигенсвязывающие фрагменты антител, в том числе одноцепочечных антител, могут содержать вариабельную(ые) область(и) отдельно или в комбинации со следующими областями: шарнирной областью, CH1, CH2 и CH3 доменами, взятыми целиком или частично. Также включены любые комбинации вариабельной(ых) области(ей) и шарнирной области, CH1, CH2 и CH3 доменов. Антитела могут быть моноклональными, поликлональными, химерными, гуманизированными и человеческими моноклональными и поликлональными антителами, которые, например, специфически связываются с HLA-ассоциированным полипептидом или комплексом HLA-пептид. Специалисту в данной области будет понятно, что для обогащения растворимых белков, таких как растворимые HLA-пептидные комплексы или мембраносвязанные HLA-ассоциированные полипептиды, например, те, что были протеолитически отщеплены от мембраны, подходят различные иммуноаффинные методы. Они включают методики, в которых (1) одно или несколько антител, способных специфически связываться с растворимым белком, иммобилизуют на фиксированном или подвижном субстрате (например, в пластиковых лунках или смоле, латексных или парамагнитных гранулах) и (2) раствор, содержащий растворимый белок из биологического образца, пропускают над покрытым антителами субстратом, что позволяет растворимому белку связаться с антителами. Субстрат с антителом и связанным растворимым белком отделяют от раствора, и, необязательно, антитело и растворимый белок диссоциируют, например, путем изменения pH и/или ионной силы, и/или ионного состава раствора, которым промывают антитела. В качестве альтернативы можно использовать методы иммунопреципитации, в которых антитело и растворимый белок объединяют и позволяют образовать макромолекулярные агрегаты. Агрегаты макромолекул можно отделить от раствора при помощи гель-фильтрации или центрифугированием.

[0256] Термины «пептид» или «полипептид» могут использоваться взаимозаменяемо, и в контексте настоящего документа они могут обозначать «белок», включая, но не ограничиваясь следующими: гликопротеин, липопротеин, клеточный белок или мембранный белок. Полипептид может содержать одну или несколько субъединиц белка. Полипептид может кодироваться рекомбинантной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид может содержать более одного пептида в одной аминокислотной цепи, которые могут быть разделены спейсером, линкером или последовательностью расщепления пептида. Полипептид может представлять собой слитый полипептид. Полипептид или белок может содержать один или несколько доменов. Домен представляет собой структурную часть белка с определенной функцией. Полипептид или белок может содержать один или несколько модулей. Модуль представляет собой домен, или часть домена, или часть белка с определенной функцией. Модуль может быть структурным модулем белка, охарактеризованным его структурными вариантами. Фрагмент представляет собой часть полипептида, белка или нуклеиновой кислоты, имеющую определенную структуру или выполняющую определенную функцию. Например, сигнальный фрагмент представляет собой специфическую единицу в более крупной структуре полипептида или белка или рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая (или, в случае нуклеиновой кислоты, кодируемый ей фрагмент белка) участвует в процессе передачи сигнала, например, при фосфорилировании. Термины «модуль», «домен» и «фрагмент» в контексте настоящего документа, могут использоваться взаимозаменяемо, если иное конкретное структурное или функциональное уточнение не определено в тексте. Мотив представляет собой структурную единицу в биомолекуле. Например, сигнальный мотив в белке или полипептиде - это аминокислотный участок в белке или полипептиде, содержащий аминокислоту, которая может быть фосфорилирована, дефосфорилирована или может служить сайтом связывания другой сигнальной молекулы. Аналогичным образом, в случае нуклеиновых кислот, например, мРНК TNF имеет консервативный мотив UUAUUUAUU в 3'UTR, с которым связываются дестабилизирующие мРНК ферменты, такие как члены семейства белков, связывающих цинковые пальцы 36.

[0257] Под «рецептором» следует понимать биологическую молекулу или группу молекул, способную к связыванию с лигандом. Рецептор может представлять собой мембранносвязанную молекулу, которая получает информацию через внеклеточный домен, например, посредством контакта с агентом, с которым внеклеточный домен способен связываться (например, внеклеточный мишень-связывающий домен). Рецептор может служить для передачи информации в клетке, клеточном образовании или организме. В

некоторых вариантах осуществления изобретения рецептор может содержать внеклеточный домен или более одного внеклеточного домена, функционально связанного с трансмембранным доменом, который представляет собой домен, проходящий через клеточную мембрану. В некоторых вариантах осуществления изобретения рецептор может содержать внутриклеточный домен или более одного внутриклеточного домена. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько внутриклеточных доменов могут быть функционально связаны с цитоплазматическим концом трансмембранного домена, который, в свою очередь, связан с внеклеточным доменом рецептора. В некоторых вариантах осуществления изобретения при связывании мишени (например, лиганда) с внеклеточным связывающим доменом рецептор «активируется», так что один или несколько доменов рецептора могут претерпевать конформационные изменения или химические изменения и могут, в свою очередь, индуцировать некоторые биохимические изменения внутри клетки, например, активировать клетку, активировать высвобождение цитокинов или индуцировать фагоцитоз, или, например, деактивировать клетку, индуцировать апоптоз. Конформационные изменения могут происходить в трансмембранной области или другой внеклеточной области или их фрагментах, так что рецептор олигомеризуется. В некоторых вариантах осуществления изобретения при ассоциации лиганда или связывании с мишенью внутриклеточный домен может быть фосфорилирован, дефосфорилирован, убиквитинирован или подвергаться любому другому биохимическому или конформационному изменению или их комбинации и может индуцировать внутриклеточную передачу сигнала. Такие домены в некоторых вариантах осуществления изобретения могут называться внутриклеточными сигнальными доменами. Рецептор содержит по меньшей мере одну рецепторную единицу и может содержать две или более рецепторных единицы, где каждая рецепторная единица может состоять из молекулы белка, например, молекулы гликопротеина. Рецептор имеет структуру, которая комплементарна структуре лиганда, и может образовывать комплексы с лигандом, как партнер по связыванию. При помощи конформационных изменений рецептора после связывания с лигандом на поверхности клетки может передаваться сигнальная информация. В соответствии с настоящим изобретением рецептор может относиться к белкам МНС классов I и II, способным образовывать с лигандом, например, пептидом или пептидным фрагментом подходящей длины, комплекс рецептор/лиганд.

[0258] Выражение «специфически связывается» относится к соединению (например, пептиду), которое распознает и связывает молекулу (например, полипептид), но фактически не распознает и не связывает другие молекулы в образце, например, в биологическом образце.

[0259] Термин «рекомбинантная нуклеиновая кислота» относится к нуклеиновой кислоте, полученной методами рекомбинантного клонирования. Рекомбинантная нуклеиновая кислота может быть синтезирована в лаборатории. Рекомбинантная нуклеиновая кислота может быть получена с использованием технологии рекомбинантных ДНК с использованием ферментативной модификации ДНК, такой как расщепление ферментами, лигирование и клонирование ДНК. Рекомбинантная нуклеиновая кислота в контексте настоящего документа может представлять собой ДНК или РНК. Рекомбинантная ДНК может быть транскрибирована *in vitro* с получением матричной РНК (мРНК), рекомбинантная мРНК может быть выделена, очищена и использована для трансфекции клетки. Рекомбинантная нуклеиновая кислота может кодировать белок или полипептид. Рекомбинантная нуклеиновая кислота при подходящих условиях может быть внедрена в живую клетку и может экспрессироваться внутри живой клетки. Используемый здесь термин «экспрессия» нуклеиновой кислоты обычно относится к транскрипции и/или трансляции нуклеиновой кислоты. Продуктом экспрессии нуклеиновой кислоты обычно является белок, но им также может быть и мРНК. Обнаружение мРНК, которая кодируется рекомбинантной нуклеиновой кислотой, в клетке, в которую вводили рекомбинантную нуклеиновую кислоту, считается положительным доказательством того, что нуклеиновая кислота «экспрессируется» в клетке.

[0260] Процесс встраивания или внедрения нуклеиновой кислоты в клетку может осуществляться посредством трансформации, трансфекции или трансдукции. Трансформация — это процесс поглощения чужеродной нуклеиновой кислоты бактериальной клеткой. Этот процесс адаптирован для размножения плазмидной ДНК, получения белков и других применений. Процесс трансформации заключается во введении рекомбинантной плазмидной ДНК в компетентные бактериальные клетки, которые захватывают внеклеточную ДНК из окружающей среды. Некоторые виды бактерий естественно компетентны в определенных условиях окружающей среды, но компетентность искусственно индуцируется в лабораторных условиях. Трансфекция — это принудительное введение небольших молекул, таких как ДНК, РНК или антитела, в эукариотические клетки. Существует некоторая путаница, связанная с тем, что «трансфекция» также относится к введению бактериофага в бактериальные клетки. «Трансдукция» в основном используется для описания введения частиц рекомбинантного вирусного вектора в клетки-мишени, тогда как «инфекция» относится к естественному заражению людей или животных вирусами дикого типа.

[0261] Термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить гетерологичную нуклеиновую кислоту или опосредовать ее экспрессию.

Плазмида — это разновидность рода, охватываемого термином «вектор». Вектором обычно называют последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую точку начала репликации и другие элементы, необходимые для репликации и/или присутствия в клетке-хозяине. Векторы, способные управлять экспрессией генов и/или последовательностей нуклеиновых кислот, с которыми они оперативно связаны, называются здесь «экспрессионными векторами». Как правило, подходящие экспрессионные вектора часто представлены в форме «плазмид», которые представляют собой кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, которые в своей векторной форме не связаны с хромосомой и обычно содержат элементы для стабильной или транзientной экспрессии или кодируемую ДНК. Другие векторы экспрессии, которые могут быть использованы в раскрытых здесь способах, включают, но не ограничиваются следующими: плазмиды, эписомы, искусственные хромосомы бактерий, искусственные хромосомы дрожжей, бактериофаги или вирусные векторы; такие векторы могут интегрироваться в геном хозяина или автономно реплицироваться в клетках. Вектор может быть ДНК или РНК вектором. Также могут быть использованы другие формы экспрессионных векторов, известные специалистам в данной области, которые выполняют эквивалентные функции, например, самореплицирующиеся внехромосомные векторы или векторы, способные интегрироваться в геном хозяина. Примерами векторов являются векторы, способные к автономной репликации и/или экспрессии нуклеиновых кислот, с которыми они связаны.

[0262] Термины «спейсер» или «линкер», используемые в отношении слитого белка, относятся к пептиду, который соединяет белки, составляющие слитый белок. Как правило, спейсер не обладает какой-либо определенной биологической активностью, кроме соединения или сохранения некоторого минимального расстояния или других пространственных положений между белками или последовательностями РНК. Однако в некоторых вариантах осуществления изобретения аминокислоты, входящие в состав спейсера, могут быть выбраны так, чтобы влиять на некоторые свойства молекулы, такие как укладка, суммарный заряд или гидрофобность молекулы. Подходящие линкеры для использования в варианте осуществления настоящего изобретения хорошо известны специалистам в данной области и включают, но не ограничиваются следующими: углеродные линкеры с прямой или разветвленной цепью, гетероциклические углеродные линкеры или пептидные линкеры. Линкер используется для разделения двух антигенных пептидов на расстояние, достаточное, в некоторых вариантах осуществления изобретения, для обеспечения правильной укладки каждого антигенного пептида. Типичные пептидные линкерные последовательности принимают гибкую вытянутую конформацию и не предрасположены к развитию упорядоченной вторичной структуры. Типичные

аминокислоты в гибких участках белка включают Gly, Asn и Ser. Ожидается, что практически любая перестановка аминокислотных последовательностей, содержащих Gly, Asn и Ser, будет удовлетворять вышеуказанным критериям для линкерной последовательности. Другие почти нейтральные аминокислоты, такие как Thr и Ala, также могут быть использованы в линкерной последовательности.

[0263] В контексте настоящего документа термины «определение», «оценка», «тестирование», «измерение», «обнаружение/детектирование» и их грамматические эквиваленты могут относиться к количественным и/или качественным определениям. Если предполагается количественное определение, может использоваться словосочетание «определение количества» аналита и т.п. Если предполагается качественное и/или количественное определение, может использоваться фраза «определение уровня» аналита или «обнаружение» аналита.

[0264] Термины «выделенный», «очищенный», «биологически чистый» и их грамматические эквиваленты могут относиться к материалу, который свободен в той или иной степени от компонентов, которые обычно присутствуют в нем в его нативном состоянии. «Выделять» указывает на степень выделения из исходного источника или окружения. «Очищать» указывает на более высокую степень разделения, чем выделение или обогащение. «Очищенный» или «биологически чистый» белок практически не содержит других материалов, таким образом, любые примеси не оказывают существенного влияния на биологические свойства белка или не вызывают других неблагоприятных последствий. Иными словами, нуклеиновая кислота или пептид по настоящему изобретению являются очищенными, если при получении методами рекомбинантных ДНК, или с помощью химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе они практически не содержат клеточного материала, вирусного материала или культуральной среды. Чистоту и гомогенность обычно определяют с использованием методов аналитической химии, например электрофореза в полиакриламидном геле или высокоэффективной жидкостной хроматографии. Термин «очищенный» может означать, что нуклеиновая кислота или белок дает практически одну полосу в геле для электрофореза. Для белка, который может быть подвергнут модификации, например, фосфорилированию или гликозилированию, различные модификации могут давать разные выделенные белки, которые могут быть очищены отдельно.

[0265] Термины «полинуклеотид», «олигонуклеотид» и «нуклеиновая кислота» используются взаимозаменяемо и могут относиться к полимерной форме нуклеотидов любой длины, как к дезоксирибонуклеотидам, так и к рибонуклеотидам, или к их аналогам в одинарной, двойной или многоцепочечной форме. Полинуклеотид может быть

экзогенным или эндогенным по отношению к клетке. Полинуклеотид может существовать в бесклеточной среде. Полинуклеотид может представлять собой ген или его фрагмент. Полинуклеотид может представлять собой ДНК. Полинуклеотид может представлять собой РНК. Полинуклеотид может иметь любую трехмерную структуру и выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Полинуклеотид может включать один или несколько аналогов (например, измененный остов, сахар или азотистое основание). Модификации структуры нуклеотида, если они присутствуют, могут быть сделаны до или после сборки полимера. Некоторые неограничивающие примеры аналогов включают: 5-бромурацил, пептидную нуклеиновую кислоту, ксенонуклеиновую кислоту, морфолиновый олигонуклеотид, закрытые нуклеиновые кислоты, гликолевые нуклеиновые кислоты, треозонуклеиновые кислоты, дидезоксинуклеотиды, кордицепин, 7-деаза-GTP, флуорофоры (например, родамин или флуоресцеин, связанный с сахаром), тиолсодержащие нуклеотиды, нуклеотиды, связанные с биотином, флуоресцентные аналоги оснований, CpG-островки, метил-7-гуанозин, метилированные нуклеотиды, инозин, тиюридин, псевдоуридин, дигидроуридин, квеуозин и виозин. Неограничивающие примеры полинуклеотидов включают кодирующие или не кодирующие области гена или фрагмента гена, локусы (locus), определенные с помощью анализа групп сцепления, экзоны, интроны, матричную РНК (мРНК), транспортную РНК (тРНК), рибосомную РНК (рРНК), короткую интерферирующую РНК (siРНК), короткошпилечная РНК (shРНК), микро-РНК (miРНК), рибозимы, еДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, любые последовательности выделенных ДНК, любые последовательности выделенных РНК, бесклеточные полинуклеотиды, в том числе бесклеточную ДНК (cfДНК) и бесклеточную РНК (cfРНК), зонды на основе нуклеиновых кислот и праймеры. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами.

[0266] Термины «полинуклеотид-мишень» и «нуклеиновая кислота-мишень» в контексте настоящего документа могут относиться к нуклеиновой кислоте или полинуклеотиду, на который нацелен модифицированный фрагмент нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Например, на «нуклеиновую кислоту-мишень» может быть нацелен фрагмент нуклеиновой кислоты, содержащий фрагмент расщепления нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе. Нуклеиновая кислота-мишень может представлять собой ДНК. Нуклеиновая кислота-мишень может представлять собой РНК. Нуклеиновая кислота-мишень может относиться к хромосомной последовательности или внехромосомной последовательности (например, эписомальной последовательности, последовательности миникольца, митохондриальной последовательности,

последовательности хлоропластов и т.д.). Нуклеиновая кислота-мишень может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть не связана с какой-либо другой последовательностью в образце нуклеиновой кислоты заменой одного нуклеотида. Нуклеиновая кислота-мишень может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть не связана с какой-либо другой последовательностью в образце нуклеиновой кислоты заменами из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения замена может не происходить в пределах 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 35 нуклеотидов от 5'-конца нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения замена может не происходить в пределах 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 нуклеотидов от 3'-конца нуклеиновой кислоты-мишени. В общем, термин «последовательность-мишень» относится к последовательности нуклеиновой кислоты на одной цепи нуклеиновой кислоты-мишени. Последовательность-мишень может представлять собой часть гена, регуляторную последовательность, геномную ДНК, бесклеточную нуклеиновую кислоту, в том числе cfДНК и/или cfРНК, сДНК, слитый ген и РНК, включая мРНК, микроРНК, рРНК и другие.

[0267] Термин «ген» в контексте настоящего документа может относиться к нуклеиновой кислоте (например, ДНК, такой как геномная ДНК и сДНК) и соответствующей ей нуклеотидной последовательности, которая вовлечена в кодирование РНК-транскрипта. В контексте настоящего документа этот термин по отношению к геномной ДНК включает промежуточные некодирующие области, а также регуляторные области и может включать 5'- и 3'-концы. В некоторых случаях этот термин охватывает транскрибируемые последовательности, включая 5'- и 3'-нетранслируемые области (5'-UTR и 3'-UTR), экзоны и интроны. В некоторых генах транскрибируемая область будет содержать «открытые рамки считывания», которые кодируют полипептиды. В некоторых вариантах использования этого термина «ген» включает только кодирующие последовательности (например, «открытую рамку считывания» или «кодирующую область»), необходимые для кодирования полипептида. В некоторых случаях гены не кодируют полипептид, например гены рибосомной РНК (рРНК) и гены транспортной РНК (тРНК). В некоторых случаях термин «ген» включает не только транскрибируемые последовательности, но, кроме того, также включает нетранскрибируемые области, в том числе расположенные выше и ниже регуляторные области, энхансеры и промоторы. Ген может относиться к «эндогенному гену» или нативному гену в его естественном местоположении в геноме организма. Ген может относиться к «экзогенному гену» или ненативному гену. Ненативный ген может относиться к гену, обычно не встречающемуся в организме-хозяине, но введенному в организм-хозяин путем переноса генов. Ненативный ген также может относиться к гену, не

находящемуся в его природном положении в геноме организма. Ненативный ген может также относиться к встречающейся в природе последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида, которая содержит мутации, вставки и/или делеции (например, ненативная последовательность).

[0268] Термин «редактирование генома» может относиться к изменению одного или нескольких нуклеотидов в геноме клетки. Клетка может находиться *in vivo*. Клетка может быть *ex vivo* или *in vitro*. Неограничивающие примеры способов редактирования генома включают CRISPR-опосредованную генетическую модификацию, полипептиды, такие как Cas9, Cas12a (Cpf1) или другие CRISPR-эндонуклеазы, Argonaute-эндонуклеазы, подобный активатору транскрипции (TAL) эффектор и нуклеазы (TALEN), нуклеазы цинковых пальцев (ZFN), экспрессионные векторы, системы транспозонов (например, PiggyBac транспозазу) или любую их комбинацию. Рекомбинантные цинковые пальцы, эффекторы, подобные активаторам транскрипции (TALE), или хоуминг-мегануклеазы доступны для создания направленных нарушений генома.

[0269] Целенаправленное редактирование генома возможно посредством опосредованной CRISPR генетической модификации, с использованием Cas или Cas-подобной эндонуклеазы. CRISPR (кластерные короткие палиндромные повторы, разделённые регулярными промежутками), также известные как SPIDR (чередующиеся со спейсерами прямые повторы), составляют семейство локусов ДНК, которые обычно специфичны для определенного вида бактерий. Локус CRISPR включает отдельный класс рассеянных коротких tandemных повторов (SSR), которые были выявлены в *E. coli*, и связанных с ними генов.

[0270] Термин «трансген» может относиться к любой молекуле нуклеиновой кислоты, которую вводят в клетку. Клетку, полученную в результате введения трансгена, называют трансгенной клеткой. Трансген может включать ген, который является частично или полностью гетерологичным (т.е. чужеродным) трансгенному организму или клетке, или может представлять собой ген, гомологичный эндогенному гену организма или клетки. В некоторых случаях трансгены включают любой полинуклеотид, такой как ген, кодирующий полипептид или белок, полинуклеотид, который транскрибируется в ингибирующий полинуклеотид, или полинуклеотид, который не транскрибируется (например, в котором отсутствует элемент контроля экспрессии, такой как промотор, который запускает транскрипцию). В некоторых вариантах осуществления изобретения трансген или чужеродный полинуклеотид может быть введен в клетку для стабильного инкорпорирования в геном посредством сайт-специфической рекомбинации. Термин «рекомбинация» или «рекомбинация ДНК», используемый здесь взаимозаменяемо, обычно

относится к процессу, посредством которого происходит обмен фрагментами нуклеиновых кислот из двух разных полинуклеотидных последовательностей. Рекомбинация может включать разрыв и обмен сегментами ДНК между двумя цепями ДНК. Рекомбинация может регулироваться фрагментом рекомбинации, например малой молекулой или полипептидом, таким как фермент. Например, рекомбинация может регулироваться по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или более ферментами. Рекомбинация может регулироваться не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 ферментом. Один или несколько ферментов, которые осуществляют или упрощают рекомбинацию ДНК, могут быть одним или несколькими ферментами, выполняющими стадии создания разрезов (эксцизий), приближения заменяемой цепи к участкам разрезов, удаления ранее существовавшей цепи и склеивания разрезанных концов или лигирования. Один или несколько ферментов могут включать, например, одну или несколько эндонуклеаз для создания разрезов; и одну или несколько лигаз для лигирования. Рекомбинация ДНК может осуществляться рекомбиназами. Термины «сиквенс-специфическая рекомбинация» и «сайт-специфическая рекомбинация», используемые здесь взаимозаменяемо, относятся к функции, выполняемой фрагментом рекомбинации (например, ферментами), например, рекомбиназами, которые узнают и связываются с коротким участком нуклеиновой кислоты или "сиквенс-специфичным сайтом распознавания рекомбиназы", т.е. участком распознавания рекомбиназы, и катализируют рекомбинацию нуклеиновой кислоты относительно этих сайтов. Эти ферменты могут включать рекомбиназы, транспозазы и интегразы. Термины «сиквенс-специфичный сайт распознавания рекомбиназы», «сайт-специфический сайт распознавания рекомбиназы», «сиквенс-специфичный сайт-мишень» и «сайт-специфический сайт-мишень» могут относиться к участкам или последовательностям коротких нуклеиновых кислот, т.е. сайтам распознавания рекомбиназы, которые узнаются сиквенс-специфичной или сайт-специфической рекомбиназой, и которые становятся областями кроссинговера в процессе сайт-специфической рекомбинации. Примеры сиквенс-специфичных сайтов-мишеней рекомбиназы, включают, но не ограничиваются следующими: lox-сайты, att- сайты, dif-сайты и ftr-сайты. Система Cre/lox часто используется для сиквенс-специфичной рекомбинации ДНК. Рекомбиназа Cre является регулятором системы Cre/lox, который катализирует сайт-специфическую рекомбинацию путем кроссинговера между двумя удаленными последовательностями узнавания Cre, т.е. loxP-сайтами. LoxP-сайт означает нуклеотидную последовательность, при которой продукт гена cre бактериофага P1, рекомбиназа Cre, может катализировать сайт-специфичную рекомбинацию. LoxP-сайты содержат два инвертированных повтора из 13 п.н., разделенных спейсерной последовательностью из 8 п.н. Любая последовательность ДНК, введенная между двумя

последовательностями *loxP* из 34 п.н. (называемая «флуксированной *loxP*» ДНК), вырезается из-за Cre-опосредованной рекомбинации. Присутствие Cre-рекомбиназы необходимо для обмена первой и второй полинуклеотидными последовательностями.

[0271] Транспозоны, или мобильные генетические элементы (TE) — это генетические элементы, обладающие способностью переносить генетический материал в геном при помощи фермента, известного как транспозаза. Геномы млекопитающих содержат большое количество последовательностей, полученных из мобильных элементов (TE), и до 70% нашего генома составляют последовательности, полученные из TE (de Koning et al. 2011; Richardson и др., 2015). Эти элементы можно использовать для введения генетического материала в геном клетки. TE элементы, способные к мобилизации, часто называют «прыгающими» внутри генома генами. TE обычно существуют в геномах эукариот в обратимо неактивной, эпигенетически молчащей форме.

[0272] Термины «трансфекция» или «трансфицированный» означают введение нуклеиновой кислоты в клетку невирусными или вирусными способами. Молекулы нуклеиновой кислоты могут представлять собой генные последовательности, кодирующие целые белки или их функциональные части. См., например, Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 18.1-18.88.

[0273] Термин «экспрессия» может относиться к одному или нескольким процессам, с помощью которых полинуклеотид транскрибируется с ДНК-матрицы (например, в мРНК или другой РНК транскрипт), и/или к процессу, с помощью которого РНК, такая как мРНК, транслируется в пептид, полипептид или белок. Транскрипты и кодируемые полипептиды могут совместно именоваться «продуктом гена». Если полинуклеотид получен из геномной ДНК, экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке. «Повышающая регуляция» в отношении экспрессии означает повышенный уровень экспрессии полинуклеотида (например, РНК, такой как мРНК) и/или полипептидной последовательности по сравнению с уровнем ее экспрессии в состоянии дикого типа, в то время как «понижающая регуляция» относится к снижению уровню экспрессии полинуклеотида (например, РНК, такой как мРНК) и/или полипептидной последовательности по сравнению с его экспрессией в состоянии дикого типа. Экспрессия трансфицированного гена в клетке может быть временной или постоянной. Во время «временной экспрессии» трансфицированный ген не переносится в дочернюю клетку во время клеточного деления. Поскольку его экспрессия ограничена трансфицированной клеткой, экспрессия гена со временем исчезает. Напротив, стабильная экспрессия трансфицированного гена может происходить, когда этот ген котрансфицирован с другим геном, который дает селекционное преимущество трансфицированной клетке. Таким селекционным преимуществом может быть устойчивость к

определенному токсину, представленному клетке. Там, где требуется экспрессия трансфицированного гена, заявка предусматривает использование кодон-оптимизированных последовательностей. Примером кодон-оптимизированной последовательности может быть последовательность, оптимизированная для экспрессии в эукариотах, например, у человека (т.е. оптимизированная для экспрессии у людей) или у другого эукариота, животного или млекопитающего. Оптимизация кодонов для отличных от человека хозяев или оптимизация кодонов для конкретных органов хорошо известна. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность, кодирующая белок, может быть оптимизирована по кодомам для экспрессии в конкретных клетках, таких как эукариотические клетки. Эукариотические клетки могут быть клетками конкретного организма или полученными на основе клеток конкретного организма, такого как растение или млекопитающее, включая, но не ограничиваясь следующими: человек или не относящийся к человеку эукариот, животное или млекопитающее, как обсуждается в настоящем документе, например, мышь, крыса, кролик, собака, домашний скот или нечеловеческое млекопитающее или примат. Оптимизация кодонов - это процесс модификации последовательности нуклеиновой кислоты для усиления экспрессии в представляющих интерес клетках-хозяевах путем замены по меньшей мере одного кодона (например, примерно или примерно более чем 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или более кодонов) нативной последовательности на кодоны, которые чаще или наиболее часто используются в генах этой клетки-хозяина, при сохранении нативной аминокислотной последовательности. Различным видам свойственно предпочтение определенных кодонов конкретной аминокислоты. Предпочтение кодонов (различия в использовании кодонов между организмами) часто коррелирует с эффективностью трансляции матричной РНК (мРНК), которая, в свою очередь, считается зависящей, среди прочего, от свойств транслируемых кодонов и доступности определенных молекул транспортных РНК (тРНК). Преобладание выбранных тРНК в клетке, как правило, отражает кодоны, наиболее часто используемые в синтезе пептидов. Соответственно, с помощью оптимизации кодонов гены могут быть адаптированы для оптимальной экспрессии генов в заданном организме. Таблицы использования кодонов легко доступны, например, в "Codon Usage Database" по адресу www.kazusa.or.jp/codon/, и эти таблицы могут применяться различными способами. Также доступны компьютерные алгоритмы для кодонов, оптимизирующие конкретную последовательность для экспрессии в конкретной клетке-хозяине, такие как Gene Forge (Aptagen; Jacobus, PA).

[0274] Термины «экспрессионная кассета», «экспрессионная конструкция» или «экспрессионный вектор» относятся к нуклеиновой кислоте, которая включает нуклеотидную

последовательность, такую как кодирующая последовательность и матричная последовательность, и последовательности, необходимые для экспрессии кодирующей последовательности. Экспрессионная кассета может быть вирусной или невирусной. Например, экспрессионная кассета может включать конструкцию нуклеиновой кислоты, которая при введении в клетку-хозяина приводит к транскрипции и/или трансляции РНК или полипептида, соответственно. Антисмысловые конструкции или смысловые конструкции, которые не транслируются или не могут транслироваться, непосредственно включены в это определение. Специалисту в данной области будет понятно, что встроенная полинуклеотидная последовательность не обязательно должна быть идентичной, а может быть лишь в значительной степени сходной с последовательностью гена, из которого она получена.

[0275] «Плаزمида» в контексте настоящего документа может относиться к невирусному экспрессионному вектору, например, к молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует гены и/или регуляторные элементы, необходимые для экспрессии генов. Термин «вирусный вектор» в контексте настоящего документа относится к нуклеиновой кислоте вирусного происхождения, которая способна транспортировать другую нуклеиновую кислоту в клетку. Вирусный вектор способен направлять экспрессию белка или белков, кодируемых одним или несколькими генами, которые несет этот вектор, когда он присутствует в соответствующем окружении. Примеры вирусных векторов включают, но не ограничиваются следующими: ретровирусные, аденовирусные, лентивирусные и аденоассоциированные вирусные векторы.

[0276] Термин «промотор» в контексте настоящего документа может относиться к полинуклеотидной последовательности, способной управлять транскрипцией кодирующей последовательности в клетке. Таким образом, промоторы, используемые в полинуклеотидных конструкциях по настоящему изобретению, включают регуляторные цис-действующие элементы транскрипции и регуляторные последовательности, которые участвуют в регулировании или модулировании времени и/или скорости транскрипции гена. Например, промотор может представлять собой регуляторный цис-действующий элемент транскрипции, в том числе энхансер, промотор, терминатор транскрипции, точку начала репликации, последовательность хромосомной интеграции, 5'- и 3'-нетранслируемые области или последовательность интрона, которые участвуют в регуляции транскрипции. Эти цис-действующие последовательности обычно взаимодействуют с белками или другими биомолекулами, чтобы осуществлять (включать/выключать, регулировать, модулировать и т. д.) транскрипцию генов. «Конститутивным промотором» может быть промотор, способный инициировать транскрипцию почти во всех типах тканей. «Тканеспецифический промотор» может инициировать транскрипцию в одном или нескольких конкретных типах тканей. «Индукцируемый промотор» может быть промотором, который инициирует транскрипцию

только в определенных условиях окружающей среды, условиях развития или в присутствии лекарственного средства или химических веществ. Типичный индуцируемый промотор может представлять собой промотор, индуцируемый доксициклином или тетрациклином. Промоторы, регулируемые тетрациклином, могут быть как индуцируемыми тетрациклином, так и репрессируемыми тетрациклином, которые называют *tet-on* и *tet-off* системами. Регулируемые *tet*-системы основаны на двух компонентах, т.е., контролируемом тетрациклином регуляторе (также называемом трансаактиватором) (*tTA* или *rtTA*), и *tTA*/*rtTA*-зависимом промоторе, который контролирует экспрессию нижестоящей кДНК тетрациклин-зависимым образом. *tTA* представляет собой слитый белок, содержащий репрессор оперона устойчивости к тетрациклину *Tn10* из *Escherichia coli* и С-концевую часть белка 16 вируса простого герпеса (*VP16*). *tTA*-зависимый промотор состоит из минимального промотора РНК-полимеразы II, слитого с последовательностями *tet*-оператора (*tetO*) (набор из семи родственных последовательностей оператора). Это слияние превращает *tet*-репрессор в сильный активатор транскрипции в эукариотических клетках. В отсутствие тетрациклина или его производных (таких как доксициклин), *tTA* связывается с последовательностями *tetO*, обеспечивая транскрипционную активацию *tTA*-зависимого промотора. Однако в присутствии доксициклина *tTA* не может взаимодействовать со своей мишенью, и транскрипция не происходит. *Tet*-система, в которой используется *tTA*, называется *tet-OFF*, потому что тетрациклин или доксициклин приводят к подавлению транскрипции. Напротив, в *tet-ON* системе с помощью случайного мутагенеза была выделена мутантная форма *tTA*, названная *rtTA*. В отличие от *tTA*, *rtTA* не функционирует в отсутствие доксициклина, и требует присутствия лиганда для трансаактивации.

[0277] Термин «фармацевтически приемлемый» может относиться к одобренному или ожидающему одобрения регулирующим органом федерального правительства, или правительства штата, или указанному в Фармакопее США, или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных, включая человека. «Фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель» может относиться к наполнителю, носителю или разбавителю, который можно вводить субъекту вместе с агентом, который не нарушает его фармакологическую активность и нетоксичен при введении в дозах, достаточных для доставки терапевтического количества агента. «Фармацевтически приемлемая соль» может представлять собой кислую или основную соль, которая обычно считается в данной области пригодной для использования в контакте с тканями человека или животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений. Такие соли включают соли минеральных и органических кислот основных остатков, таких как амины, а также щелочные или органические соли

кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты. Конкретные фармацевтические соли включают, но не ограничиваются следующими: соли кислот, таких как соляная, фосфорная, бромистоводородная, яблочная, гликолевая, фумаровая, серная, сульфаминовая, сульфаниловая, муравьиная, толуолсульфокислота, метансульфокислота, бензолсульфокислота, этандисульфокислота, 2- гидроксипропансульфоновая, азотная, бензойная, 2-ацетоксибензойная, лимонная, винная, молочная, стеариновая, салициловая, глутаминовая, аскорбиновая, памоевая, янтарная, фумаровая, малеиновая, пропионовая, гидроксималеиновая, йодистоводородная, фенилуксусная, алкановые кислоты, например уксусную, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, где n равно 0-4, и т.д.. Аналогично, фармацевтически приемлемые катионы включают, но не ограничиваются следующими: натрий, калий, кальций, алюминий, литий и аммоний. Специалистам в данной области техники будет понятно из этого раскрытия и знаний в данной области техники, что дополнительные фармацевтически приемлемые соли для пула специфических для заболевания антигенов, представленных в настоящем документе, включают соли, перечисленные в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, p. 1418 (1985).

[0278] В некоторых случаях воздействие экзогенного агента на клетку может означать включение в клетку гетерологичного гена или нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях воздействие может означать добавление агента, такого как пептид или малая молекула, для активации клетки.

[0279] «Существенно» в контексте настоящего документа может означать «в значительной степени» или «полностью» и может устанавливаться в выражаемом количественно контексте только относительно известного, сравнимого или ожидаемого результата. Например, образец, содержащий существенно меньше Т-клеток, может означать образец, содержащий менее 20% клеток, по сравнению со сравниваемым образцом, который содержит 80% Т-клеток или более. «По существу лишённые» в аналогичном контексте может означать менее 10%, менее 5% или около 0% Т-клеток.

[0280] Термины «лечить», «подвергнутый лечению», «лечение», «терапия» и аналогичные означают уменьшение, предотвращение или облегчение расстройства и/или связанных с ним симптомов (например, новообразования, опухоли, инфекционного агента, или аутоиммунного заболевания). «Лечение» может означать введение терапии субъекту после начала или предполагаемого начала заболевания (например, рака, или инфекции инфекционным агентом, или аутоиммунного заболевания). «Лечение» включает понятие «облегчение», которое означает уменьшение частоты возникновения или рецидива, или тяжести любых симптомов или других негативных последствий, связанных с заболеванием, и/или побочных эффектов, связанных с терапией. Термин «лечение» также охватывает

понятие «управление», которое относится к уменьшению тяжести заболевания или расстройства у пациента, например, к продлению жизни или увеличению выживаемости пациента с заболеванием, или к отсрочке его рецидива, например, удлинению периода ремиссии у больного, перенесшего заболевание. Понятно, хотя это и не исключается, что лечение заболевания или состояния не требует, чтобы заболевание, состояние или связанные с ними симптомы были полностью вылечены.

[0281] Термины «предотвращать», «профилактика», «предупреждение» и их грамматические эквиваленты в контексте настоящего документа могут означать предотвращение или отсрочку появления симптомов, связанных с заболеванием или состоянием, у субъекта, у которого не развились такие симптомы во время введения агента или соединения.

[0282] Термин «терапевтический эффект» может относиться к некоторой степени облегчения одного или нескольких симптомов болезни (например, новообразования, опухоли, инфекции, вызванной инфекционным агентом, или аутоиммунного заболевания) или связанной с ним патологии. «Терапевтически эффективное количество» в контексте настоящего документа может относиться к количеству агента, которое при однократном или многократном введении дозы в клетку или субъекту эффективно для продления жизни пациента с таким расстройством, уменьшения одного или нескольких признаков или симптомов расстройства, их предотвращения или отсрочки и т.п., с эффектом, превышающим ожидаемый эффект в отсутствие такого лечения. «Терапевтически эффективное количество» предназначено для обозначения количества, необходимого для достижения терапевтического эффекта. Врач или ветеринар, обладающий обычными знаниями в данной области, может легко определить и прописать «терапевтически эффективное количество» (например, ED₅₀) требуемой фармацевтической композиции.

[0283] Хотя один из вариантов осуществления изобретения, подробно описанный в настоящем раскрытии, относится к раку, способы и технологии, описанные в настоящем документе, считаются полезными для нацеливания на инфицированную или иным образом пораженную клетку внутри организма. Аналогичным образом, в настоящем документе описаны терапевтические и вакцинные композиции с использованием рекомбинантных клеток.

Миелоидные клетки для иммунотерапии

[0284] В одном из аспектов настоящая заявка направлена на субпопуляцию миелоидных клеток, которую можно использовать для эффективной иммунотерапии, например, для эффективной вакцинации. В настоящем документе предложен способ выделения или

обогащения, отбора, обогащения и проверки с помощью функционального анализа подгруппы миелоидных клеток, которую можно использовать для эффективной иммунотерапии. В одном из аспектов в настоящем документе предложен способ идентификации и выделения или обогащения подмножества миелоидных клеток, которые затем могут быть соответствующим образом модифицированы для получения эффекторных миелоидных клеток.

[0285] Миелоидные клетки, широко используемые в настоящее время в иммунотерапии, представляют собой антигенпрезентирующие дендритные клетки или активированные зрелые макрофаги. Антигенпрезентирующие DC или активированные макрофаги часто не являются терапевтически эффективными для *in vivo* трансфера, поскольку клетки являются терминальными, достигли своего предела размножения и не могут делиться дальше, имеют короткую продолжительность жизни, истощены, плохо возбудимы в циркуляции *in vivo*. В некоторых случаях такие клетки слабо экспрессируют какие-либо трансгены при функционировании в тканевой среде или могут полностью терять экспрессию трансгена. В некоторых случаях DC или активированные макрофаги могут демонстрировать плохую миграцию, не могут получить доступ к лимфатическим узлам и поэтому менее эффективны в активации адаптивных иммунных последствий, которые могут быть запущены при активации наивных Т-клеток в лимфатическом узле.

[0286] С другой стороны, эффективная иммунотерапия требует, чтобы клетки, предпочтительно миелоидные клетки по изобретению, были пластичными, могли быть получены рекомбинантным путем, например, экспрессировали трансген в клетке без ущерба для пластичности, чтобы в них отсутствовала тоническая передача сигналов и они могли быть активированы только в тканевой микросреде, могли эффективно мигрировать *in vivo* и могли достигать лимфатических узлов и активировать лимфоциты, вызывая активный адаптивный иммунный ответ.

[0287] Для вышеизложенного важно определить правильную популяцию клеток для дальнейшего воздействия и получения миелоидных клеток, которые можно использовать для эффективной иммунотерапии.

[0288] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой клетку-предшественник. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка не трансформируется или не активируется до введения нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления изобретения в миелоидной клетке отсутствует тоническая передача сигналов во время введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки могут дифференцироваться в эффекторные клетки; и проникать или мигрировать в пораженный участок субъекта после

введения; или иметь продолжительность жизни у субъекта по меньшей мере 5 дней после введения.

[0289] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка проявляет низкий уровень фагоцитоза до введения субъекту или до активации *ex vivo* внешним стимулом, таким как цитокин или фактор роста, или в присутствии мишени для фагоцитоза. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка проявляет умеренный фагоцитоз до введения субъекту или до активации *ex vivo* внешним стимулом, таким как цитокин или фактор роста, или в присутствии мишени для фагоцитоза. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка проявляет реакцию на любой один или несколько из: GMCSF, GCSF, IL-4, IL-1b, IL-6, TNF, CCL2, CCL5, CXCL1 или их комбинации.

[0290] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка проявляет усиленный фагоцитоз при активации *ex vivo* внешним стимулом, таким как цитокин или фактор роста, или в присутствии мишени для фагоцитоза. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка проявляет примерно 1,1-кратное, 1,2-кратное, 1,5-кратное, 1,7-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 6-кратное, 7-кратное, 8-кратное, 9-кратное, 10-кратное, 11-кратное, 12-кратное, 13-кратное, 14-кратное, 14-кратное, 17-кратное, 20-кратное или более усиление фагоцитоза при активации *ex vivo* внешним стимулом, таким как цитокин или фактор роста, или в присутствии мишени для фагоцитоза, по сравнению с активированными терминально дифференцированными миелоидными клетками, такими как зрелые постактивационные макрофаги. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка проявляет чувствительность к цитокинам или хемокинам, например любой одному или нескольким из: GMCSF, GCSF, IL-4, IL-1b, IL-6, TNF, CCL2, CCL5, CXCL1 или их комбинации.

[0291] В некоторых вариантах осуществления изобретения на миелоидную клетку можно воздействовать *ex vivo*. Воздействие *ex vivo* может включать, но не ограничивается следующими: генной инженерией миелоидной клетки, экспрессией трансгена в миелоидной клетке, контактом миелоидной клетки с нуклеиновой кислотой, контактом миелоидной клетки с химическим веществом или малой молекулой, активацией миелоидной клетки цитокином, фактором роста, хемокином, тактильным раздражителем, тепловым раздражителем или их комбинацией.

[0292] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка демонстрирует более длительный срок жизни после воздействия *ex vivo* по сравнению с предварительно активированной и предварительно дифференцированной миелоидной клеткой, например, зрелой макрофагальной клеткой при аналогичных обстоятельствах,

который может составлять, например, по меньшей мере более 24 часов, более 48 часов, более 50 часов, более 55 часов, более 60 часов, более 70 часов, более 80 часов, более 90 часов, более 100 часов, более 110 часов, более 120 часов, более 130 часов, более 140 часов, более 150 часов, более 160 часов, более 170 часов, более 180 часов, более 190 часов, более 200 часов, более 210 часов, более 220 часов, более 230 часов, более 240 часов, более 250 часов, более 300 часов, более 350 часов, более 400 часов, более 500 часов, более 1000 часов.

[0293] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка проявляет цитологическую пластичность до введения нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка не трансформируется спонтанно в активированную и/или созревшую клетку, или не изменяет морфологию или физиологию, или не проявляет ускоренного старения до введения нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка может быть способна к клеточному делению.

[0294] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой первичную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой трансформированную клетку, которую трансформировали *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка не является стволовой клеткой. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка может быть получена генно-инженерным путем *ex vivo*.

[0295] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка проявляет более высокий хемотаксис в ответ на стимул, например, хемотаксический агент, хемокин, по сравнению с активированным макрофагом, что определяется анализом хемотаксиса. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка демонстрирует по меньшей мере 1,1-кратное, 1,2-кратное, 1,3-кратное, 1,4-кратное, 1,5-кратное, 1,6-кратное, 1,7-кратное, 1,8-кратное, 1,9-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 6-кратное, 7-кратное, 8-кратное, 9-кратное или по меньшей мере 10-кратное, по меньшей мере 15-кратное, по меньшей мере 20-кратное, по меньшей мере 30-кратное, по меньшей мере 40-кратное, по меньшей мере 50-кратное превышение хемотаксиса в ответ на стимул хемотаксиса, например, хемотаксический агент, хемокин, по сравнению с активированной терминально дифференцированной миелоидной клеткой, такой как активированный макрофаг, как определяют с помощью анализа хемотаксиса.

[0296] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка получена от субъекта-человека, такого как донор. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки сконцентрированы для увеличения доли миелоидных клеток в популяции клеток.

[0297] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой аутологичную клетку. В некоторых вариантах осуществления миелоидная клетка представляет собой аллогенную клетку.

[0298] В одном аспекте в настоящем документе предложена популяция клеток, выделенная из периферической крови человека, которая дополнительно обогащена миелоидными клетками, подходящими для получения терапевтически эффективных миелоидных клеток, при этом популяция клеток включает менее 5% CD3+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения обогащенная популяция миелоидных клеток содержит менее 4% CD3+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения обогащенная популяция миелоидных клеток содержит менее 3% CD3+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения обогащенная популяция миелоидных клеток содержит менее 5% CD19+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения обогащенная популяция миелоидных клеток содержит менее 4% CD19+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения обогащенная популяция миелоидных клеток содержит менее 3% CD19+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения обогащенная популяция миелоидных клеток содержит менее 5% CD56+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения обогащенная популяция миелоидных клеток содержит менее 4% CD56+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения обогащенная популяция миелоидных клеток содержит менее 3% CD56+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения обогащенная популяция миелоидных клеток содержит менее 10% CD42b+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения обогащенная популяция миелоидных клеток содержит менее 5% CD42b+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения обогащенная популяция миелоидных клеток содержит менее 3% CD42b+ клеток.

[0299] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки обогащены и модифицированы *ex vivo* для получения терапевтически эффективных миелоидных клеток. Модификация миелоидной клетки *ex vivo* в контексте настоящего документа может означать *ex vivo* воздействие на клетку. Воздействие *ex vivo* в контексте настоящего документа может включать, но не ограничивается следующими: генная инженерия миелоидной клетки, экспрессия трансгена в миелоидной клетке, контакт миелоидной клетки с нуклеиновой кислотой, контакт миелоидной клетки с химическим веществом или малой молекулой, активацию миелоидной клетки цитокином, фактором роста, хемокином, тактильным раздражителем, тепловым раздражителем или их комбинацией.

[0300] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка подвергается манипуляциям для получения терапевтического средства против рака. В

некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидную клетку подвергают манипуляциям для создания противораковой вакцины. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидную клетку подвергают манипуляциям для создания терапевтического средства для лечения инфекционного заболевания, такого как вирусная, бактериальная, грибковая, плазмодимальная или паразитарная инфекция. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидную клетку подвергают манипуляциям для получения терапевтического средства против туберкулеза. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидную клетку подвергают манипуляциям для создания терапевтического средства для лечения воспалительного заболевания. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидную клетку подвергают манипуляциям для создания терапевтического средства для лечения аутоиммунного заболевания.

CD14+/CD16- моноцит ключевая клетка-предшественник

[0301] Ранние моноциты или клетки-предшественники моноцитов не были хорошо изучены на предмет их потенциала в клеточной терапии. Моноциты составляют большую часть популяции циркулирующей крови, а также, безусловно, самые распространенные клетки в иммунологически активном участке ткани, в том числе, в опухоли. Эти клетки мигрируют почти во все патологические ткани и могут дифференцироваться в любое количество нижестоящих миелоидных эффекторных клеток. При использовании этих клеток и генно-инженерных методов, на основе этих миелоидных клеток могут быть получены эффективные инструменты клеточной терапии, имеющие широкое применение в качестве терапевтических средств для лечения рака, нейродегенеративных заболеваний, кардиологических и инфекционных заболеваний и многих других.

[0302] Кандидатом на роль терапевтически эффективных миелоидных клеток могут быть клетки-предшественники, которые обладают потенциалом для более продолжительной жизни по сравнению со зрелыми миелоидными клетками, например макрофагами; они способны созреть или дифференцироваться в миелоидные линии, такие как макрофаги или линии дендритных клеток, их можно стимулировать большим разнообразием стимулов, они способны легко мигрировать в иммунологически активную область ткани и могут активировать адаптивные тканевые системы. Миелоидные клетки-предшественники, описанные в заявке, могут не относиться к миелоидным стволовым клеткам-предшественникам. Способы, раскрытые в описании, не соответствуют процессу мобилизации стволовых клеток.

[0303] Настоящая заявка основана, по крайней мере частично, на обнаружении того, что фенотип миелоидных клеток, представляющих терапевтический интерес, как описано в

настоящем документе, может быть линией моноцитарных предшественников, в особенности обладающих пластичностью для дифференцировки в моноциты, дендритные клетки или поляризации в подтипы макрофагов M0, M1 или M2. В одном аспекте такой клеткой может быть CD14⁺. В еще одном аспекте такой клеткой может быть CD16⁻. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная линия миелоидных клеток может экспрессировать высокие уровни CD14 (CD14^{hi} или CD14 high) и низкие уровни CD16 или не экспрессировать обнаруживаемый CD16. В одном из вариантов осуществления изобретения миелоидные клетки, представляющие терапевтический интерес, как описано в настоящем документе, могут экспрессировать высокие уровни CCR2 и/или CCR5 и/или хемокинов для миграции в пораженный участок субъекта. В одном из вариантов осуществления изобретения клетки экспрессируют низкие уровни CD206, CD163, CD80, CD86 и/или CD63.

[0304] В одном из вариантов осуществления изобретения миелоидные клетки могут фенотипически отличаться от зрелых клеток макрофагов тем, что эти клетки являются более сферическими, чем клетки зрелых макрофагов, лишены псевдоподий и могут экспрессировать или могут быть индуцированы для экспрессии высоких уровней хемокинов и цитокинов, а также могут активно мигрировать в иммунологически активные участки ткани. В одном из вариантов осуществления изобретения миелоидные клетки по настоящему изобретению могут быть антиген-наивными.

[0305] Миелоидные клетки с высоким терапевтическим потенциалом, как описано в настоящем документе, могут в норме присутствовать в периферической крови на уровне, превышающем 20% от общего количества мононуклеарных клеток периферической крови (PMBC) у здорового человека.

[0306] Пока мало что известно об выделении или обогащении и использовании этих конкретных клеток в клинических целях. В некоторых случаях, связанных с терапией дендритными клетками (DC), DC могут быть получены *in vitro* из выделенных моноцитов с помощью способа, который включает культивирование моноцитов и стимуляцию клеток *ex vivo* в течение как минимум недели для получения эффективных клеток, готовых для инфузионного введения субъекту. Для такого процесса требуется приблизительно не менее 10 дней с момента выделения или обогащения клеток (или оттаивания из замороженного состояния) до момента введения. В одном аспекте в настоящем документе предложен способ получения миелоидных клеток путем выделения клеток из биологического образца субъекта, или их обогащения, воздействия на клетки экзогенным агентом и обеспечения возможности введения нуждающемуся в этом субъекту, при этом способ может быть завершен в течение 3 дней (**фиг.1**). В некоторых вариантах

осуществления изобретения воздействие на клетку можно осуществлять путем активации клетки антигенами или пептидами для получения антигенпрезентирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения воздействие может включать активацию клетки одним или несколькими терапевтическими агентами. В некоторых вариантах осуществления изобретения воздействие может означать генетические манипуляции или включение гетерологичной нуклеиновой кислоты.

[0307] В одном из аспектов в настоящем документе предложена композиция, содержащая популяцию CD14+/CD16- клеток, где популяция CD14+/CD16- клеток представляет собой популяцию рекомбинантных клеток и/или содержит экзогенный агент.

[0308] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция клеток представляет собой популяцию неполяризованных или недифференцированных миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или пептид, который экспрессируется в клетке популяции клеток CD14+/CD16-. В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или пептид, который экспрессируется на поверхности клеточной мембраны в популяции CD14+/CD16- клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения белок или пептид, экспрессируемый на поверхности мембраны, представляет собой слитый белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептид, экспрессируемый на поверхности мембраны, может связываться с антигеном или болезнетворным агентом.

[0309] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой раковый антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой микробный патогенный антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения белок или пептид, экспрессируемый на поверхности мембраны, представляет собой эндосомально процессированный белок. В некоторых вариантах осуществления белок или пептид, экспрессируемый на поверхности мембраны, представляет собой антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой вирусный, бактериальный, простейший или грибковый антиген.

[0310] В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP). В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую CFP, где CFP содержит: (а) внеклеточный домен, содержащий

антигенсвязывающий домен, и (b) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом.

[0311] В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен представляет собой CD5-связывающий домен или HER2-связывающий домен.

[0312] В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный пептид. В некоторых вариантах экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или пептид, который секретируется из клетки в популяции CD14+/CD16- клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, который подвергается эндосомальному процессингу.

[0313] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует белок, который представляет собой цитоплазматический белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует белок или пептид, который является иммуногенным. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует белок или пептид, усиливающий иммунный ответ клетки.

[0314] В некоторых вариантах осуществления изобретения экзогенный агент представляет собой антиген.

[0315] В некоторых вариантах осуществления изобретения способ может быть завершен за 72 часа или менее, 70 часов или менее, 65 часов или менее, 60 часов или менее, 55 часов или менее, 50 часов или менее, 45 часов или менее, 40 часов или менее, или 35 часов или менее.

[0316] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки модифицируют *in vitro* путем включения гетерологичной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки культивируют в течение короткого времени после модификации. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация не изменяет пластичность клетки. Модифицированные клетки сохраняют высокую экспрессию CD14. Модифицированные клетки не экспрессируют CD16 на более высоком уровне. Модифицированные клетки в присутствии стимула экспрессируют CCR2 и/или CCR5. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированную клетку можно культивировать в течение менее 48 часов (ч), или менее 36 часов, или менее 24 часов, или менее 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6 или менее 4 часов. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки могут быть получены замороженными и размороженными один или несколько раз до или после модификации или

и до, и после. В некоторых вариантах осуществления изобретения замораживание и оттаивание осуществляют с осторожностью, чтобы эти процессы не меняли пластичность клетки.

[0317] В одном из аспектов миелоидные клетки, представляющие терапевтический интерес, как описано в настоящем документе, обладают высокой пластичностью для эффективного использования в качестве терапевтических клеток при клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний. Выделенные CD14+/CD16-миелоидные клетки могут применяться для экспрессии химерных антигенных рецепторов (например, содержащих scFv), которые могут связываться с амилоидными бета-клетками и удалять их из нейродегенеративных бляшек и способствовать клиренсу амилоида, в качестве терапевтической стратегии при болезни Альцгеймера. В другом аспекте такие клетки можно модифицировать для экспрессии антитела против VEGF; или их можно использовать для получения лучших вакцин и сигнальных клеток против патогенной инфекции (фиг. 2).

[0318] В одном аспекте миелоидные клетки, представляющие терапевтический интерес, характеризуются высоким уровнем пластичности и могут дифференцироваться или подвергаться стимуляции для дифференцировки в ряд клеточных подтипов, которые являются высокоэффективными в отношении иммунного ответа, когда клетки сталкиваются с подходящим стимулом *in vivo*. Например, как показано на **фиг. 3**, миелоидная клетка, экспрессирующая CD14, как описано в настоящем документе, может соответствующим образом дифференцироваться в различные подтипы дендритных клеток в участке воспаления ткани или иммунного ответа. В одном варианте осуществления изобретения миелоидные клетки, представляющие терапевтический интерес, могут быть активированы, дифференцированы и/или поляризованы для получения эффекторных клеток *in vivo*, например, могут мигрировать к месту инфекции или воспаления при системном введении, могут инфильтрировать иммунологически активный участок, или, например, опухоль, и могут эффективно выполнять иммунологическую функцию на иммунологически активном участке, например, на участке микроокружения опухоли.

[0319] В одном аспекте способы, представленные в настоящем документе, являются масштабируемыми и могут быть использованы для производства терапевтически эффективных миелоидных клеток в клиническом масштабе. В некоторых вариантах осуществления изобретения CD14+/CD16- миелоидные клетки могут быть выделены и очищены с помощью негативной селекции и с использованием коммерчески доступных колонок и обработаны в клиническом масштабе; при необходимости выделенные клетки

могут быть модифицированы и использованы для получения терапевтически эффективной композиции.

Миелоидные клетки для использования в иммунотерапии рака

[0320] В одном аспекте в настоящем документе в качестве примера или как доказательство принципа представлены композиции и способ использования миелоидных клеток, представляющих терапевтический интерес, как описано в настоящем документе, в иммунотерапии рака. Миелоидные эффекторные клетки могут быть получены из выделенных миелоидных клеток, представляющих терапевтический интерес, с использованием методов, которые не изменяют пластичность этих клеток. Клетки моноцитарного происхождения являются фагоцитарными и эффективными антигенпрезентирующими клетками. Фагоциты являются естественными стражами иммунной системы и образуют первую линию защиты в организме. Они поглощают патоген, инфицированную патогеном клетку, инородное тело или раковую клетку и удаляют ее из организма. Большинство потенциальных патогенов быстро нейтрализуются этой системой, прежде чем они смогут вызвать, например, заметную инфекцию. Этот процесс может включать опосредованное рецептором поглощение через систему окаймленных клатрином ямок, пиноцитоз, в частности, макропиноцитоз, как следствие активных перемещений волны возбуждения в мембране клетки и фагоцитоза. Таким образом, фагоциты могут активироваться множеством чужеродных (и собственных) элементов и проявлять определенный уровень пластичности в распознавании своих «мишеней». Большинство фагоцитов экспрессируют на своей поверхности рецепторы-мусорщики, которые представляют собой образраспознающие молекулы и могут связываться с широким диапазоном чужеродных частиц, а также с мертвыми клетками, дебрисом и нежелательными частицами в организме. В одном из аспектов рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие химерные антигенные рецепторы (CAR), могут быть экспрессированы в клетках. CAR могут быть сконструированы различным образом для атаки на определенные опухолевые клетки, а миелоидные эффекторные клетки, экспрессирующие CAR, могут быть активированы для фагоцитоза и уничтожения опухолевых клеток. CAR могут быть сконструированы для создания фагоцитарных рецепторов, которые специфически активируются в ответ на взаимодействие с мишенью, а фагоцитарная активность макрофага усиливается за счет специально сконструированных внутриклеточных доменов рецептора. Кроме того, миелоидные эффекторные клетки, экспрессирующие CAR, могут мигрировать в лимфатические узлы и кросс-презентировать

антигены наивным Т-клеткам в лимфатическом узле, тем самым активируя адаптивный ответ.

[0321] В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем документе раскрыты композиции и способы получения миелоидных клеток, выделенных из биологического образца и модифицированных *ex vivo* для экспрессии рекомбинантного белка, и включенных в фармацевтическую композицию, так что миелоидные клетки композиции являются «эффекторными» миелоидными клетками, эффективными в индукции иммунной активации *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки, содержащиеся в композиции, называются миелоидными клетками «АТАК», где указанные клетки являются миелоидными, эффективными в атаке и разрушении клеток-мишеней.

[0322] В настоящем документе представлены композиции, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), такой как слитый белок фагоцитарного рецептора (PFP), слитый белок рецептора-мусорщика (SFP), слитый белок рецептора интегрина (IFP) или слитый белок рецептора, рекрутирующего каспазу (каспаза-CAR). CFP, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, может содержать внеклеточный домен (ECD), содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном клетки-мишени. Внеклеточный домен может быть слит с шарнирным доменом или внеклеточным доменом, полученным из рецептора, такого как CD2, CD8, CD28, CD68, фагоцитарного рецептора (PR), рецептора-мусорщика (SR) или рецептора интегрина (IR). CFP, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, может дополнительно содержать трансмембранный домен, такой как трансмембранный домен, полученный из CD2, CD8, CD28, CD68, фагоцитарного рецептора, рецептора-мусорщика или рецептора интегрина. В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, дополнительно содержит внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен, полученный из фагоцитарного рецептора, рецептора-мусорщика или рецептора интегрина. Например, внутриклеточный домен может содержать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов, полученных из фагоцитарного рецептора, рецептора-мусорщика или рецептора интегрина. Например, внутриклеточный домен может содержать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов, которые промотируют фагоцитарную активность, воспалительный ответ, продукцию оксида азота, активацию интегрина, усиленную миграцию эффекторных клеток (например, посредством экспрессии хемокинового рецептора), презентацию антигена и/или усиленную кросс-презентацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP представляет

собой слитый белок фагоцитарного рецептора (PFP). В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP представляет собой слитый белок фагоцитарного рецептора-мусорщика (PFP). В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP представляет собой слитый белок рецептора интегрина (IFP). В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP представляет собой слитый белок воспалительного рецептора. В некоторых вариантах осуществления изобретения CFP, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, дополнительно содержит внутриклеточный домен, содержащий домен рекрутирования. Например, внутриклеточный домен может содержать один или несколько доменов рекрутирования PI3K, доменов рекрутирования каспазы или доменов активации и рекрутирования каспазы (CARD).

[0323] В настоящем документе предложена композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую CFP, содержащий субъединицу фагоцитарного или связывающего (tethering) рецептора (PR) (например, слитый белок фагоцитарного рецептора (PFP)), включающую: (i) трансмембранный домен и (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен фагоцитарного рецептора; и внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный к антигену, например, к антигену клетки-мишени или презентированному на ней антигену; при этом трансмембранный домен и внеклеточный антигенсвязывающий домен функционально связаны таким образом, что связывание антигена с мишенью посредством внеклеточного антигенсвязывающего домена слитого рецептора активирует внутриклеточный сигнальный домен фагоцитарного рецептора.

[0324] В настоящем документе предложена композиция, содержащая кодирующую CFP последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую субъединицу фагоцитарного или связывающего рецептора (PR) (например, слитый белок фагоцитарного рецептора (PFP)), включающую: субъединицу PR, содержащую: трансмембранный домен и внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, специфичный к антигену клетки-мишени; при этом трансмембранный домен и внеклеточный домен функционально связаны; и при этом при связывании CFP с антигеном клетки-мишени активность в отношении уничтожения или фагоцитоза миелоидных клеток, таких как нейтрофилы, моноциты, миелоидные дендритные клетки (mDC), тучные клетки или макрофаги, экспрессирующие CFP, увеличивается по меньшей мере более, чем на 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 100%, 150%, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400

%, 450 %, 500 %, 550 %, 600 %, 650 %, 700 %, 750 %, 800 %, 850 %, 900 %, 950 % или 1000 % по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP.

[0325] В одном из аспектов в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая: (а) миелоидную клетку, такую как моноцит, предшественник моноцита, или клетку макрофага, содержащую рекомбинантную нуклеиновую кислоту, где рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий: (i) внеклеточный домен, содержащий анти-CD5-связывающий домен, и (ii) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом; и (b) фармацевтически приемлемый носитель; при этом миелоидная клетка экспрессирует CFP и демонстрирует по меньшей мере 1,1-кратное увеличение фагоцитоза клетки-мишени, экспрессирующей CD5, по сравнению с миелоидной клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления изобретения CD5-связывающий домен представляет собой CD5-связывающий белок, который содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела, Fab-фрагмент, scFv домен или sdAb домен. Иллюстративные CFP могут содержать одну или несколько аминокислотных последовательностей, приведенных в таблице ниже (Таблица 1).

Таблица 1. Примеры химерных слитых белков и рецепторных доменов

SEQ ID NO	CFP/домен	Последовательность
1	CD5-FcR-PI3K	MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYT FTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTF SLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYFDVWGQGT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRA SQDINSYLSWFQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIKSGGGGSGA LSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRLKIQV RKAATSIEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQGSYSYEDM RGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENM
2	HER2-FcR-PI3K	MWLQSLLLLGTVACSIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQD VNTAVAWYQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKVEIKRTGSTSGSGKP GSGEGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ

SEQ ID NO	CFP/домен	Последовательность
		MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDVWGQGTLVTVSSSGGGG GSGALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRL KIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ GSGS YEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENM
3	CD5-FcR- CD40	MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYT FTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTF SLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYFDVWGQGT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRA SQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK SGGGGSG ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKIQV RKAATSIEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQKKVAKKPT NKAPHPKQEPQEINFDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGK ESRISVQERQ
4	CD5-FcR- MDA5	MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYT FTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTF SLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYFDVWGQGT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICR ASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGT DYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIKSGGGGSG ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKIQV RKAATSIEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQGSGSMSNG YSTDENFRYLISCFRARKMYIQVEPVLDYLTFLPAEVKEIQRT VATSGNMQAVELLSTLEKGVWHLGWTFEALRRTGSPLAA RYMNPETDLPSPSFENAHDEYLQLLNLLQPTLVKLLVRDVL KCMEEELLTIEDRNRIAAAENNGNESGVRELLKRIVQKENWFSA FLNVLRQTGNNELVQELTGSDCSESNAEIE
5	CD5-FcR- TNFR1	MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYT FTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTF

SEQ ID NO	CFP/домен	Последовательность
		SLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYFDVWGQGT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICR ASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGT DYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGKLEIKSGGGGSG ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKIQV RKAATSIEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQGSGSQRWK SKLYSIVCGKSTPEKEGELEGTTTKPLAPNPSFSPTPGFTPTLGFSP VPSSTFTSSSTYTPGDCPNFAAPRREVAPPYQGADPILATALASDP IPNPLQKWEDSAHKPQSLDTPATLYAVVENVPPLRWKEFVRR LGLSDHEIDRLELQNGRCLREAQYSMLATWRRRTPRREATLELL GRVLRDMDLLGCLEDIEEALCGPAALPPAPSLLR
6	CD5-FcR-TNFR2	MWLQSLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYT FTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTF SLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYFDVWGQGT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICR ASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGT DYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGKLEIKSGGGGSG ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKIQV RKAATSIEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQGSGSPLCLQ REAKVPHLPADKARGTQGPEQQHLLITAPSSSSSSLESSASALDR RAPTRNQPPAPGVEASGAGEARASTGSSDSSPGGHGTQVNVTCI VNVCSSSDHSSQCSSQASSTMGDTDSSPSESPKDEQVPFSKEECA FRSQLETPETLLGSTEEKPLPLGVPDAGMKPS
7	GMCSF сигнальный пептид	MWLQSLLLGTVACSSIS
8	Вариабельный домен тяжелой цепи анти-CD5 антитела	EIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGK GLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLR AEDTAVYFCTRRGYDWYFDVWGQGTTVTV

SEQ ID NO	CFP/домен	Последовательность
9	Вариабельный домен легкой цепи анти-CD5 антитела	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPK TLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQQY DESPWTFGGGGTKLEIK
10	scFv-домен анти-CD5 антитела	EIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGK GLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLR AEDTAVYFCTRRGYDWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDINSYLSWFQQKPG KAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYY CQQYDESPWTFGGGGTKLEIK
11	scFv-домен анти-CD5 антитела	MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYT FTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTF SLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYFDVWGQGTT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCR ASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGT DYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGGTKLEIK
12	Вариабельный домен тяжелой цепи анти-HER2 антитела	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ HYTTPPTFGQGTKVEIKRTGSTSGSGKPGSGEGSEVQLVE
13	Вариабельный домен легкой цепи анти-HER2 антитела	LVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPT NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RWGGDGFYAMDVWGQGTLLTV
14	scFv-домен анти-HER2 антитела	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ HYTTPPTFGQGTKVEIKRTGSTSGSGKPGSGEGSEVQLVESSGGG GSGGGGSGGGGSLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDVWGQGTLLTV

SEQ ID NO	CFP/домен	Последовательность
15	Трансмембранный домен CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT
16	Трансмембранный домен CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
17	Трансмембранный домен CD2	IYLIIGICGGGSLLMVFVALLVFYIT
18	Трансмембранный домен CD28	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV
19	Трансмембранный домен CD68	ILLPLIIGLILLGLLALVLIAFCII
20	Шарнирный домен CD8α - цепи + трансмембранный домен	ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
21	Шарнирный домен CD8α - цепи + трансмембранный домен	ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDIYWAPLAGTCGVLLLSLVIT
22	Внутриклеточный сигнальный домен FcRγ-цепи	LYCRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPP Q
23	Внутриклеточный сигнальный	LYCRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ

SEQ ID NO	CFP/домен	Последовательность
	домен FcR γ -цепи	
24	Внутриклеточный сигнальный домен FcR γ -цепи	RLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ
25	Внутриклеточный сигнальный домен FcR γ -цепи	RLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ
26	Рекрутинговый домен PI3K	YEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENM
27	Внутриклеточный домен CD40	KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQ PVTQEDGKESRISVQERQ
28	Внутриклеточный домен TNFR1	QRWKSPLYIVCGKSTPEKEGELEGTTTKPLAPNPSFSPTPGFTPT LGFSPVPSSTFTSSSTYTPGDCPNFAAPRREVAPPYQGADPILATA LASDPIPNNPLQKWEDSAHKPQSLDTDDPATLYAVVENVPPLRWK EFVRRLLGLSDHEIDRLELQNGRCLREAQYSMLATWRRRTPRREA TLELLGRVLRDMDLLGCLEDIEEALCGPAALPPAPSLLR
29	Внутриклеточный домен TNFR2	PLCLQREAKVPHLPADKARGTQGPEQQHLLITAPSSSSSSLESSAS ALDRRAPTRNQPPAPGVEASGAGEARASTGSSDSSPGGHGTQVN VTCIVNVCSSSDHSSQCSSQASSTMGDTDSSPSESPKDEQVPFSKE ECAFRSQLETLGSTEELKPLPLGVPDAGMKPS
30	Внутриклеточный домен MDA5	MSNGYSTDENFRYLISCFRARVKMYIQVEPVLDYLTFLPAEVKE QIQRTVATSGNMQAVELLSTLEKGVHLGWTRFVEALRRTGSP LAARYMNPETDLPSPSFENAHDEYLQLLNLLQPTLVKLLVRD VLDKCMEEELLTIEDRNRIAAAENNGNESGVRELLKRIVQKENW FSAFLNVLRQTGNNELVQELTGSDCSNAEIE
31	Внеклеточный связывающий домен анти-CD137	MEFGLSWFLVAILKGVQCGLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN

SEQ ID NO	CFP/домен	Последовательность
		SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPPSPRSE
32	Внеклеточный связывающий домен анти-CD70	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGTTVTVSSGSTSGSGKP GSSEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSF MHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS LQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIK
33	Внеклеточный связывающий домен анти-клаудина18.2	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGYNWHWIRQPPGK GLEWIGYIHYTGSTNYPALRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARIYNGNSFPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIVMTQSPDSLAYS LGERATINCKSSQSLFNSGNQKNYLTWYQ QKPGQP PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDIFITIS LQAEDV AVYYCQNAYSFPYTFGGGKLEIKR
34	Внеклеточный связывающий домен анти-Trop-2	DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSI AVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS LQPEDFAVYYCQQ HYITPLTFGAGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGSEL KKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWFYDVWGQGLSLTVSS
35	Внеклеточный связывающий домен анти-Trop-2	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISS LKADDTAVYFCARGGGFGSSYWFYDVWGQGLSLTVSSGGGGSGG GSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSI AVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS LQPEDF AVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKR

[0326] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям и способам опосредованного рекрутером усиления активации миелоидных клеток, приводящей к иммунотерапии рака. Предложенные здесь способы помогают разработать инструменты, которые могут индуцировать превращение резидентных человеческих моноцитов или макрофагов в эффективные клетки-киллеры, которые нацелены на раковые клетки и уничтожают их посредством эффективного фагоцитоза. В

некоторых вариантах осуществления изобретения моноциты или макрофаги обеспечивают устойчивый иммунологический ответ против раковой клетки. Здесь описаны различные варианты осуществления изобретения.

[0327] В настоящем документе предложены конкретные конструкты и конструкции химерных белков, называемых химерными «рекрутерами». Рекрутеры можно вводить непосредственно нуждающемуся в этом субъекту в качестве терапевтических нуклеиновых кислот или терапевтических белков, которые могут активировать миелоидные клетки *in vivo* и помогать миелоидным клеткам взаимодействовать *in vivo* с клетками-мишенями, например раковой клеткой или инфицированной клеткой.

[0328] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные рекрутеры содержат два или более слитых антител, каждое из которых содержит участок для специфического связывания с клеткой-мишенью, такой как раковая клетка, моноцит или макрофаг. В некоторых вариантах осуществления изобретения два или несколько слитых антител или иммуноглобулинов содержат связывающийся с мишенью домен, функционально соединенный через шарнирный C_H2-C_H3-домен или шарнирный C_H3-домен константной области иммуноглобулина с доменом связывания эффектора, который специфически связывается с компонентом клеточной поверхности моноцита или макрофага.

[0329] В одном из аспектов химерный белок представляет собой биспецифический рекрутер моноцитов или макрофагов. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифический рекрутер содержит первый терапевтический агент, при этом первый терапевтический агент содержит: (i) первый антигенсвязывающий домен, который специфически взаимодействует с антигеном клетки-мишени, и (ii) второй антигенсвязывающий домен, который специфически взаимодействует с внеклеточной областью рецептора моноцита или макрофага. В одном из вариантов осуществления изобретения терапевтический агент представляет собой биспецифический рекрутер. В одном из вариантов осуществления изобретения биспецифический рекрутер моноцитов или макрофагов содержит только два одноцепочечных переменных фрагмента антитела (scFv) (без включения аминокислотных фрагментов Fc) и гибкий линкер, один scFv связывается с компонентом клеточной поверхности клетки-мишени, а другой связывается с рецептором на поверхности клеток моноцитов или макрофагов. В полноразмерных немодифицированных формах IgG переменный домен легкой цепи (V_L) и переменный домен тяжелой цепи (V_H) представляют собой отдельные полипептидные цепи, т.е. расположены в легкой цепи и тяжелой цепи, соответственно. Взаимодействие легкой цепи антитела и тяжелой цепи антитела, в частности взаимодействие V_L и V_H доменов, формирует один из эпитоп-связывающих участков антитела. В конструкции scFv, напротив,

V_L и V_H домены антител находятся в одной полипептидной цепи. Два домена разделены гибкими линкерами достаточной длины, чтобы обеспечить самосборку V_L и V_H доменов в функциональный эпитоп-связывающий сайт.

[0330] В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифический рекрутер моноцитов или макрофагов содержит: (а) одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который связывается с компонентом клеточной поверхности клетки-мишени, например, раковым антигеном, (b) одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который связывается с компонентом клеточной поверхности эффекторной клетки, например моноцитом или макрофагом, (с) короткий линкер, функционально связывающий (а) и (b). В некоторых вариантах осуществления изобретения указанные scFv слиты через свои С-концы. Каждый scFv содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, функционально связанные пептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления изобретения scFv являются гуманизированными. Гуманизированные scFv содержат «определяющие комплементарность участки» (CDR), которые находятся в структуре иммуноглобулина другого вида, отличающегося от исходного иммуноглобулина, из структуры которого были получены CDR. Например, для получения «гуманизированного антитела» мышинные CDR могут быть пересажены в каркасную область человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифический рекрутер представляет собой диатело. В конструкции биспецифического диатела V_L и V_H домены расположены на одной полипептидной цепи и специфически связываются с разными (неидентичными) эпитопами. Кроме того, линкер, соединяющий V_L и V_H домены, имеет длину менее 12 аминокислот, что недостаточно для сборки в функциональный эпитоп. Обычно одна полипептидная цепь содержит V_L , специфически связывающийся с первым антигеном, и V_H , специфически связывающийся со вторым антигеном, а другая полипептидная цепь содержит V_L , специфически связывающийся со вторым антигеном, и V_H , специфически связывающийся с первым антигеном; две полипептидные цепи могут самостоятельно собраться в биспецифическое диатело. В некоторых вариантах осуществления изобретения на С-конце цепи может быть вставлен остаток цистеина, что позволяет обеспечить образование дисульфидной связи между двумя цепями без нарушения связывающих свойств молекулы рекрутера. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифический рекрутер представляет собой тандем ди-scFv. В некоторых вариантах осуществления изобретения могут быть получены конструкции рекомбинантных нуклеиновых кислот, кодирующих биспецифический scFv рекрутер. Конструкции рекомбинантных нуклеиновых кислот, предназначенные для экспрессии биспецифического scFv рекрутера, содержащего один или несколько

полипептидов, кодируют (а) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный домен легкой цепи scFv, связывающийся с клеткой-мишенью, линкер, переменный домен тяжелой цепи scFv, связывающийся с клеткой-мишенью; (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую линкер; (c) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный домен легкой цепи scFv, связывающий эффекторную (моноцит или макрофаг) клетку, линкер, переменный домен тяжелой цепи scFv, связывающий эффекторную (моноцит или макрофаг) клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкции нуклеиновых кислот, предназначенных для экспрессии биспецифического scFv рекрутера, содержат N-концевую последовательность сигнального пептида для секреции биспецифического scFv рекрутера.

[0331] В некоторых вариантах осуществления изобретения короткий линкер, функционально соединяющий (a) и (b), может также выполнять дополнительные функции. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептиды могут связываться со специфическим рецептором клеточной поверхности, например, таким как TLR рецептор, и активировать опосредованный рецептором клеточный сигнальный путь в моноците или макрофаге. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер сконструирован таким образом, чтобы он мог связываться и активировать по меньшей мере воспалительный путь в моноците или макрофаге или усиливать опосредованный моноцитами или макрофагами фагоцитоз и уничтожение клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения функция линкерного пептида может заключаться в блокировании или ингибировании опосредованного клеткой-мишенью подавления клеточной функции моноцита или макрофага.

[0332] В некоторых вариантах осуществления изобретения могут быть получены конструкции нуклеиновой кислоты для биспецифического V_{HH} рекрутера, которые содержат: (a) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую (a) V_{HH} домен, который связывается с компонентом клеточной поверхности клетки-мишени, например, раковым антигеном, (b) V_{HH} домен, который связывается с компонентом клеточной поверхности эффекторной клетки, например, моноцитом или макрофагом, (c) короткий линкер, функционально соединяющий (a) и (b). В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкции нуклеиновой кислоты, предназначенные для экспрессии биспецифического scFv рекрутера, содержат N-концевую последовательность сигнального пептида для секреции биспецифического scFv рекрутера.

[0333] Как известно специалистам в данной области, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды, содержащие V_{HH} или scFv связывающие домены, могут быть вставлены в подходящий экспрессионный вектор под одним или несколькими

промоторами, например, CMV на 5'-конце, и сигналом полиаденилирования на 3'-конце последовательностей, кодирующих полипептиды.

[0334] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный белок представляет собой биспецифический рекрутер.

[0335] Триспецифический рекрутер содержит первый терапевтический агент, где первый терапевтический агент содержит: первый антигенсвязывающий домен, который специфически взаимодействует с антигеном клетки-мишени; второй антигенсвязывающий домен, который специфически взаимодействует с внеклеточной областью первого рецептора моноцита или макрофага; и третий антигенсвязывающий домен, который специфически взаимодействует с внеклеточной областью второго рецептора моноцита или макрофага.

[0336] В некоторых вариантах осуществления изобретения триспецифический рекрутер представляет собой слитую конструкцию из трех scFv, содержащую первый scFv, специфичный к компоненту клеточной поверхности на раковой клетке-мишени, второй scFv, специфичный к компоненту клеточной поверхности моноцита или макрофага, например, химерный фагоцитарный рецептор, и третий scFv, специфичный к другому компоненту клеточной поверхности моноцита или макрофага. В некоторых вариантах осуществления изобретения триспецифический рекрутер сконструирован таким образом, что компонент клеточной поверхности на моноците или макрофаге, с которым может связываться третий scFv, обеспечивает дополнительный сигнал активации для моноцита или макрофага, запускающий фагоцитоз и уничтожение клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения третий scFv связывается с другим фагоцитарным рецептором на моноците или макрофаге. В некоторых вариантах осуществления изобретения третий scFv связывается с моноцитарным или макрофагальным сигнальным паттерном (DAMP), ассоциированным с опасностью. В некоторых вариантах осуществления третий scFv связывается с рецептором TLR. В некоторых вариантах осуществления изобретения третий scFv связывается с цитокиновым рецептором, который активирует рецептор и запускает внутриклеточный сигналинг моноцитов или макрофагов. В некоторых вариантах осуществления изобретения третий scFv связывается с рецептором моноцита или макрофага, о котором известно, что он генерирует ингибирующий фагоцитоз сигнал, и это связывание третьего scFv с рецептором блокирует рецептор, обеспечивая усиленный фагоцитоз. В некоторых вариантах осуществления изобретения третий scFv связывается с рецептором, который связывается с одним или несколькими трансмембранными доменами и усиливает фагоцитарную передачу сигналов.

[0337] В некоторых вариантах осуществления изобретения би- или триспецифические рекрутеры связываются с антигеном на раковой клетке, выбранным из группы, состоящей из тимидинкиназы (TK1), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), рецепторного тирозинкиназоподобного орфанного рецептора 1 (ROR1), Муцина-1, Муцина-16 (MUC16), MUC1, рецептора эпидермального фактора роста vIII (EGFRVIII), мезотелина, рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), EBNA-1, LEMD1, фосфатидилсерина, карциноэмбрионального антигена (CEA), антигена созревания В-клеток (BCMA), глипикана 3 (GPC3), рецептора фолликулостимулирующего гормона, белка активации фибробластов (FAP), эритропоэтин-продуцирующего гепатоцеллюлярного рецептора A2 (EphA2), EphB2, лиганда группы натуральных киллеров 2D (NKG2D), Дисиалоганглиозида 2 (GD2), CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD45, CD56CD79b, CD97, CD117, CD123, CD133, CD138, CD171, CD179a, CD213A2, CD248, CD276, PSCA, CS-1, CLECL1, GD3, PSMA, FLT3, TAG72, EPCAM, IL-1, рецептора интегрина, PRSS21, VEGFR2, PDGFR-бета, SSEA-4, EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, GM3, TEM7R, CLDN6, TSHR, GPRC5D, ALK, IGLL1 и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, например, раковый антиген для раковой клетки-мишени может представлять собой один или несколько мутантных/раковых антигенов: MUC16, CCAT2, CTAG1A, CTAG1B, MAGE A1, MAGEA2, MAGEA3, MAGE A4, MAGEA6, PRAME, PCA3, MAGE C1, MAGEC2, MAGED2, AFP, MAGEA8, MAGE9, MAGEA11, MAGEA12, IL13RA2, PLAC1, SDCCAG8, LSP1, CT45A1, CT45A2, CT45A3, CT45A5, CT45A6, CT45A8, CT45CTA10, CT47A1, CT44A3, CT44A2, CT47A6, CT47A8, CT47A9, CT47A10, CT47A11, CT47A12, CT47B1, SAGE1 и CT55. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген на раковой клетке выбран из группы, состоящей из CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CCR4, CD8, CD30, CD45, CD56.

[0338] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой антиген рака яичников или антиген Т-лимфомы.

[0339] В некоторых вариантах осуществления изобретения раковый антиген для раковой клетки-мишени, например, может представлять собой один или несколько мутантных/раковых антигенов: IDH1, ATRX, PRL3 или ETBR, где рак представляет собой глиобластому.

[0340] В некоторых вариантах осуществления изобретения, раковый антиген для раковой клетки-мишени, например, может представлять собой один или несколько мутантных/раковых антигенов: CA125, бета-hCG, фрагмент мочевого гонадотропина, AFP, CEA, SCC, ингибин или эстрадиол, где рак представляет собой рак яичников. В некоторых

вариантах осуществления изобретения раковым антигеном для раковой клетки-мишени может быть CD5. В некоторых вариантах осуществления изобретения раковым антигеном для раковой клетки-мишени может быть HER2. В некоторых вариантах осуществления изобретения раковый антиген для раковой клетки-мишени может представлять собой вариант III EGFR. В некоторых вариантах осуществления изобретения раковым антигеном для раковой клетки-мишени может быть CD19. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой интегриновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой интегриновый рецептор, выбранный из группы, состоящей из $\alpha 1$, $\alpha 2$, αIIb , $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, αD , αE , αL , αM , αV , αX , $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$ и $\beta 8$. В некоторых вариантах осуществления изобретения би- или триспецифический рекрутер связывается с внеклеточным доменом рецептора моноцита или макрофага члена подсемейства $\alpha \text{M}\beta 2$ из семейства $\beta 2$ -интегринов (CD11b/CD18, Mac-1, CR3, Mo-1), $\alpha \text{L}\beta 2$ (CD11a/CD18, LFA-1), $\alpha \text{X}\beta 2$ (CD11c/CD18) и $\alpha \text{D}\beta 2$ (CD11d/CD18). В некоторых вариантах осуществления изобретения рекрутеры содержат связывающий домен, который может связываться с внеклеточным доменом адгезионной молекулы, такой как интегрин или селектин, например, Р-селектин, L-селектин или E-селектин.

[0341] Рецепторы макрофагов, которые активируют фагоцитоз, содержат внутриклеточный сигнальный домен фагоцитоза, который содержит домен, содержащий один или несколько иммунорецепторных тирозиновых активационных мотивов (ITAM). В некоторых вариантах осуществления изобретения би- и триспецифический рекрутер содержит связывающий домен, который связывается с рецептором-мусорщиком моноцитов или макрофагов. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание рекрутера с одним или несколькими из этих рецепторов на моноците или макрофаге предназначено для активации фагоцитоза моноцитом или макрофагом. В настоящее время известно восемь классов рецепторов-мусорщиков (классы А-Н). В некоторых случаях один и тот же рецептор имеет несколько названий (например, MSR1, SR-AI, CD204 и SCARA1). Кроме того, существуют белки, проявляющие активность рецепторов-мусорщиков, которые были названы на основании других критериев и не включены в общую номенклатуру рецепторов-мусорщиков. Некоторые примеры включают RAGE (SR-E1), LRP1, LRP2, ASGP, CD163, SR-PSOX и CXCL16. В некоторых вариантах осуществления изобретения би- или триспецифический рекрутер содержит связывающий домен, который связывается с рецептором-мусорщиком, выбранным из лектина, дектина 1, маннозного рецептора (CD206), рецептора-мусорщика A1 (SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1,

STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L) и рецептора CD169. В некоторых вариантах осуществления изобретения би- или триспецифический рекрутер содержит связывающий домен, который связывается с белком, который может генерировать сигналы активации фагоцитоза или провоспалительные сигналы, например, посредством активации любого из: MRC1, ItgB5, MERTK, ELMO, BAIL Tyro3, Axl, Traf6, Syk, MyD88, Zap70, PI3K, FcγR1, FcγR2A, FcγR2B2, FcγR2C, FcγR3A, FcER1, FcαR1, BAFF-R, DAP12, NFAM1 и CD79b .

[0342] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекрутеры могут быть сконструированы так, чтобы содержать домены, которые стимулируют воспалительную активность миелоидных клеток, так что связывающие домены могут взаимодействовать с TLR. В некоторых вариантах осуществления изобретения сконструированные рекрутеры содержат домены, которые промотируют клеточную адгезию и воспалительную активность миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения сконструированные рекрутеры содержат связывающие домены, которые ингибируют антифагоцитарную и противовоспалительную активность миелоидной клетки. Например, би- или триспецифический рекрутер может содержать дополнительный функциональный домен, который ингибирует опосредованное CD47 подавление фагоцитоза моноцитов или макрофагов. Опухолевые клетки обычно экспрессируют «не ешь меня» сигнальный CD47, который связывается с моноцитарным или макрофагальным рецептором SIRP-α и ингибирует фагоцитоз. Одно плечо би- или триспецифического рекрутера может содержать блокатор CD47. Блокатор CD47, связанный с рекрутером, может представлять собой внеклеточный CD47-связывающий домен SIRP-α, действующий как рецептор-ловушка или нейтрализующий рецептор.

[0343] Иллюстративный би- или триспецифический рекрутер может содержать аминокислотную последовательность связывающей молекулы или связывающего домена или их частей, содержащих любой из связывающих доменов или их фрагментов, раскрытых в SEQ ID NO: 8-14.

[0344] Связывающие домены связываются со своими соответствующими лигандами с константой диссоциации (K_D) от 10^{-5} до 10^{-12} М или менее, или от 10^{-7} до 10^{-12} М или менее, или от 10^{-8} до 10^{-12} М (т.е. с константой ассоциации (K_A) от 10^5 до 10^{12} М или более, или от 10^7 до 10^{12} М или более, или от 10^8 до 10^{12} М).

[0345] Иллюстративная анти-CD5 связывающая молекула может содержать тяжелую цепь, содержащую последовательность:

MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAP
GKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRR
GYDWYFDVWGQGTTVTV (**SEQ ID NO: 36**)

или

MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAP
GKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRR
GYDWYFDVWGQGTTVTVSS (**SEQ ID NO: 37**), или последовательность, по меньшей
мере на 90% идентичную **SEQ ID NO: 36** или **SEQ ID NO: 37**.

[0346] Другая иллюстративная анти-CD5-связывающая молекула может содержать
тяжелую цепь, содержащую последовательность:

EIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGE
PTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYFDVWGQGTTVT
V (**SEQ ID NO: 38**) или последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную **SEQ ID
NO: 38**, или

EIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGE
PTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYFDVWGQGTTVT
VSS (**SEQ ID NO:39**) или последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную **SEQ
ID NO:39**.

[0347] Иллюстративная анти-CD5 связывающая молекула может содержать легкую цепь,
содержащую последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPS
RFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK (**SEQ ID NO:40**) или
последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную **SEQ ID NO:40**.

[0348] Иллюстративный биспецифический или триспецифический рекрутер, такой как
биспецифический или триспецифический рекрутер, содержащий анти-CD5 scFv, может
содержать короткий пептидный линкер, соединяющий иллюстративные тяжелую цепь и
легкую цепь, и имеющий последовательность: SSGGGGSGGGGSGGGGS (**SEQ ID NO: 41**)
или SGGGGS (**SEQ ID NO: 42**), или GGGGS (**SEQ ID NO: 43**), или GGGG (**SEQ ID NO:
44**) .

[0349] Иллюстративный анти-CD5 scFv может содержать аминокислотную
последовательность:

MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAP
GKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRR
GYDWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICR
ASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGI

YYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 45) или последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 45.

[0350] Иллюстративный анти-CD16 scFv может содержать варибельную последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность:

QVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGST
SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGSAYYDFADYWGQGT
LVTSS (SEQ ID NO: 46) или последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 46.

[0351] Иллюстративный анти-CD16 scFv может содержать варибельную последовательность легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность:
SYVLTQPSSVSVAPGQTATISCGGHNIGSKNVHWYQQRPGQSPVLVIYQDNKRPSGIPER
FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQVWDNYSVLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 47),
или последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 47.

[0352] В одном из аспектов миелоидные клетки, включенные в композицию, могут содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую антиген или иммуногенный белок. Клетки можно применять для лечения иммунологического заболевания, например, такого как рак или микробная инфекция. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта индуцируется антиген-специфический иммунный ответ посредством введения субъекту эффективного количества вакцинных композиций, содержащих миелоидные клетки, содержащие экзогенную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую антиген или иммуногенный белок. Антигенный полипептид представляет собой полипептид, который способен специфически распознаваться адаптивной иммунной системой. Антигенный полипептид включает любой полипептид, который является иммуногенным. Антигенные полипептиды включают, но не ограничиваются следующими: антигены, связанные с патогеном, аллергеном, опухолью, раком или другим заболеванием. Патогены могут быть вирусными, паразитарными, грибковыми и бактериальными патогенами, а также белковыми патогенами, такими как прионы. Антигенные полипептиды могут представлять собой полноразмерные белки или их части. Хорошо известно, что распознавание иммунной системой многих белков основано на относительно небольшом числе аминокислот, часто называемых эпитопами. Эпитопы могут состоять всего из 8-10 аминокислот. Таким образом, описанные здесь антигенные полипептиды могут представлять собой полноразмерные белки, эпитопы длиной 8 аминокислот или участки длиной 10, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50 аминокислот или любого размера между этими крайними значениями. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенный полипептид может

включать более одного эпитопа. В настоящем документе представлены фармацевтические композиции, содержащие противоопухолевые вакцинные композиции на клеточной основе (т.е., нагруженные антигеном моноциты и фармацевтически приемлемый носитель). Иммуногенные вакцинные композиции или терапевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут содержать композицию, содержащую миелоидные клетки по настоящему изобретению, выделенные из биологического источника и модифицированные для экспрессии экзогенной нуклеиновой кислоты, экспрессирующей один или несколько опухолевых антигенов, с использованием способа, раскрытого в настоящем документе, и которые при введении нуждающемуся в этом субъекту эффективны для получения противоопухолевого Т-клеточного иммунитета. Вакцинная композиция может содержать по меньшей мере 50% клеток, которые являются CD14⁺ и CD16⁻ клетками, причем такие CD14⁺/CD16⁻ клетки экспрессируют один или несколько антигенных пептидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее 10% клеток в композиции представляют собой дендритные клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения общее количество макрофагов в клеточной композиции не превышает 40% от общего количества клеток. Макрофаги могут быть охарактеризованы как экспрессирующие множество маркеров клеточной поверхности, например, CD14, CD16, CD64, CD68, CCR5, CD206, F4/80 и т. д. В некоторых вариантах осуществления изобретения общее количество макрофагов в клеточной композиции может быть менее 30%, 20% или 10%.

[0353] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуногенный или антигенный пептид, который представляет собой мутантный пептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенный пептид представляет собой пептид, ассоциированный с опухолью. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенный пептид представляет собой мутантный пептид, присутствующий только в раковой ткани, например в опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или более чем один антигенный пептид и один или более пептидных или белковых адъювантов могут кодироваться рекомбинантной нуклеиновой кислотой, используемой для конструирования миелоидной клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой антиген рака яичников или антиген Т-лимфомы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, например, раковый антигенный полипептид, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, содержит антиген, или его фрагмент, или его эпитоп, который может быть выбран из одного или нескольких мутантных/раковых антигенов: MUC16, CCAT2, CTAG1A, CTAG1B, MAGE A1, MAGEA2, MAGEA3, MAGE A4, MAGEA6, PRAME, PCA3, MAGE C1, MAGEC2, MAGED2, AFP, MAGEA8, MAGE9,

MAGEA11, MAGEA12, IL13RA2, PLAC1, SDCCAG8, LSP1, CT45A1, CT45A2, CT45A3, CT45A5, CT45A6, CT45A8, CT45A10, CT47A1, CT47A2, CT47A3, CT47A4, CT47A5, CT47A6, CT47A8, CT47A9, CT47A10, CT47A11, CT47A12, CT47B1, SAGE1 и CT55.

[0354] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная миелоидная клетка содержит, презентует или экспрессирует один или несколько экзогенных или рекомбинантных опухолевых антигенов. В некоторых вариантах осуществления изобретения опухолевые антигены представляют собой тканеспецифические антигены. В некоторых вариантах осуществления изобретения опухолевые антигены представляют собой эндогенные сверхэкспрессированные антигены. В некоторых вариантах осуществления изобретения опухолевые антигены представляют собой мутантные белковые антигены. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная миелоидная клетка содержит, презентует или экспрессирует антиген меланомы, такой как антиген родственного тирозиназе белка 2 (TRP2), такой как эпитоп TRP2, такой как аминокислоты 180-188 TRP2 (SVYDFFVWL (**SEQ ID NO: 49**)). В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная миелоидная клетка содержит, презентует или экспрессирует мутантный антиген, например антиген глиобластомы, например, антиген изоцитратдегидрогеназы 1 (mIDH1), такой как мутантный антиген IDH1 (R132H), такой как GWVKPIIGHNHAYGDQYRATDFVVP (**SEQ ID NO: 48**). В некоторых вариантах осуществления изобретения способ может включать введение миелоидной клетки, которая содержит, презентует или экспрессирует один или несколько экзогенных или рекомбинантных антигенов, для лечения рака, такого как рак головного мозга, глиома или глиобластома.

[0355] В некоторых вариантах осуществления изобретения, например, миелоидная клетка содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуногенный или антигенный пептид, где иммуногенный или антигенный пептид может представлять собой один или несколько мутантных/раковых антигенов: IDH1, ATRX, PRL3 или ETBR, где рак представляет собой глиобластому (GBM). В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенный пептид для GBM представляет собой мутантный IDH. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный IDH содержит мутацию R13H и может содержать аминокислотную последовательность GWVKPIIGHNHAYGDQYRATDFVVP (**SEQ ID NO: 48**).

[0356] В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуногенный пептид представляет собой пептид TRP2(180-188), содержащий эпитоп, имеющий аминокислотную последовательность SVYDFFVWL (**SEQ ID NO: 49**).

[0357] В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенный пептид представляет собой CMVpp65 пептид.

[0358] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит эндосомальную нацеливающую последовательность, при этом эндосомальная нацеливающая последовательность представляет собой последовательность LAMP1.

[0359] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит секреторную последовательность, которая представляет собой последовательность секреторного сигнального пептида сигнальной последовательности человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), сигнальную последовательность тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина, сигнальную последовательность легкой цепи человеческого иммуноглобулина, сигнальную последовательность человеческого сывороточного альбумина или сигнальную последовательность человеческого азуроцидина, цистатин человека.

[0360] В одном варианте осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота, используемая для воздействия на миелоидную клетку, представляет собой мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения проводят обратную транскрипцию мРНК и очищают ее. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК вводят в клетку путем электропорации. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК сконструирована для обеспечения длительного периода полужизни. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК содержит длинный поли-А-хвост. В некоторых вариантах осуществления изобретения 3'UTR мРНК содержит участок 3'-UTR мРНК бета-глобина.

[0361] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой кольцевую РНК.

[0362] В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, содержит последовательность ретротранспозона. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный CAR, помещена в элемент ретротранспозона. В некоторых вариантах осуществления изобретения ретротранспозон содержит элемент Alu.

[0363] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложенный здесь способ включает стабильную интеграцию трансгена в геном клетки, причем способ включает: введение в клетку мРНК, содержащей: (а) последовательность, кодирующую трансген; (b) 5'-UTR нуклеотидную последовательность и 3'-UTR нуклеотидную последовательность, фланкирующие последовательность, кодирующую трансген; при этом 5'-UTR

нуклеотидная последовательность или 3'-UTR нуклеотидная последовательность содержит один или несколько из: (i) сайта связывания эндонуклеазы, (ii) сайта связывания обратной транскриптазы, (iii) сайта связывания рибосомы, (iv) сайта связывания ретротранспозазы и (v) последовательности поли-А; при этом последовательность, кодирующая трансген, находится в смысловом или антисмысловом направлении, и при этом трансген стабильно инкорпорирован в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно включает введение в клетки последовательности, кодирующей эндонуклеазу и/или обратную транскриптазу. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК содержит последовательность, кодирующую эндонуклеазу и/или обратную транскриптазу.

[0364] В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза и/или обратная транскриптаза представляют собой ORF2p.

[0365] В некоторых вариантах осуществления изобретения ретротранспозаза представляет собой белок ORF L1. В некоторых вариантах осуществления изобретения ретротранспозаза представляет собой белок L1 ORF2p. В некоторых вариантах осуществления изобретения ретротранспозаза представляет собой белок L1 ORF1p. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность поли-А представляет собой праймирующую последовательность геномной ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность поли-А представляет собой праймер сайта-мишени для обратной транскрипции.

[0366] В некоторых вариантах осуществления изобретения праймирующая последовательность геномной ДНК содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять нуклеотидов, смежных с поли-А-последовательностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять нуклеотидов, смежных с поли-А-последовательностью, образуют праймер сайта-мишени для обратной транскрипции. В некоторых вариантах осуществления изобретения праймирующая последовательность геномной ДНК содержит специфическую последовательность, на которую нацелен геном. В некоторых вариантах осуществления изобретения 5'-UTR или 3'-UTR содержит последовательность SINE. В некоторых вариантах осуществления изобретения 5'-UTR содержит последовательность Alu. В некоторых вариантах осуществления изобретения 3'-UTR содержит последовательность Alu. В некоторых вариантах осуществления изобретения 5'-UTR содержит последовательность L1. В некоторых вариантах осуществления изобретения 3'-UTR содержит последовательность L1. В некоторых

вариантах осуществления изобретения трансген ретротранспозирован в геномную ДНК. Согласно описанию, трансген может содержать последовательность, кодирующую CFP, рекрутер или антигенный полипептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансген ретротранспозирован в *транс*-положении. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансген ретротранспозирован в *цис*-положении. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансген ретротранспозирован в конкретном геномном локусе. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно включает один или несколько стоп-кодонов, примыкающих к 3'-концу трансгена. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько стоп-кодонов, примыкающих к 3'-концу трансгена, функционально связаны с трансгеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько стоп-кодонов, примыкающих к 3'-концу трансгена, расположены тандемно. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько стоп-кодонов, смежных с 3'-концом трансгена, расположены в отдельных рамках считывания. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение в миелоидную клетку нуклеиновой кислоты, кодирующей L1-ORF2.

[0367] В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный здесь способ включает введение в миелоидную клетку нуклеиновой кислоты, кодирующей белок химерного антигенного рецептора, и одной или нескольких дополнительных нуклеиновых кислот, кодирующих один или несколько дополнительных белков или пептидов. Например, способ включает введение в миелоидную клетку нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, и второй нуклеиновой кислоты, кодирующей второй белок или пептид. Например, способ включает введение в миелоидную клетку нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, и второй нуклеиновой кислоты, кодирующей второй белок или второй пептид; и третьей нуклеиновой кислоты, кодирующей третий белок или третий пептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или несколько дополнительных нуклеиновых кислот, кодирующих один или несколько дополнительных белков или пептидов, могут быть дополнительно введены в миелоидную клетку для обеспечения увеличения экспрессии CAR. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или несколько дополнительных нуклеиновых кислот могут кодировать фактор роста миелоидной клетки или усиливать фагоцитарную функцию или любую другую связанную функцию. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или несколько дополнительных нуклеиновых кислот могут кодировать белок, положительно регулирующий хемотаксис. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или несколько дополнительных нуклеиновых кислот могут кодировать белок, который усиливает экспрессию трансгена, инкорпорированного в миелоидную клетку.

[0368] В одном из вариантов осуществления изобретения одна или несколько дополнительных нуклеиновых кислот содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую белок межклеточных щелевых контактов. В одном из вариантов осуществления изобретения коэкспрессия белка межклеточных щелевых контактов усиливает экспрессию трансгена CAR, инкорпорированного в миелоидную клетку. Щелевые контакты представляют собой динамические структуры, состоящие из сотен и тысяч каналов, построенных из коннексинов, организованных в квазикристаллические структуры. Эти межклеточные структуры позволяют соседним клеткам вступать в непосредственное взаимодействие, обеспечивая прохождение ионов и небольших метаболитов, а также нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или несколько дополнительных нуклеиновых кислот кодируют адгезивную молекулу. Молекулы клеточной адгезии обладают способностью позволять клеткам прикрепляться друг к другу и к внеклеточному матриксу, а также позволяют клеткам взаимодействовать и передавать информацию друг другу и их окружению и, таким образом, регулировать ряд клеточных функций, включая пролиферацию, экспрессию генов, дифференцировку, апоптоз и миграцию. Иллюстративные адгезионные молекулы включают, но не ограничиваются членами семейства интегринов, селектинов, кадгеринов, членами, принадлежащими к суперсемейству иммуноглобулинов, и членами семейства CD44. В некоторых вариантах осуществления изобретения в миелоидную клетку вводят вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую, например, ICAM-1, для коэкспрессии с CAR в той же клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая VCAM-1, коэкспрессируется в миелоидной клетке вместе с CAR. В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая нуклеиновая кислота кодирует селектин. В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая нуклеиновая кислота кодирует CD49a/CD29, или CD49b/CD29, или CD49c/CD29, или CD49d/CD29, или CD49e/CD29, или CD49f/CD29. В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая нуклеиновая кислота и/или любые дополнительные нуклеиновые кислоты, кодирующие второй белок или пептид, или дополнительный белок или пептид, находятся в векторе, например, экспрессионном векторе, причем экспрессионный вектор содержит регуляторные элементы, которые могут быть сконструированы для контролируемой экспрессии, например, экспрессии, контролируемой переключателем транскрипции «on-off». Примеры векторов с переключателем транскрипции «on-off» могут включать системы, регулируемые тетрациклином (системы Tet-on, Tet-off), известные специалистам в данной области, или могут быть легко сконструированы специалистом в данной области.

[0369] В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или несколько дополнительных нуклеиновых кислот, например вторые нуклеиновые кислоты, содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует коннексин. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или несколько дополнительных нуклеиновых кислот содержат нуклеиновую кислоту, которая кодирует коннексин 43. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая коннексин 43, упакована в экспрессионный вектор, причем вектор содержит промотор, необязательно энхансер, 5'-UTR и 3'-UTR, стабилизирующий фрагмент в 3'UTR, такой как область BGH3', и поли-А полинуклеотиды, функционально связанные с областью нуклеиновой кислоты, кодирующей коннексин. В некоторых вариантах осуществления изобретения коннексин 43 сверхэкспрессируется в клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая коннексин, отделена от нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор, CAR. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, находится в другом векторе, чем CAR. В некоторых вариантах осуществления изобретения CAR доставляется в миелоидную клетку в виде «голой» нуклеиновой кислоты, в то время как одна или несколько нуклеиновых кислот, содержащих одну нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, экспрессируются в экспрессионном векторе. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессионный вектор содержит CMV промотор. В некоторых вариантах осуществления изобретения коннексин 43 сверхэкспрессирован. В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая нуклеиновая кислота и/или любые дополнительные нуклеиновые кислоты, кодирующие второй белок или пептид, или дополнительный белок или пептид, находятся в векторе, например, экспрессионном векторе, при этом экспрессионный вектор содержит регуляторные элементы, которые могут быть сконструированы для контролируемой экспрессии, например, экспрессии, контролируемой переключателем транскрипции «on-off». Примеры векторов с переключателем транскрипции «on-off» могут включать системы, регулируемые тетрациклином (системы Tet-on, Tet-off), известные специалистам в данной области, или могут быть легко сконструированы специалистом в данной области.

[0370] В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновую кислоту, например рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный белок, вводят в миелоидные клетки посредством химической трансфекции или электропорации. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновую кислоту вводят в миелоидную клетку посредством электропорации.

[0371] В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

[0372] В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК в целях терапевтического воздействия непосредственно вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК инкапсулирована в липид. В некоторых вариантах осуществления изобретения РНК модифицирована для облегчения поглощения преимущественно миелоидными клетками при введении *in vivo*. Модификации РНК могут включать гликозилирование. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК специфически модифицируют посредством гликозилирования для продления стабильного существования в кровотоке до того, как она будет поглощена фагоцитирующими клетками.

[0373] В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновую кислоту вводят субъекту внутривенно.

[0374] В некоторых вариантах осуществления изобретения на клетку, экспрессирующую CAR, можно дополнительно воздействовать для снижения экспрессии одного или нескольких эндогенных генов. В некоторых вариантах осуществления изобретения воздействие может включать редактирование эндогенного гена на уровне генома миелоидной клетки или до последующего введения нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR. Например, ген или его регуляторный фрагмент могут быть отредактированы в миелоидной клетке для усиления одной или нескольких функций миелоидной клетки.

[0375] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка, экспрессирующая CAR, демонстрирует увеличение продукции цитокинов и хемокинов по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления изобретения цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-3, IL-6, IL-12, IL-13, IL-23, TNF, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL17, IP-10, RANTES, интерферона и их комбинации.

[0376] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка, экспрессирующая CAR, проявляет повышенную эффекторную активность по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CAR.

[0377] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка, экспрессирующая CAR, проявляет повышенную устойчивость к опосредованному CD47 ингибированию фагоцитоза по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CAR.

[0378] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка, экспрессирующая CAR, проявляет повышенную устойчивость к опосредованному LILRB1 ингибированию фагоцитоза по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CAR.

[0379] В некоторых вариантах осуществления изобретения внеклеточный домен содержит Ig-связывающий домен.

Миелоидные клетки для терапии инфекционных заболеваний

[0380] В одном аспекте описанные здесь миелоидные клетки используют для разработки терапевтически эффективных клеток для лечения инфекционных заболеваний. Миелоидные клетки могут быть мощным инструментом в лечении инфекций, таких как бактериальные инфекции, вирусные инфекции, грибковые инфекции, некоторые протозойные инфекции. В одном варианте осуществления изобретения на выделенную, как описано в изобретении, миелоидную клетку дополнительно воздействуют или модифицируют ее для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), который содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, способный связываться с антигеном на патогенных бактериях, и внутриклеточный домен, который запускает и/или усиливает фагоцитоз и/или активирует инфламмосомный компонент в миелоидной клетке.

[0381] В некоторых вариантах осуществления изобретения CAR может содержать внеклеточный связывающий домен, специфичный к бактериальному поверхностному антигену, такому как липоарабиноманнан (LAM), который может быть полезен для фагоцитоза *Mycobacterium tuberculosis*. Миелоидные клетки, которые эффективно фагоцитируют патоген, такой как *M.tuberculosis*, также могут презентировать антиген лимфоцитам и генерировать долговременный иммунный ответ и иммунную память. CAR может содержать внеклеточный связывающий домен, специфичный к антигену, например, из *S. pneumoniae*, *H. influenzae* или *N. meningitis*, который функционально связан с внутриклеточным сигнальным доменом, который при активации усиливает фагоцитоз миелоидной клеткой.

[0382] В некоторых вариантах осуществления изобретения CAR может содержать связывающий домен, направленный против вируса, нацеленного на вирусный антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирусный антиген представляет собой антиген гриппа, такой как антиген НА (гемагглютинин) (например, H1, H2, H3, H5), антиген нейраминидазы (например, N1, N2, N3 и т. д.) или антиген матричного белка (M1), белок ионного канала (M2). Миелоидная клетка, экспрессирующая CAR, направленный против иллюстративного антигена, как описано в настоящем документе, может применяться в качестве вакцины против гриппа на основе миелоидных клеток.

[0383] В некоторых вариантах осуществления изобретения CAR может содержать связывающий домен, направленный против белка HBV, и миелоидная клетка, экспрессирующая CAR, может быть полезна при разработке вакцины против HBV на основе миелоидных клеток. Примеры HBV антигенов включают, но не ограничиваются М-

HbsAg, S-HBsAg и L-HBsAg. В некоторых вариантах осуществления изобретения CAR может содержать связывающий домен, направленный против капсидного белка HPV16 или HPV 18.

[0384] В одном из вариантов осуществления изобретения сильный Т-клеточный ответ может быть получен против коронавируса, включая, помимо прочего, новый коронавирус-19 или 2019-nCoV-2, который вызывает пандемию COVID. В настоящем документе предлагается миелоидная клетка, экспрессирующая коронавирусный антиген, такой как антиген белка S, антиген белка NSP, антиген белка E, антиген белка M, антиген белка N или антиген NSP, где коронавирусный антиген кодируется рекомбинантной нуклеиновой кислотой. Также в настоящем документе предлагается миелоидная клетка, экспрессирующая CAR, который направлен на антиген nCoV-2, такой как антиген белка S, антиген белка NSP, антиген белка E, антиген белка M, антиген белка N или антиген NSP.

[0385] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапия миелоидными клетками, экспрессирующими CAR, направленный против патогена, может помочь организовать сильный В-клеточный ответ у хозяина, одновременно снижая исходную патогенную нагрузку за счет фагоцитоза и элиминации.

[0386] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапия миелоидными клетками, экспрессирующими CAR, направленный против патогена, может помочь организовать сильный Т-клеточный ответ у хозяина, одновременно снижая исходную патогенную нагрузку за счет фагоцитоза и элиминации.

[0387] В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем документе предложена миелоидная клетка, которая презентует на своей поверхности антигены для активации Т-клеток *in vivo* или *ex-vivo*. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка содержит, презентует или экспрессирует экзогенный или рекомбинантный патогенный антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка содержит, презентует или экспрессирует экзогенный или рекомбинантный вирусный антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка содержит, презентует или экспрессирует экзогенный или рекомбинантный бактериальный антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка содержит, презентует или экспрессирует экзогенный или рекомбинантный опухолевый антиген.

[0388] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка терапевтически эффективна для вакцинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка нагружена одним или несколькими специфическими антигенами. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка

представляет собой клетку-предшественник, как описано в описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CD14+ клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CD16- клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CD14+/CD16- клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CCR2+ клетку.

[0389] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка содержит, презентует или экспрессирует один или несколько экзогенных или рекомбинантных вирусных антигенов.

[0390] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка содержит, презентует или экспрессирует экзогенный или рекомбинантный антиген гриппа, такой как антиген HA, антиген NA, антиген M1, антиген M2, антиген NP, антиген PB1, антиген PB2, антиген PA или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка, экспрессирующая антиген гриппа, представляет собой клетку-предшественник, как описано в описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CD14+ клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CD16- клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CD14+/CD16- клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CCR2+ клетку.

[0391] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка содержит, презентует или экспрессирует экзогенный или рекомбинантный антиген 2019-nCoV2. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная миелоидная клетка нагружена одним или несколькими антигенами, специфичными для 2019-COV2. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная миелоидная клетка, содержащая, презентующая или экспрессирующая антиген 2019-nCoV2, представляет собой миелоидную клетку-предшественник, как раскрыто в описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная миелоидная клетка представляет собой CD14+ клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CD16- клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CD14+/CD16 клетку -. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка представляет собой CCR2+ клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная миелоидная клетка для вакцинации против коронавируса содержит, презентует или экспрессирует экзогенный или рекомбинантный

антиген белка репликазы, антиген белка S, антиген белка NSP, антиген белка E, антиген белка M, антиген белка N или их комбинацию.

[0392] В одном из вариантов осуществления изобретения сильный Т-клеточный ответ может быть получен против коронавируса, включая, помимо прочего, новый коронавирус-19 или 2019-nCoV-2, который вызывает пандемию COVID. В настоящем документе предложена миелоидная клетка, экспрессирующая CAR, который направлен на антиген nCoV-2 (взаимозаменяемо называемый SARS-CoV-2), такой как антиген белка S, антиген белка NSP, антиген белка E, антиген белка M, антиген белка N или антиген NSP.

[0393] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, кодирующий один или несколько антигенов, вводят в миелоидную клетку, описанную в настоящем документе, например, в CD14+/CD16- миелоидную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный антиген или антигены подвергаются эндосомальному процессингу в миелоидной клетке, например, в миелоидной клетке, экспрессирующей CD14+ и представляющей собой CD16-клетку.

[0394] В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем документе предложена композиция, на основе которой может быть разработана вакцина, где иллюстративная вакцинная композиция может содержать клетку, содержащую рекомбинантную нуклеиновую кислоту.

[0395] В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая слитый белок, содержит 5'-конец, кэпированный 7-метил-ГТФ. В некоторых вариантах осуществления изобретения около 70% модифицированной РНК содержит 7-метил-ГТФ кэп. В некоторых вариантах осуществления изобретения около 80% модифицированной РНК содержит 7-метил-ГТФ кэп. В некоторых вариантах осуществления изобретения около 90% модифицированной РНК содержит 7-метил-ГТФ кэп. В некоторых вариантах осуществления изобретения более 90% модифицированной РНК содержит 7-метил-ГТФ кэп. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая слитый белок, содержит 3'-поли-А-хвост. В некоторых вариантах осуществления изобретения поли-А-хвост имеет длину 20-200 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения поли-А-хвост имеет длину 50-100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения поли-А-хвост имеет длину менее, более или около 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения поли-А-хвост имеет длину менее, более или около 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения поли-А-хвост имеет длину менее, более или около 200 нуклеотидов.

[0396] В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая слитый белок, содержит модифицированный нуклеотид или аналог нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая слитый белок, содержит 2'-О-метилованный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления изобретения 2'-О-метилованный нуклеотид является первым нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая слитый белок, содержит 5-метоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая слитый белок, содержит замену одного или нескольких уридиновых нуклеотидов одним или несколькими 5-метоксиуридинами.

[0397] В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрыт улучшенный иммуногенный агент, который может быть использован для активации миелоидной клетки, так, что миелоидная клетка, в свою очередь, может активировать различные типы лимфоцитов, включая CD8⁺ Т-клетки, CD4⁺ Т-клетки и В-клетки.

[0398] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген экспрессируется в миелоидной клетке, причем миелоидная клетка представляет собой CD14⁺/CD16⁺-миелоидную клетку. Антиген может быть рекомбинантным антигеном. Антиген может быть сконструирован таким образом, что он нацелен на путь процессинга МНС. Антиген может быть сконструирован таким образом, что он нацелен на секреторный путь. Антиген может быть сконструирован таким образом, что он нацелен как на путь процессинга МНС, так и на секреторный путь. Примером рекомбинантной нуклеиновой кислоты, подходящей для кодирования такой антигенной конструкции, может быть конструкция, кодирующая слитый белок; в которой антигенный пептид слит с пептидом, облегчающим котрансляционную доставку в эндосомальный компартмент для процессинга и презентации антигена. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндосомальная нацеливающая последовательность может представлять собой нацеливающую последовательность, полученную из белка LAMP, такого как LAMP1 или LAMP2.

[0399] Иллюстративная последовательность LAMP1 представляет собой LIPIAVGGALAGLV LIVLIAYLVGRKRSHAGYQTI (SEQ ID NO: 54). Пептидная последовательность может быть слита с С-концом последовательности антигена.

[0400] В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкция может содержать последовательность, кодирующую антиген, содержащую сигнальную последовательность или лидерную последовательность, которая предназначена для секреции. Такая последовательность представляет собой секреторную сигнальную последовательность. Секретируемые белки содержат лидерную или сигнальную последовательность длиной около 8-20 аминокислот, обычно на N-конце. Примерами секретируемых белков являются

цитокины, факторы роста, хемокины, альбумин и т.д. Такая последовательность может быть использована для замены нативной сигнальной последовательности антигена. В других вариантах осуществления изобретения сигнальная последовательность может быть добавлена к N-концу последовательности антигена. Примером секреторной сигнальной пептидной последовательности является сигнальная последовательность человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF): MWLQSLLLLGTVACISIS (SEQ ID NO: 7). Другим примером секреторной сигнальной последовательностью является сигнальная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина человека: MDWTWRVFCLLAVTPGANP (SEQ ID NO: 57) или сигнальная последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека: MAWSPLFLTLLTHCAGSWA (SEQ ID NO: 58). Еще одним примером секреторной сигнальной последовательности является сигнальная последовательность человеческого сывороточного альбумина: MKWVTFISLLFLFSSAYS (SEQ ID NO: 59). Еще одним примером секреторной сигнальной последовательности является сигнальная последовательность человеческого азуроцидина: MTRLTVLALLAGLASSRA (SEQ ID NO: 60). Примером секреторного сигнального пептида, который можно использовать для промотирования секреции, является человеческий цистатин: MARPLCTLLLLMATLAGALA (SEQ ID NO: 61). Любой антиген можно модифицировать для высвобождения из клетки, так, чтобы он активировал CD4+ T-клетки и B-клетки.

[0401] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует более одного антигена, разделенного ауторасщепляемой последовательностью, такой как последовательность T2A. Иллюстративная рекомбинантная конструкция представляет собой слитую конструкцию, содержащую копию антигена, слитую с эндосомальной нацеливающей белковой последовательностью, такой как последовательность белка LAMP1, и другую копию, содержащую секреторный сигнал, где две копии разделены расщепляемой последовательностью, такой как последовательность T2A.

[0402] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота может кодировать один или несколько антигенов, которые могут быть слиты с эндосомальной нацеливающей последовательностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота может кодировать один или несколько антигенов, содержащих по меньшей мере одну секреторную последовательность.

[0403] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует первый антиген, слитый с эндосомальной нацеливающей

последовательностью, и второй антиген, содержащий секреторную последовательность. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый антиген и второй антиген кодируются одним и тем же геном.

[0404] В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая один или несколько антигенов, имеет длину 100-10000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая один или несколько антигенов, имеет длину 1000-5000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая один или несколько антигенов, имеет длину 500-2000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая один или несколько антигенов, имеет длину 500-8000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая один или несколько антигенов, имеет длину менее, более или около 3000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая один или несколько антигенов, имеет длину менее, более или около 4000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая один или несколько антигенов, имеет длину менее, более или около 5000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая один или несколько антигенов, имеет длину менее, более или около 6000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая один или несколько антигенов, имеет длину менее, более или около 7000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая один или несколько антигенов, имеет длину менее, более или около 8000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая один или несколько антигенов, имеет длину менее, более или около 9000 нуклеотидов.

[0405] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК, кодирующую слитый белок, содержащий один или несколько Т-клеточных эпитопов спайка (S) SARS-CoV-2 и/или один или несколько Т-клеточных эпитопов нуклеокапсидного белка (NP) SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая слитый белок, содержит один или несколько Т-клеточных эпитопов спайка (S) SARS-CoV-2 и/или один или несколько Т-клеточных эпитопов нуклеокапсидного белка (NP) SARS-CoV-2, слитых с меткой, которая может представлять собой лизосомальную нацеливающую группу.

[0406] Иллюстративный Т-клеточный эпитоп SARS-CoV-2, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, может представлять собой пептид, имеющий последовательность: MRALWVLGLCCVLLTFGSVRA (SEQ ID NO: 50).

[0407] В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота, такая как мРНК или плаزمид, кодирует один или несколько Т-клеточных эпитопов SARS-CoV-2, приведенных в **SEQ ID NO: 51**:

VASQSIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTE
CSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPD
PSKPSKRSFIEDLLFNKVTLDAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDE
MIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQF
NSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDPPE
AEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGY
HLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVVFVSNGTHWFVT
QRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVD
LGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQ (**SEQ ID NO: 51**).

[0408] В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота, такая как мРНК или плазмид, кодирующая один или несколько Т-клеточных эпитопов SARS-CoV-2, кодирует пептид, имеющий последовательность, представленную в **SEQ ID NO: 52**: ISAMVRS (**SEQ ID NO: 52**).

[0409] В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота, такая как мРНК или плазмид, кодирует один или несколько Т-клеточных эпитопов SARS-CoV-2, представленных в **SEQ ID NO: 53**:

AGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGQQQQGQTVTKKSAAEASKKPRQKRTATKA
YNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTP
SGTWLTYTAAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPTEPKKDKKKKADETQALPQR
QKKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA (**SEQ ID NO: 53**).

[0410] В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота, такая как мРНК или плазмид, кодирующая один или несколько Т-клеточных эпитопов SARS-CoV-2, кодирует пептид, имеющий последовательность, представленную в **SEQ ID NO: 54**: LIPIAVGGALAGLVLIYLVGRKRSHAGYQTI (**SEQ ID NO: 54**).

[0411] В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота, такая как мРНК или плазмид, кодирующая один или несколько антигенов SARS-CoV-2, содержит последовательность **SEQ ID NO: 55**:

ATGAGGGCCCTGTGGGTGCTGGGCCTCTGCTGCGTCCTGCTGACCTTCGGGgacGTacgt
GCT (**SEQ ID NO: 55**).

[0412] В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота, такая как мРНК или плазмид, кодирующая один или несколько антигенов SARS-CoV-2, может содержать последовательность **SEQ ID NO: 56**:

GTAGCTAGCCAGAGCATCATCGCCTACACCATGAGCCTGGGCGCAGAGAACAGCGT
GGCCTATTCCAACAACCTCTATCGCCATTCCCACCAACTTTACAATTAGCGTCACAAC
AGAGATCCTGCCCCGTGAGCATGACCAAGACCAGCGTGGACTGTACAATGTACATCT
GTGGCGACAGCACTGAATGCAGCAACCTGCTGCTGCAATACGGCTCCTTTTGCACCC
AACTGAACCGGGCGCTGACCGGAATCGCCGTGGAACAGGACAAAAATACCCAGGA
GGTGTTCGCCCCAAGTGAAGCAGATCTACAAGACCCACCTATCAAGGACTTCGGCG
GCTTTAACTTTAGCCAGATTCTCCCTGATCCTTCTAAGCCTAGCAAGCGGAGCTTTAT
CGAGGATCTGCTGTTCAACAAGGTCACCCTGGCCGATGCCGGCTTTATCAAACAGTA
TGGCGATTGCCTGGGCGACATAGCCGCCAGAGATCTGATCTGCGCCCAGAAATTCA
ACGGCCTGACAGTTCTCCACCTCTGCTGACCGACGAGATGATCGCTCAGTACACCT
CTGCCCTGCTGGCTGGCACCATCACATCTGGGTGGACATTTGGCGCCGGCGCCGCCC
TGCAGATCCCCTTTGCCATGCAGATGGCCTATAGATTCAACGGAATCGGCGTGACCC
AGAACGTGCTGTATGAAAACCAGAAGCTGATCGCTAACCAGTTCAATTCTGCCATCG
GCAAGATCCAGGACTCCCTCTCCTCTACCGCCAGCGCCCTGGGCAAACCTGCAGGAC
GTGGTGAATCAGAACGCCCAAGCCCTGAACACCCTGGTGAAGCAGCTCAGCAGCAA
TTTTGGCGCCATCAGCTCTGTGCTGAACGATATCCTGTCTAGACTGGACCCTCCAGA
AGCCGAAGTCCAGATCGATAGACTGATCACAGGCAGACTGCAGTCCCTGCAAACCT
ACGTGACCCAACAGCTGATCAGGGCCGCTGAAATAAGAGCCAGCGCCAATCTCGCC
GCTACCAAGATGTCCGAGTGTGTGCTGGGACAGTCTAAACGCGTTGACTTCTGCGGC
AAAGGCTATCACCTGATGAGCTTCCCCCAGAGCGCGCCGCACGGCGTGGTGTTCCTG
CATGTGACATACGTGCCTGCCCAAGAGAAGAATTTACAACCGCCCCTGCCATCTGC
CACGACGGCAAGGCCCACTTCCCAAGAGAGGGCGTTTTTCGTTTCCAATGGCACACA
CTGGTTCGTGACACAAAGAACTTCTACGAACCCCAGATTATCACCACCGACAACA
CCTTCGTGAGTGGCAATTGTGACGTGGTCATCGGAATCGTGAACAACACAGTGTACG
ACCCTCTGCAACCTGAGCTGGACTCTTTTAAGGAAGAGCTGGACAAGTACTTTAAAA
ACCACACCAGCCCCGATGTGGACCTGGGCGACATCAGTGGCATTAAACGCCAGCGTG
GTGAACATCCAAAAGGAAATCGACAGACTGAACGAGGTGGCCAAGAACCTGAACG
AGTCCCTGATCGACCTGCAGGAGCTCGGCAAATACGAGCAG (SEQ ID NO: 56).

Способ получения терапевтически эффективных миелоидных клеток

Выделение и/или обогащение миелоидных клеток

[0413] Миелоидные клетки могут быть выделены из периферической крови человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки могут быть выделены у субъекта посредством прямого забора периферической крови. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки могут быть выделены из

образцов, полученных в результате лейкофереза, доступных в контейнерах. В некоторых вариантах осуществления изобретения в качестве источника миелоидных клеток используют периферическую кровь здоровых доноров. В некоторых вариантах осуществления изобретения РВМС выделяют из образца крови здорового донора.

[0414] В некоторых вариантах осуществления изобретения РВМС выделяют в асептической закрытой системе.

[0415] В некоторых вариантах осуществления изобретения РВМС могут быть приведены в контакт с антителом, которое связывается с молекулой клеточной поверхности на моноците или клетке-предшественнике моноцита, и для выделения представляющей интерес клетки используется антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки РВМС приводят в контакт с гранулами, покрытыми антителами, которые связываются со специфическими клетками в РВМС, т.е., клетками, которые экспрессируют специфические маркеры клеточной поверхности, с которыми связываются антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген может быть иммобилизован, например, прикреплен к поверхности контейнера или колонки, или может быть прикреплен к грануле, которая при пропускании суспензии клеток РВМС захватывает клетку, экспрессирующую молекулу клеточной поверхности, с которой связывается антитело. Этот метод называется методом положительной селекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения РВМС приводят в контакт с анти-CD14-антителом или покрытыми анти-CD14-антителом гранулами. В некоторых вариантах осуществления изобретения для положительной селекции используют одно или несколько из следующих антител, которые могут связываться с одним или несколькими поверхностными маркерами, которые экспрессируются на представляющей интерес миелоидной клетке, как описано в настоящем документе, такие маркеры могут быть выбраны, но не ограничиваются перечнем, состоящим из: CD64, CD192 (CCR2), CD195 (CCR5), CD120a (TNFR1) и CD120b (TNFR2). В некоторых вариантах осуществления изобретения любые антитела, используемые в настоящем документе, могут представлять собой полноразмерные антитела или их функциональные фрагменты, Fab', рекомбинантные антитела, антитела, полученные генно-инженерными методами, scFv, диатела, триатела или другие полученные генно-инженерными методами связывающие молекулы. В некоторых вариантах осуществления изобретения могут быть получены антитела, которые не активируют при связывании одну или более молекул клеточной поверхности и/или не приводят к тонической передаче сигнала в миелоидной клетке.

[0416] Клетки, связанные с покрытыми антителами гранулами, могут быть разделены посредством центрифугирования в градиенте плотности; магнитной сепарацией (когда

гранулы представляют собой магнитные шарики); или любым другим подходящим способом, например, с использованием гранул, предварительно иммобилизованных на поверхности, и пропуская РВМС над слоем иммобилизованных гранул в качестве подвижной фазы. После отделения несвязавшихся клеток от клеток, связанных с гранулами, и промывания подходящим буфером клетки элюируют с гранул подходящим способом, например, путем расщепления комплекса лиганд-антитело с использованием подходящего буфера, или с использованием пептидазы, или любых других подходящих ферментов или соединений, которые расщепляют связь между клеткой и покрытой антителом гранулой. Клетки извлекают для дальнейшего анализа.

[0417] В некоторых вариантах осуществления изобретения РВМС могут быть приведены в контакт с антителом, которое связывается с молекулой клеточной поверхности, экспрессируемой на клетке, которая не является моноцитом или клеткой-предшественником моноцита, и антитело используется для удаления нежелательных клеток из РВМС и выделения оставшихся, представляющих интерес клеток. Это метод негативной селекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот метод может быть предпочтительным, например, с учетом того факта, что моноциты могут активироваться при контакте с молекулой, связывающейся с клеточной поверхностью, такой как антитело. Преждевременной активации можно избежать с помощью негативной селекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения негативная селекция в контексте настоящего изобретения может быть достигнута удалением одного или нескольких лимфоцитов, NK-клеток, дендритных клеток, зрелых макрофагов и/или истощенных фагоцитов. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает селективное истощение одного или нескольких лимфоцитов, NK-клеток, дендритных клеток, зрелых макрофагов и/или истощенных фагоцитов из любого биологического образца, так что оставшиеся клетки, которые в конечном итоге собирают, представляют собой моноциты или клетки-предшественники моноцитов, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения одно или несколько антител, подходящих для удаления перечисленных выше клеток, могут включать, но не ограничиваются следующими: антитело к CD3, антитело к CD16, антитело к CD19, антитело к CD56. В некоторых вариантах осуществления изобретения, проводят негативную селекцию, например, для получения представляющих интерес клеток, путем приведения РВМС в контакт с гранулами, покрытыми анти-CD3-антителами. В некоторых вариантах осуществления изобретения проводят негативную селекцию, например, для получения представляющих интерес клеток путем приведения РВМС в контакт с гранулами, покрытыми анти-CD16 антителами. В некоторых вариантах осуществления

изобретения используют анти-CD19-антитело, например, используют покрытые анти-CD19-антителами гранулы. В некоторых вариантах осуществления изобретения для негативной селекции может быть использовано анти-CD56 антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения для негативной селекции может быть использовано анти-TNFR2 антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения может быть использовано любое одно или любое количество комбинаций антител из выборки, включающей CD3-связывающее антитело, CD8-связывающее антитело, CD16-связывающее антитело, CD19-связывающее антитело, CD56-связывающее антитело, CX3CR1 (фракталкин)-связывающее антитело и TNFR2-связывающее антитело.

[0418] Одним из важнейших вопросов является необходимость наличия градиента плотности для получения PBMC, поскольку градиенты плотности малодоступны для целей GMP и/или не могут быть легко получены в закрытой системе. В то время как методы, основанные на адгезии на пластике относительно дешевы, другие подходы, такие как положительная селекция посредством анти-huCD14-микрогранул или негативная селекция, могут быть нерентабельными. Кроме того, при положительной селекции возникают дополнительные проблемы, касающиеся использования ксеногенных антител. В некоторых вариантах осуществления изобретения моноциты выделяют нетронутыми, чтобы избежать преждевременной активации клеток. Этот процесс может быть негативной селекцией и может осуществляться путем элютриации.

[0419] Элютриацию моноцитов можно проводить с помощью Elutrak, что позволяет осуществить быстрое и недорогое выделение или обогащение нетронутых моноцитов в больших количествах внутри закрытой системы. Обогащение моноцитов периферической крови может быть осуществлено прямо из иммобилизованных продуктов афереза с помощью сепаратора клеток (Elutrak, Gambro BCT, Лейквуд, Колорадо, США) и одноразовых, функционально герметичных одноразовых наборов, содержащих 40-мл камеру для элютриации. Разделение клеток происходит по скорости седиментации, которая зависит от размера клетки и/или плотности. Продукт лейкоафереза может быть загружен в камеру для элютриации с помощью клеточного насоса и подвергнут центрифугированию при скорости 2400 об/мин. После этого скорость центрифуги может поддерживаться постоянной, а поток элютриационной среды (PBS; Bio Whittaker, Walkersville, USA, дополненный 1% человеческим сывороточным альбумином; Aventis-Behring, Marburg, Germany), находящийся в двух 3-литровых контейнерах для сбора (T3006, Cell-Max GmbH, Мюнхен, Германия), можно поэтапно увеличивать, чтобы обеспечить элютриацию специфических клеточных фракций в предварительно прикрепленные контейнеры для сбора.

[0420] В некоторых вариантах осуществления изобретения требуется от 10^8 до примерно 10^{12} РВМС, из которых выделяют (обогащают) представляющие интерес клетки. В некоторых вариантах осуществления интересующие клетки представляют собой CD14+ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения представляющие интерес клетки - это CD14+/CD16- клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения представляющие интерес клетки - это CD14+/CD16- клетки, которые могут экспрессировать высокие уровни белка клеточной поверхности, отличного от CD14 или CD16. В некоторых вариантах осуществления изобретения представляющие интерес клетки могут экспрессировать высокие уровни CCR2. В некоторых вариантах осуществления изобретения общее количество клеток до выделения или обогащения представляющих интерес клеток может составлять примерно 10^8 , 5×10^8 , 10^9 , 5×10^9 , 10^{10} , 5×10^{10} , 10^{11} , 5×10^{11} , 10^{12} , 5×10^{12} клеток или больше. В некоторых вариантах осуществления изобретения общее количество РВМС до выделения или обогащения представляющих интерес клеток может составлять от по меньшей мере 10^9 до примерно 10^{12} клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения общее количество клеток до выделения или обогащения представляющих интерес клеток может составлять около 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 или 10^{10} клеток; около 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} клеток или 10^{11} клеток; около 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} или 10^{12} клеток; около 5×10^{12} или более.

[0421] В некоторых вариантах осуществления изобретения представляющие интерес клетки, которые восстанавливают после процедуры выделения или обогащения, например, с использованием покрытых антителом гранул, как описано выше, могут представлять собой часть от общего числа РВМС, подсчитанных до выделения или обогащения. В некоторых вариантах осуществления изобретения число представляющих интерес клеток после выделения или обогащения может составлять по меньшей мере 10^7 клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения число представляющих интерес клеток после выделения или обогащения может составлять по меньшей мере 10^8 клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения число представляющих интерес клеток после выделения или обогащения может составлять по меньшей мере 10^9 клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения число представляющих интерес клеток после выделения или обогащения может составлять по меньшей мере 10^{10} клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения число представляющих интерес клеток после выделения или обогащения может составлять приблизительно 2×10^7 клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения число представляющих интерес клеток после выделения или обогащения может составлять приблизительно 3×10^7 клеток. В

[illegible]

обогащения может увеличить количество представляющих интерес клеток более чем в 14 раз. В некоторых вариантах осуществления изобретения процесс выделения или обогащения может увеличить количество представляющих интерес клеток более чем в 15 раз. В некоторых вариантах осуществления изобретения процесс выделения или обогащения может увеличить количество представляющих интерес клеток более чем в 20 раз. В некоторых вариантах осуществления изобретения процесс выделения или обогащения может увеличить количество представляющих интерес клеток более чем в 25 раз.

Определение параметров выделенных клеток

[0423] После выделения или обогащения определяют характеристики представляющих интерес клеток. В большинстве случаев аликвоту из выделенных представляющих интерес клеток подвергают дальнейшим анализам для определения природы и функциональных характеристик. Жизнеспособность клеток тестируют с использованием подходящего анализа жизнеспособности. Примеры анализов включают анализ вытеснения трипанового синего, анализ высвобождения LDH (лактатдегидрогеназы) и анализы на NC200. В некоторых вариантах осуществления изобретения используются автоматические счетчики жизнеспособных клеток, такие как NucleoCounter NC 200 (Chemometec), где подсчитываются только жизнеспособные клетки, а общее количество клеток равно общему количеству жизнеспособных клеток.

[0424] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% выделенных клеток могут представлять собой CD14⁺ клетки, как определяют с использованием аликвоты выделенных клеток посредством подходящего анализа, такого, как проточная цитометрия. В некоторых вариантах осуществления изобретения более чем по меньшей мере 60% выделенных клеток могут представлять собой CD14⁺ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения более чем по меньшей мере 70% выделенных клеток могут представлять собой CD14⁺ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения более чем по меньшей мере 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79% или 80% выделенных клеток могут представлять собой CD14⁺ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения более 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90% выделенных клеток могут представлять собой CD14⁺ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения более 91% выделенных клеток могут представлять собой CD14⁺ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения более 92% выделенных клеток могут представлять собой CD14⁺ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения более 93% выделенных клеток могут представлять

[0426] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65% или 70% выделенных или обогащенных клеток могут представлять собой CD14+/CD16- клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 75% выделенных или обогащенных клеток могут представлять собой CD14+/CD16- клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 80% выделенных или обогащенных клеток могут представлять собой CD14+/CD16- клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 85% выделенных или обогащенных клеток могут представлять собой CD14+/CD16- клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 90% выделенных или обогащенных клеток могут представлять собой CD14+/CD16- клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 95% выделенных или обогащенных клеток могут представлять собой CD14+/CD16- клетки.

[0427] Выделенные или обогащенные клетки могут содержать по меньшей мере менее 5% CD3+ клеток, как определяют с использованием аликвоты выделенных клеток посредством проточной цитометрии. Выделенные клетки могут содержать по меньшей мере менее 4% клеток CD3+ клеток. Выделенные клетки могут содержать по меньшей мере менее 3% клеток CD3+ клеток. Выделенные клетки могут содержать по меньшей мере менее 2% клеток CD3+ клеток. Выделенные клетки могут содержать по меньшей мере менее 5% CD19+ клеток, как определяли с использованием аликвоты выделенных клеток посредством проточной цитометрии. Выделенные клетки могут содержать по меньшей мере менее 4% CD19+ клеток. Выделенные клетки могут содержать по меньшей мере менее 4% CD3+ клеток. Выделенные клетки могут содержать по меньшей мере менее 3% CD19+ клеток. Выделенные клетки могут содержать по меньшей мере менее 2% CD19+ клеток. По меньшей мере 5% выделенных клеток могут представлять собой CD56-клетки, как определяли с использованием аликвоты выделенных клеток посредством проточной цитометрии. По меньшей мере 4% выделенных клеток могут представлять собой CD56-клетки. По меньшей мере 3% выделенных клеток могут представлять собой CD56-клетки. По меньшей мере 2% выделенных клеток могут представлять собой CD56-клетки.

[0428] В некоторых вариантах осуществления изобретения менее 10% клеток в популяции клеток представляют собой дендритные клетки. Например, популяция клеток может содержать менее 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% дендритных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CCR2+ клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CCR2+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в

популяции клеток представляют собой CCR5+ клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CCR5+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD11b+ клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD11b+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD63+ клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD63+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD16- клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD16- клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD56- клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD56- клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD3- клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD3-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD19- клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD19-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD42b- клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD42b-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее 40% клеток в популяции клеток представляют собой клетки-макрофаги. Например, популяция клеток может содержать менее 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% или менее клеток макрофагов.

[0429] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 25% клеток в популяции клеток представляют собой CD14+/CD16-/CD3- клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD14+/CD16-/CD3- клеток.

[0430] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 25% клеток в популяции клеток представляют собой CD14+/CD16- клетки. Например, популяция клеток

может содержать по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD14+/CD16- клеток.

[0431] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 25% клеток в популяции клеток представляют собой CD3-/CD19-/CD42b-/CD56- клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD3-/CD19-/CD42b-/CD56- клеток.

[0432] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 25% клеток в популяции клеток представляют собой CD14+/CD16-/CD11b+ клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD14+/CD16-/CD11b+ клеток.

[0433] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 25% клеток в популяции клеток представляют собой CD14+/CD16-/CD11b+/CD3-/CD19-/CD42b- клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD14+/CD16-/CD11b+/CD3-/CD19-/CD42b- клеток.

[0434] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 25% клеток в популяции клеток представляют собой CD14+/CD16-/CD11b+/CD3-/CD19-/CD56- клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD14+/CD16-/CD11b+/CD3-/CD19-/CD56- клеток.

[0435] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 25% клеток в популяции клеток представляют собой CD14+/CD16-/CD11b+/CD3-/CD42b-/CD56- клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD14+/CD16-/CD11b+/CD3-/CD42b-/CD56- клеток.

[0436] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 25% клеток в популяции клеток представляют собой CD14+/CD16-/CD11b+/CD19-/CD42b-/CD56- клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD14+/CD16-/CD11b+/CD19-/CD42b-/CD56- клеток.

[0437] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 25% клеток в популяции клеток представляют собой CD14+/CD16-/CD3-/CD19-/CD42b-/CD56- клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD14+/CD16-/CD3-/CD19-/CD42b-/CD56- клеток.

[0438] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 25% клеток в популяции клеток представляют собой CD14+/CD11b+/CD3-/CD19-/CD42b-/CD56- клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD14+/CD11b+/CD3-/CD19-/CD42b-/CD56- клеток.

[0439] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 25% клеток в популяции клеток представляют собой CD16-/CD11b+/CD3-/CD19-/CD42b-/CD56- клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD16-/CD11b+/CD3-/CD19-/CD42b-/CD56- клеток.

[0440] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 25% клеток в популяции клеток представляют собой CD14+/CD16-/CD11b+/CD3-/CD19-/CD42b-/CD56- клетки. Например, популяция клеток может содержать по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более CD14+/CD16-/CD11b+/CD3-/CD19-/CD42b-/CD56- клеток.

[0441] После выделения или обогащения клетки могут быть дополнительно охарактеризованы с помощью функциональных анализов, таких как анализ фагоцитоза или анализ хемотаксиса. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, обладающие указанными выше характеристиками, далее используют для получения терапевтически эффективных миелоидных клеток. После выделения или обогащения клетки могут быть заморожены или использованы для следующих этапов получения фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидную клетку до введения нуждающемуся в этом субъекту не трансформируют или не активируют.

[0442] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция CD14+/CD16- клеток может быть выделена посредством негативной селекции из биологического образца, например, образца периферической крови, например, из образца, полученного путем лейкофереза, а затем подвергнута определенному воздействию (например, генно-инженерному) *in vitro* (т.е., *ex vivo*) для инкорпорации нуклеиновой кислоты, кодирующей один или несколько рекомбинантных белков, таких как белок CFP. В некоторых вариантах осуществления изобретения конструирование миелоидной клетки включает введение экзогенной нуклеиновой кислоты посредством трансфекции или электропорации или нуклеофекции экзогенной нуклеиновой кислоты, например, рекомбинантной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение нуклеиновой кислоты осуществляют при помощи электропорации. Введение нуклеиновой кислоты

приводит к получению рекомбинантной клетки, которая экспрессирует рекомбинантный белок, например CFP. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяцию CD14+/CD16-клеток, экспрессирующих рекомбинантный белок, культивируют в течение 2-20 часов для стабилизации клетки *in vitro* и для восстановления после введения чужеродной нуклеиновой кислоты в клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяцию клеток выделяют описанным здесь способом для получения CD14+/CD16-клеток из периферической крови, например, PBMC, и подвергают электропорации в течение 1-10 часов. В некоторых вариантах осуществления изобретения аликвоты, взятые из выделенной популяции, тестируют на жизнеспособность и экспрессию молекул клеточной поверхности, такую как экспрессия CD14, экспрессия CD16, экспрессия CD11b, экспрессия CD3, экспрессия CD19, экспрессия CD56, экспрессия CD42b, экспрессия CD63, экспрессия CCR2, экспрессия CCR5 и/или экспрессия CXCR1. В некоторых вариантах осуществления изобретения клеточную популяцию подвергают электропорации в течение 1 часа после выделения или обогащения. В некоторых вариантах осуществления изобретения клеточную популяцию подвергают электропорации в течение 2 часов, в течение 1-3 часов, в течение 2-4 часов, в течение 1-5 часов, 3-6 часов, менее 6 часов, менее 8 часов или менее 10 часов с момента выделения или обогащения. В некоторых вариантах осуществления изобретения электропорированную клеточную популяцию можно культивировать *in vitro* в течение не более чем 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 часов до (i) введения субъекту, или (ii) замораживания для последующего использования. В некоторых вариантах осуществления изобретения электропорированную клеточную популяцию можно культивировать *in vitro* в течение менее 12 часов перед (i) введением субъекту, или (ii) замораживанием для последующего использования. В некоторых вариантах осуществления изобретения электропорированную клеточную популяцию можно культивировать *in vitro* в течение менее 18 часов перед (i) введением субъекту, или (ii) замораживанием для последующего использования. В некоторых вариантах осуществления изобретения электропорированную клеточную популяцию можно культивировать *in vitro* в течение менее 24 часов перед (i) введением субъекту, или (ii) замораживанием для последующего использования. В некоторых вариантах осуществления изобретения электропорированную клеточную популяцию можно культивировать *in vitro* в течение 0-2 часов перед (i) введением субъекту или (ii) замораживанием для последующего использования. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% клеточной популяции, которая была подвергнута генно-инженерной модификации и культивированию *ex vivo* в соответствии со способом по изобретению, содержат CD14+ и CD16- клетки, которые также экспрессируют CFP. В некоторых вариантах осуществления

изобретения клеточная популяция, которая была подвергнута генно-инженерной модификации и культивированию *ex vivo* в соответствии со способом по изобретению, содержит более 50% клеток, которые представляют собой CD14+ и CD16- клетки, которые также экспрессируют CFP, и эта клеточная популяция содержит менее 10% дендритных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, которые были подвергнуты генно-инженерной модификации и культивированию *ex vivo* в соответствии со способом по изобретению, содержат более 70-90% клеток, не дифференцированных в DC-подобный или макрофагоподобный фенотип, или клетки, которые имеют фенотипы CD16+ или CD14-. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки сохраняют потенциал для дальнейшей дифференциации. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки не поляризованы в фенотипы M1 или M2 и сохраняют способность дифференцироваться при введении *in vivo*.

[0443] В некоторых вариантах осуществления изобретения в миелоиде отсутствует тоническая передача сигналов во время введения субъекту.

[0444] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка имеет низкий уровень фагоцитоза до введения субъекту или до активации *ex vivo* внешним стимулом, таким как цитокин или фактор роста, или в присутствии мишени для фагоцитоза. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка проявляет умеренный фагоцитоз до введения субъекту или до активации *ex vivo* внешним стимулом, таким как цитокин или фактор роста, или в присутствии мишени для фагоцитоза. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка способна реагировать на любой один или несколько из: GMCSF, GCSF, IL-4, IL-1b, IL-6, TNF, CCL2, CCL5, CXCL1 или их комбинации.

[0445] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка демонстрирует усиленный фагоцитоз при активации *ex vivo* внешним стимулом, таким как цитокин или фактор роста, или в присутствии мишени для фагоцитоза. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка проявляет примерно 1,1-кратное, 1,2-кратное, 1,5-кратное, 1,7-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 6-кратное, 7-кратное, 8-кратное, 9-кратное, 10-кратное, 11-кратное, 12-кратное, 13-кратное, 14-кратное, 14-кратное, 17-кратное, 20-кратное или более усиление фагоцитоза при активации *ex vivo* внешним стимулом, таким как цитокин или фактор роста, или в присутствии мишени для фагоцитоза, по сравнению с активированными, терминально дифференцированными миелоидными клетками, такими как зрелые постактивационные макрофаги. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка

способна реагировать на цитокины или хемокины, например любой один или несколько из: GMCSF, GCSF, IL-4, IL-1b, IL-6, TNF, CCL2, CCL5, CXCL1 или их комбинации.

[0446] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка, выделенная из биологического образца, может быть далее дифференцирована в линию клеток M1 или M2. Желательно, чтобы после выделения или обогащения миелоидная клетка сохраняла способность к дальнейшей дифференцировке в клетку M1 после введения *in vivo*.

Модификация миелоидных клеток:

[0447] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки могут быть дополнительно модифицированы или подвергнуты воздействию для получения терапевтически эффективных миелоидных клеток. Выделенные клетки могут быть подвергнуты модификации за счет экспрессии в клетке гена или его фрагмента без изменения ее функциональной пластичности и пластичности процессов развития, потенциала дифференциации и жизнеспособности клетки.

[0448] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки могут быть дополнительно модифицированы или обработаны для получения терапевтически эффективных миелоидных клеток за счет экспрессии в клетке неэндогенного полинуклеотида. Неэндогенный полинуклеотид может кодировать белок или пептид. Альтернативно, неэндогенный полинуклеотид может представлять собой некодирующую последовательность, такую как ингибиторная РНК или морфолино.

[0449] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки могут быть дополнительно модифицированы или подвергнуты воздействию для получения терапевтически эффективных миелоидных клеток посредством стабильного изменения геномной последовательности клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения воздействие на миелоидную клетку осуществляется посредством редактирования генома миелоидной клетки с использованием системы CRISPR-CAS. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько генов могут быть отредактированы для подавления экспрессии гена. В некоторых вариантах осуществления изобретения воздействие на миелоидную клетку осуществляется для удаления гена. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько генов могут быть отредактированы для усиления экспрессии генов. В некоторых вариантах осуществления изобретения генетический материал вводят в миелоидную клетку в форме матричной РНК, где матричная РНК кодирует белок или пептид, таким образом делая миелоидную клетку терапевтически эффективной. В некоторых вариантах осуществления изобретения для введения нуклеиновой кислоты внутрь миелоидной клетки можно использовать «голую»

ДНК или матричную РНК (мРНК). В некоторых вариантах осуществления изобретения ДНК или мРНК, кодирующие химерный антигенный рецептор, вводят в макрофаг при помощи инкапсуляции в липидных наночастицах (LNP). мРНК представляет собой одноцепочечную молекулу и может быть оптимизирована по кодонам. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК может содержать одно или несколько модифицированных или неприродных оснований, таких как 5'-метилцитозин, или псевдоуридин, или метилпсевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления изобретения около 50% уридиновых ('U') остатков мРНК или более могут быть превращены в метил-псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления изобретения длина мРНК может составлять 50-10000 оснований. В одном из аспектов трансген доставляется в виде мРНК. мРНК может содержать более, чем около 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 оснований. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК может иметь длину более 10000 оснований. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК может иметь длину около 11000 оснований. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК может иметь длину около 12000 оснований. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК содержит трансгенную последовательность, которая кодирует слитый белок. ДНК или РНК, инкапсулированная при помощи LNP, может быть использована для трансфекции макрофага или может быть введена субъекту. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК вводят в популяцию эффекторных миелоидных клеток при помощи временной трансфекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ временной трансфекции включает электропорацию мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения временная трансфекция включает химическую трансфекцию. В некоторых вариантах осуществления изобретения для способов, описанных выше, для трансфекции можно использовать 1-5000 мкг/мл мРНК с использованием подходящего протокола. В некоторых вариантах осуществления изобретения для трансфекции можно использовать 1-2000 мкг/мл мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения для трансфекции можно использовать 1-1000 мкг/мл мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения для трансфекции можно использовать 1-1000 мкг/мл мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения для трансфекции можно использовать 1-500 мкг/мл мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения для трансфекции можно использовать 1-250 мкг/мл мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения для трансфекции можно использовать около 500 мкг/мл мРНК или менее. В некоторых вариантах осуществления изобретения для трансфекции можно использовать около 250 мкг/мл мРНК.

или менее. В некоторых вариантах осуществления изобретения используется около 10 мкг/мл мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения используется около 20 мкг/мл мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения используется около 30 мкг/мл мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения используется около 40 мкг/мл мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения используется около 50 мкг/мл мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения используется около 60 мкг/мл мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения используется около 80 мкг/мл мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения используется около 100 мкг/мл мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения используется около 150 мкг/мл мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения используется около 200 мкг/мл мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения используют 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 или около 1000 мкг/мл мРНК. Подходящую плотность клеток для трансфекции выбирают, на основании методики и инструкций производителя прибора и/или реагентов, или согласно сведениям, хорошо известным специалистам в данной области.

[0450] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК. мРНК конструкторы можно разморозить на льду, пипеткой аккуратно добавить к моноцитам и предварительно смешать. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК вводят в клетки электропорацией. После элютирования клетки могут быть объединены, отцентрифугированы и подвергнуты электропорации с мРНК с использованием системы MaxCyte ATX, оптимизированной для указанной цели. В некоторых вариантах осуществления изобретения для каждой конструкции используют оптимизированные: буфер для электропорации, плотность клеток и/или концентрацию мРНК для каждого протокола.

[0451] В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид может быть введен в миелоидную клетку в форме кольцевой РНК (circРНК). В кольцевых РНК (circРНК) 3'- и 5'-концы ковалентно связаны. circРНК может быть доставлена внутрь клетки с помощью LNP.

[0452] В некоторых вариантах осуществления изобретения стабильная интеграция трансгенов в макрофаги и другие фагоцитарные клетки может быть совершена посредством использования транспозазы и мобильных элементов, в частности транспозазы, кодируемой мРНК. В одном варианте осуществления изобретения длинные диспергированные повторы-1 (L1) РНК можно использовать для ретротранспозиции трансгена и стабильной интеграции в макрофаг или фагоцитарную клетку. Ретротранспозон можно использовать для

стабильной интеграции рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок (PFP) фагоцитарного или связывающего рецептора (PR).

[0453] В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидная клетка может быть модифицирована посредством экспрессии трансгена при помощи инкорпорации трансгена в вектор для транзientной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия трансгена временно может регулироваться регулятором извне клетки. Примеры включают систему Tet-on/Tet-off, в которой экспрессия трансгена регулируется за счет присутствия или отсутствия тетрациклина.

[0454] В некоторых вариантах осуществления изобретения для получения терапевтически эффективной клетки миелоидная клетка может быть модифицирована посредством контакта клетки с соединением, которое может быть ингибитором или активатором белка или фермента в миелоидной клетке.

[0455] В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор, может быть введен в выделенную миелоидную клетку, полученную способом, описанным в предыдущем разделе. При этом химерный антигенный рецептор при экспрессии в миелоидной клетке усиливает функцию врожденного иммунного ответа миелоидной клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия химерного антигенного рецептора может направлять миелоидную клетку к специфической мишени *in vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный антигенный рецептор может повышать фагоцитарный потенциал миелоидной клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный антигенный рецептор повышает иммуногенность миелоидной клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный антигенный рецептор может усиливать внутриклеточную передачу сигналов. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный антигенный рецептор может функционировать совместно с одним или несколькими белками внутри клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный антигенный рецептор может образовывать димеры или мультимеры со вторым рецептором или трансмембранным белком внутри миелоидной клетки, где второй рецептор или трансмембранный белок представляет собой эндогенный белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения в течение короткого времени после размораживания или после введения нуклеиновой кислоты клетки культивируют *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование *ex vivo* проводят в присутствии подходящей среды, которая может содержать регулируемый компонент сыворотки, например, человеческий сывороточный альбумин (HSA). В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование *ex vivo* и модификация может проводиться в среде с низким

содержанием сыворотки. В некоторых вариантах осуществления изобретения сыворотку специально обрабатывают для дезактивации комплемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки можно культивировать *ex vivo*, как описано выше, в присутствии M-CSF. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки можно культивировать *ex vivo*, как описано выше, в присутствии GM-CSF. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки можно культивировать в присутствии одного или нескольких цитокинов. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидные клетки можно культивировать или обрабатывать *ex vivo* в течение определенного периода времени в отсутствие фактора роста или цитокинов. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложенный здесь способ включает выделение или обогащение и модификацию миелоидной клетки в течение менее 72 часов, 70 часов, 65 часов, 60 часов, 55 часов, 50 часов, 45 часов, 40 часов или 35 часов, или 30 часов, или 28 часов, или 26 часов, или 24 часов. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидную клетку можно культивировать в течение менее 24 часов, или менее 20 часов, или менее 16 часов, или менее 14 часов, или менее 12 часов, или менее 10 часов, или менее 8 часов, или менее 6 часов или менее приблизительно 4 часов. После выделения или обогащения и модификации миелоидные клетки можно короткое время культивировать и замораживать до последующего использования. В некоторых вариантах осуществления изобретения миелоидную клетку размораживают один или максимум два раза.

[0456] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически компетентные клетки представляют собой клетки, в которые электропорацией ввели рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, замороженные и размороженные, культура которых стабилизирована в течение менее 24 часов, и при этом клетки в клеточной популяции на момент введения обладают следующими характеристиками: (i) более чем по меньшей мере 70% жизнеспособности, (ii) более чем по меньшей мере 50% CD14⁺ и CD16⁻ клеток; и/или более 50% CD11b⁺/CD14⁺/CD16⁻ клеток; (iii) менее 5% CD3⁺ клеток, менее 5% CD19⁺ клеток, менее примерно 10% CD56⁺ клеток, менее примерно 10% CD42b⁺ клеток; (iv) более 50% клеток экспрессируют полипептид, кодируемый электропорированной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически компетентные клетки представляют собой клетки, культура которых стабилизирована в течение менее 24 часов, в которые электропорацией ввели рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, замороженные и размороженные, и при этом клетки в клеточной популяции на момент введения обладают следующими характеристиками (i) более чем по меньшей мере 70% жизнеспособности; (ii)

более чем по меньшей мере 50% CD14+ и CD16- клеток; и/или более 50% CD11b+/CD14+/CD16- клеток; (iii) менее 5% CD3+ клеток, менее 5% CD19+ клеток, менее примерно 10% CD56+ клеток, менее примерно 10% CD42b+ клеток; (iv) более 50% клеток экспрессируют полипептид, кодируемый электропорированной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически компетентные клетки представляют собой клетки, культура которых была стабилизирована в течение менее 24 часов, в которые электропорацией ввели рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, замороженные и размороженные, и при этом клетки в клеточной популяции на момент введения обладают следующими характеристиками: (i) более чем по меньшей мере 70% жизнеспособности, (ii) более чем по меньшей мере 50% CD14+ и CD16- клеток; и/или более 50% CD11b+/CD14+/CD16- клеток; (iii) менее 5% CD3+ клеток, менее 5% CD19+ клеток, менее примерно 10% CD56+ клеток, менее примерно 10% CD42b+ клеток; (iv) более 50% клеток экспрессируют полипептид, кодируемый электропорированной нуклеиновой кислотой. Клетки должны быть свободными от патогенов. В приведенных выше вариантах осуществления изобретения терапевтически компетентные клетки можно замораживать и размораживать не более двух раз, предпочтительно один раз, и их можно вводить в течение 24 часов после размораживания, в течение 18 часов после размораживания, в течение 8 часов после размораживания или в течение 2 часов после размораживания. Чтобы клетки соответствовали описанным здесь стандартам, перед введением проводят контроль качества клеток.

Фармацевтические композиции

[0457] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток, содержащих рекомбинантную нуклеиновую кислоту, где рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), или последовательность, кодирующую антигенный пептид. Популяция клеток включает эффекторные миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторные миелоидные клетки выделяют из популяции PBMC, выделенных из биологического образца, и обогащают, и фармацевтическая композиция содержит (i) по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток, являющихся CD14+ и CD16- клетками, и (ii) менее 10% клеток в популяции клеток, представляющих собой дендритные клетки; и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0458] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую CFP, где CFP содержит: (a) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, и (b) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом. В некоторых вариантах

осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержит последовательность, кодирующую CFP, где CFP содержит: (а) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, и (b) трансмембранный домен и (с) один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов, все функционально связанные друг с другом, так что, когда внеклеточный домен связывается с антигеном-мишенью, внутриклеточный домен активируется, активирует внутриклеточный сигналинг и активирует миелоидную клетку. Активированная миелоидная клетка проявляет одно или несколько из следующих свойств: более высокую активность фагоцитоза, более высокий хемотаксис, имеет повышенную воспалительную функцию и более высокую степень уничтожения фагоцитированной клетки или организма.

[0459] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция представляет собой терапевтическую композицию для лечения инфекционного заболевания, при этом фармацевтическая композиция содержит популяцию клеток, содержащую CFP, который имеет внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает патогенный антиген или антиген, представленный на инфицированной клетке, например, антиген на бактериях, вирусный антиген, грибковый антиген, антиген простейших и т. д.

[0460] В некоторых вариантах осуществления изобретения другие примеры фармацевтических композиций, описанных здесь с использованием технических подробностей, представляют собой терапевтические композиции против рака, где фармацевтическая композиция содержит популяцию клеток, содержащую CFP, имеющий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с раковым антигеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения раковый антиген представляет собой антиген лимфомы. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит эффекторные миелоидные клетки, которые экспрессируют рекомбинантный CFP, где антигенсвязывающий домен представляет собой CD5-связывающий домен или HER2-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит эффекторные миелоидные клетки, которые экспрессируют рекомбинантный CFP, содержащий CD5- или HER2-антигенсвязывающий домен, и дополнительно содержит внутриклеточный домен, полученный из фагоцитарного рецептора или рецептора-мусорщика. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, как описано выше, экспрессирует CFP, где CFP содержит: (а) внеклеточный домен, содержащий: (i) scFv, который специфически связывается с CD5 или HER2; и (ii) шарнирный домен, полученный из CD8, или CD28 или внеклеточный домен CD68 или его часть; (b) CD8 трансмембранный

домен, CD28 трансмембранный домен или CD68 трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный домен, содержащий по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена, при этом по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена содержат: (i) первый внутриклеточный сигнальный домен, полученный из FcγR или FcεR, и (ii) второй внутриклеточный сигнальный домен, который: (A) содержит домен рекрутирования PI3-киназы (PI3K) или (B) происходит от CD40. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую антигенный пептид, где антигенный пептид представляет собой пептид CMVpp65.

[0461] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективные миелоидные клетки непосредственно включены в фармацевтическую композицию для введения нуждающемуся в этом субъекту. Альтернативно, находящиеся на хранении миелоидные клетки (замороженные) размораживают один раз и проверяют на жизнеспособность, стабилизируют в питательной среде в течение по меньшей мере 1-4 часов, а затем вводят в фармацевтическую композицию. Фармацевтическая композиция содержит миелоидные клетки и по меньшей мере один эксципиент. В некоторых вариантах осуществления изобретения эксципиент содержит стерильный буфер (например, HEPES или PBS) с нейтральным pH. В некоторых вариантах осуществления изобретения pH фармацевтической композиции составляет 7,5. В некоторых вариантах осуществления изобретения pH может варьироваться в пределах приемлемого диапазона. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные клетки могут быть помещены в стерильную обогащенную суспензионную клеточную среду, содержащую деактивированную систему комплемента или синтетическую сыворотку. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит цитокины, хемокины или факторы роста для сохранения и функционирования клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения разовая терапевтическая доза может быть суспендирована в общем объеме от 1 мл до 100 мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения разовая терапевтическая доза может быть суспендирована в общем объеме 1-25 мл, или 1-20 мл, или 1-15 мл, или 1-10 мл, или 1-5 мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения объем суспензии составляет около 1 мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения объем суспензии составляет около 5 мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения объем суспензии составляет около 10 мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит от примерно 10^6 эффекторных миелоидных клеток до примерно 10^{12} эффекторных миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая

композиция содержит от примерно 10^6 эффекторных миелоидных клеток на мл до примерно 10^8 эффекторных миелоидных клеток на мл.

[0462] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция может содержать дополнительные терапевтические средства, которые вводятся одновременно с рекомбинантными эффекторными миелоидными клетками, экспрессирующими CFP.

Способы лечения

[0463] В настоящем документе предложены способы лечения иммунологического заболевания, например, инфекционного заболевания, или рака. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы применимы для лечения бактериального заболевания. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы применимы для лечения вирусного заболевания. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы применимы для лечения иммунологического заболевания.

[0464] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит популяцию клеток, содержащих терапевтически эффективную дозу миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция клеток: после введения субъекту дифференцируется в эффекторные клетки; после введения проникает в пораженный участок субъекта или мигрирует в пораженный участок субъекта; и/или после введения субъекту имеет продолжительность жизни по меньшей мере 5 дней.

[0465] В настоящем документе предложены способы лечения рака у субъекта с использованием фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантные фагоцитарные клетки, в частности макрофаги, экспрессирующие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок (PFP) фагоцитарного рецептора (PR), который специально разработан для нацеливания, атаки и уничтожения раковых клеток. PFP также называют химерным антигенным рецептором для фагоцитоза (CAR-P), и оба эти термина могут использоваться здесь взаимозаменяемо. Рекомбинантные фагоцитарные клетки также обозначаются здесь как CAR-P клетки.

[0466] Рак включает, но не ограничивается следующими видами: Т-клеточная лимфома, кожная лимфома, В-клеточный рак (например, множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема), болезни тяжелых цепей (например, такие как болезнь альфа-цепей, болезнь гамма-цепей и болезнь мю-цепей), доброкачественная моноклональная гаммапатия и иммуноцитарный амилоидоз, меланомы, рак молочной железы, рак легких, рак бронхов, колоректальный рак, рак предстательной железы (например, метастатический, гормонорезистентный рак предстательной железы), рак

поджелудочной железы, рак желудка, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак мозга или рак центральной нервной системы, рак периферической нервной системы, рак пищевода, рак шейки матки, рак матки или эндометрия, рак полости рта или глотки, рак печени, рак почки, рак яичек, рак желчных путей, тонкой кишки или рак аппендикса, рак слюнной железы, рак щитовидной железы, рак надпочечника, остеосаркома, хондросаркома, рак гематологических тканей и т.п. Другие неограничивающие примеры типов рака, применимых к способам, охватываемым настоящим изобретением, включают саркомы и карциномы человека, например, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярную аденокарциному, цистаденокарциному, медуллярный рак, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, рак печени, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак кости, опухоль головного мозга, рак яичка, карциному легкого, мелкоклеточную карциному легкого, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, невриному слухового нерва, олигодендроглиому, менингиому, меланому, нейробластому, ретинобластому; лейкозы, например острый лимфоцитарный лейкоз и острый миелоцитарный лейкоз (миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз); хронический лейкоз (хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфолейкоз); и истинную полицитемию, лимфому (Ходжкинскую и неходжкинскую), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема и болезнь тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак представляет собой эпителиальный рак, такой как рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, гинекологический рак, рак почки, рак гортани, рак легкого, рак ротовой полости, рак головы и шеи, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы или рак кожи, но не ограничиваясь ими. В других вариантах осуществления изобретения рак представляет собой рак молочной железы, рак предстательной железы, рак легкого или рак толстой кишки. В следующих вариантах осуществления изобретения эпителиальный рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого, непапиллярную почечно-клеточную

карциному, карциному шейки матки, карциному яичника (например, серозную карциному яичника) или карциному молочной железы. Эпителиальный рак можно охарактеризовать различными другими способами, включая, помимо прочего, серозный, эндометриоидный, муцинозный, светлоклеточный или недифференцированный. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение используется для лечения, диагностики и/или прогнозирования лимфомы или ее подтипов, включая лимфому из клеток мантийной зоны, но не ограничиваясь ей. К пролиферативным заболеваниям также относят лимфопролиферативные заболевания.

[0467] В целом, клеточная иммунотерапия включает предоставление пациенту лекарственного средства, содержащего живые клетки. В некоторых аспектах пациента или субъекта, страдающего раком, лечат аутологичными клетками, причем способ включает выделение или обогащение полученных из РВМС макрофагов, модификацию макрофагов *ex vivo* путем введения в макрофаги рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор для фагоцитоза, который представляет собой слитый белок фагоцитарного рецептора (PFR), с получением высокофагоцитарных макрофагов, способных к лизису опухоли, и введение модифицированных макрофагов пациенту или субъекту.

[0468] В одном аспекте субъекту вводят одну или несколько доз фармацевтической композиции, содержащей терапевтические фагоцитарные клетки, при этом клетки являются аллогенными. HLA можно подобрать для совместимости с субъектом и так, чтобы клетки не вызывали заболевание «трансплантат против хозяина», GVHD (Graft Versus Host Disease). Субъекту, поступающему в клинику, перед назначением терапии или терапевтического режима проводят HLA-типирование для определения HLA-антигенов, экспрессируемых субъектом.

[0469] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная доза составляет от 10^7 до 10^{12} миелоидных клеток за одну инфузию. Количество клеток может варьироваться в зависимости от возраста, массы тела и других параметров субъекта и может быть определено практикующим врачом. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная доза составляет около 10^7 миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная доза составляет примерно 2×10^7 миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная доза составляет примерно 3×10^7 миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная доза составляет примерно 4×10^7 миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная доза составляет примерно 5×10^7

[illegible]

осуществления изобретения терапевтически эффективная доза составляет примерно 5×10^{10} миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная доза составляет примерно 10^{11} миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная доза составляет примерно 5×10^{11} миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективная доза составляет примерно 10^{12} миелоидных клеток.

Варианты осуществления изобретения

1. Композиция, содержащая популяцию CD14+/CD16- клеток, где популяция CD14+/CD16- клеток представляет собой популяцию рекомбинантных клеток и/или содержит экзогенный агент.
2. Композиция, содержащая популяцию клеток, где популяция клеток представляет собой популяцию рекомбинантных клеток и/или содержит экзогенный агент, при этом популяция клеток представляет собой CD14+ и/или CD16- клетки, и
 - (a) популяция клеток экспрессирует CCR2, и/или CCR5, и/или CD11b; и/или
 - (b) популяция клеток представляет собой CD63+ клетки; и/или
 - (c) популяция клеток представляет собой CD56-, CD3- и/или CD19- клетки; и/или
 - (d) популяция миелоидных клеток содержит менее 40% макрофагов, и/или менее 10% дендритных клеток (DC), и/или менее 10% NK-клеток, и/или менее 10% гранулоцитов;
 - (e) экзогенный агент содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP) (например, химерный антигенный рецептор (CAR)); и/или в популяции клеток отсутствует тоническая передача сигналов через CAR.
3. Композиция, содержащая популяцию клеток, где популяция клеток представляет собой популяцию рекомбинантных клеток и/или содержит экзогенный агент, при этом популяция клеток представляет собой CD14+ и/или CD16- клетки, и
 - (a) популяция клеток представляет собой неполяризованные миелоидные клетки;
 - (b) после введения субъекту популяция клеток дифференцируется в эффекторные клетки;
 - (c) после введения популяция клеток проникает в пораженный участок субъекта или мигрирует в пораженный участок субъекта; или
 - (d) после введения субъекту популяция клеток имеет продолжительность жизни по меньшей мере 5 дней.
4. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому из вышеприведенных вариантов осуществления изобретения и фармацевтически приемлемый эксципиент.

5. Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий: введение субъекту фармацевтической композиции согласно варианту осуществления изобретения по пункту 4.

6. Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий: введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей популяцию клеток, где популяция клеток представляет собой популяцию рекомбинантных клеток и/или содержит экзогенный агент, при этом популяция клеток представляет собой CD14+ и/или CD16- клетки, и

(a) фармацевтическую композицию вводят субъекту в течение 72 часов после

(i) введения экзогенного агента в популяцию клеток или

(ii) генно-инженерной модификации популяции клеток;

(b) популяцию миелоидных клеток культивируют *ex vivo* менее чем за 48 дней до введения;

(c) популяцию клеток получают способом, который не включает мобилизацию стволовых клеток; и/или

(d) популяцию клеток получают посредством негативной селекции.

7. Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий: введение субъекту композиции, содержащей миелоидную клетку, где миелоидная клетка

(a) характеризуется одним или несколькими из:

(i) наличием сильной экспрессии CD14;

(ii) наличием низкой или неопределяемой экспрессии CD16;

(iii) экспрессией CCR2 и/или CCR5;

(iv) способностью дифференцироваться в несколько подтипов миелоидной линии при получении одного или нескольких подходящих стимулов; и

(b) содержит экзогенный агент, причем при модификации экзогенным агентом *ex vivo* экзогенный агент не изменяет состояние дифференцировки или поляризации миелоидной клетки.

8. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где миелоидная клетка представляет собой CD16- клетку (CD16-отрицательную) или CD16^{low} (CD16-с низкой экспрессией).

9. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где миелоидная клетка представляет собой CD14+клетку (CD14-положительную).

10. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где миелоидная клетка представляет собой CCR2+ клетку (CCR2-положительную) и/или CCR5+ клетку (CCR5-положительную).
11. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где после введения фармацевтической композиции субъекту миелоидная клетка способна дифференцироваться в эффекторную клетку.
12. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где после введения фармацевтической композиции субъекту миелоидная клетка способна мигрировать в пораженный участок субъекта.
13. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где после введения фармацевтической композиции субъекту миелоидная клетка способна проникать в пораженный участок субъекта.
14. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где миелоидная клетка представляет собой CD14+/CCR2+ клетку.
15. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где миелоидная клетка представляет собой CD14+/CCR5+ клетку. Композиция или способ в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где миелоидная клетка представляет собой CD14+/CCR2+/CCR5+ клетку.
16. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где миелоидная клетка представляет собой CD14+/ CD11b+/CCR2+/CCR5+ клетку.
17. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где миелоидная клетка представляет собой CD63+ клетку.
18. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, пептид, углевод, липид или малую молекулу.
19. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где экзогенный агент содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую пептид, причем пептид представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).
20. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где на момент введения фармацевтической композиции миелоидную клетку культивируют *in vitro* менее 2 дней.

21. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где на момент введения фармацевтической композиции миелоидная клетка сохраняет клеточную пластичность.
22. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где на момент введения миелоидная клетка экспрессирует CAR.
23. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где на момент введения фармацевтической композиции в миелоидной клетке отсутствует тоническая передача сигнала с помощью CAR.
24. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где популяцию миелоидных клеток получают способом, включающим *in vitro* воздействие на выделенное множество миелоидных клеток.
25. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где популяцию миелоидных клеток получают способом, который не включает мобилизацию стволовых клеток.
26. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где множество миелоидных клеток выделяют из биологического образца посредством негативной селекции с использованием опосредованного антителами связывания одной или нескольких миелоидных клеток в биологическом образце.
27. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.26, в котором негативную селекцию проводят с использованием проточной цитометрии.
28. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.26, где множество выделенных миелоидных клеток представляет собой
- (i) CD3- клетки (отрицательные),
 - (ii) CD16- клетки (отрицательные) или CD16^{low} клетки,
 - (iii) CD19- клетки (отрицательные);
 - (iv) CD56- клетки (отрицательные); и
 - (v) CD14⁺ клетки (положительные).
29. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где популяция миелоидных клеток, которые были получены посредством негативной селекции из множества миелоидных клеток, выделенных из биологического образца, не экспрессирует CD16, CD56, CD3 или CD19 (CD16-/CD56-/CD3-/CD19- клетки).
30. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.29, где биологический образец представляет собой образец периферической крови.
31. Способ согласно варианту осуществления изобретения по пункту 29, где биологический образец представляет собой образец, полученный в результате афереза. В

некоторых вариантах осуществления изобретения для препарата терапевтических клеток, описанного в настоящем документе, используют только 1, 2 или 3 подходящие фракции из образца, полученного в результате афереза.

32. Способ согласно варианту осуществления изобретения по пункту 24, где биологический образец является гетерологичным или аутологичным по отношению к субъекту.

33. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где по меньшей мере 50 % миелоидных клеток в популяции миелоидных клеток являются недифференцированными.

34. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где популяция миелоидных клеток содержит моноциты M0.

35. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где популяция миелоидных клеток содержит моноциты M1.

36. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где популяция миелоидных клеток содержит моноциты M2.

37. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где по меньшей мере 50 % миелоидных клеток в популяции миелоидных клеток являются неполяризованными.

38. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где субъектом является человек.

39. Композиция или способ в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где заболевание или состояние выбрано из рака, инфекции, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания, метаболического заболевания, нейродегенеративного заболевания и моногенного, полигенного или многофакторного заболевания или расстройства.

40. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где заболевание или состояние представляет собой рак.

41. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где заболевание или состояние представляет собой бактериальную, вирусную, грибковую или паразитарную инфекцию.

42. Композиция или способ по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, где заболевание или состояние представляет собой нейродегенеративное заболевание.

43. Способ выделения или обогащения терапевтически эффективных миелоидных клеток, включающий:

(a) негативную селекцию терапевтически эффективных миелоидных клеток из биологического образца, содержащего миелоидные клетки, посредством:

(i) приведения биологического образца в контакт с одним или несколькими антителами, выбранными из анти-CD16 антитела, анти-CD56-антитела, анти-CD3-антитела и анти-CD19-антитела, и

(ii) удаление из биологического образца клеток, которые связались с одним или несколькими антителами, тем самым выделяя или обогащая терапевтически эффективные миелоидные клетки, которые во время этого процесса остаются относительно неповрежденными. В некоторых вариантах осуществления изобретения обогащение проводят на основе размера и/или неоднородности, например, с помощью проточной цитометрии.

44. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.43, где выделенные терапевтически эффективные миелоидные клетки представляют собой CD14⁺ клетки.

45. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.43, где выделенные терапевтически эффективные миелоидные клетки представляют собой CD14^{hi} клетки.

46. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.43, где выделенные терапевтически эффективные миелоидные клетки представляют собой CD16⁻ клетки или CD16^{low} клетки.

47. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.43, где выделенные терапевтически эффективные миелоидные клетки сохраняют способность дифференцироваться в подмножества миелоидной линии в ответ на подходящий стимул.

48. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.43, где выделенные терапевтически эффективные миелоидные клетки способны к дальнейшей дифференцировке в поляризованные моноциты, макрофаги, дендритные клетки DC1, DC2, DC3, DC4, DC5, DC6 или любую их комбинацию.

49. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.43, где выделенные терапевтически эффективные миелоидные клетки сохраняют способность поляризоваться в фенотипы M1 и M2 в ответ на подходящий стимул.

50. Способ получения популяции миелоидных клеток для лечения нуждающегося в этом субъекта, включающий:

(i) выделение множества миелоидных клеток из биологического образца или их обогащение, где множество миелоидных клеток проявляет клеточную пластичность;

(ii) воздействие *in vitro* на множество миелоидных клеток, выделенных из биологического образца, с использованием экзогенного агента и получение популяции

миелоидных клеток; причем воздействие *in vitro* не изменяет клеточную пластичность множества миелоидных клеток; и

(iii) получение терапевтической композиции, содержащей популяцию миелоидных клеток и приемлемый эксципиент.

51. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.50, где субъектом является человек.

52. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.50, где биологический образец представляет собой образец периферической крови, образец, полученный в результате афереза, образец, полученный в результате лейкофереза, или образец пуповинной крови.

53. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.50, в котором биологический образец получают от субъекта.

54. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.50, в котором биологический образец получают от подходящего донора-человека.

55. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.50, где выделение множества миелоидных клеток из биологического образца или их обогащение включает выделение или обогащение CD14⁺ клеток посредством негативной селекции.

56. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.55, где негативная селекция осуществляется путем контакта клеток человеческого образца с одним или несколькими антителами, выбранными из группы, состоящей из анти-CD16 антитела, анти-CD56-антитела, анти-CD3-антитела и анти-CD19-антитела, и иммобилизацию или удаление клеток человеческого образца, связанных одним или несколькими антителами.

57. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.55, в котором негативную селекцию проводят с помощью проточной цитометрии.

58. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.50, в котором множество миелоидных клеток, выделенных из биологического образца, представляет собой CD14⁺ клетки, которые не экспрессируют CD3, CD19, CD56 и/или CD16.

59. Способ по любому из вариантов осуществления изобретения по пп.43-58, где миелоидные клетки являются недифференцированными или неполяризованными.

60. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.50, где экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, пептид, углевод, липид или малую молекулу.

61. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.50, в котором воздействие включает генно-инженерную модификацию множества миелоидных клеток.

62. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.50 или п.61, в котором воздействие включает введение во множество миелоидных клеток рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую пептид.
63. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.60, где рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой РНК.
64. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.63, где рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.
65. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.63, где при введении нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую пептид, популяция миелоидных клеток экспрессирует пептид.
66. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.63, где пептид представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).
67. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.66, где пептид содержит:
- (i) трансмембранный домен;
 - (ii) внеклеточную область, содержащую по меньшей мере мишень-связывающий домен, который связывается с поверхностным компонентом второй клетки; и
 - (iii) внутриклеточную область, содержащую один или несколько сигнальных доменов.
68. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.67, где вторая клетка представляет собой больную клетку или раковую клетку.
69. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.67, где пептид содержит по меньшей мере один внутриклеточный фагоцитарный сигнальный домен.
70. Способ по любому из вариантов осуществления изобретения по пп.61-69, где внутриклеточный фагоцитарный сигнальный домен функционально связан с внеклеточным мишень-связывающим доменом, и сконструирован таким образом, что его активация происходит при связывании внеклеточного мишень-связывающего домена с компонентом поверхности второй клетки.
71. Способ по любому из вариантов осуществления изобретения по пп.61-70, где введение рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает введение посредством электропорации или нуклеопорации.
72. Способ по любому из вариантов осуществления изобретения по пп.61-70, где введение рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает введение посредством химической доставки.
73. Способ по любому из вариантов осуществления изобретения по пп.61-72, где рекомбинантная нуклеиновая кислота стабильно инкорпорирована в геном клетки.

74. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.73, где инкорпорация осуществляется посредством активации одного или нескольких ферментов, выбранных из транспозазы, интегразы, эндонуклеазы, рекомбиназы и обратной транскриптазы.
75. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.50, где получение композиции включает суспендирование клеток в фармацевтически приемлемом эксципиенте.
76. Способ по любому из вариантов осуществления изобретения по пп. 61-75, где популяция миелоидных клеток сохраняет клеточную пластичность и способность дифференцироваться в несколько миелоидных линий в ответ на подходящие стимулы.
77. Способ по любому из вариантов осуществления изобретения по пп. 61-76, где в популяции миелоидных клеток отсутствует тоническая передача сигналов с помощью CAR.
78. Способ по любому из вариантов осуществления изобретения по пп. 61-77, где популяция миелоидных клеток экспрессирует функциональный CAR и способна проявлять CAR-опосредованный антигенспецифический ответ.
79. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.50 или п.75, где приемлемый эксципиент представляет собой буфер, среду для культивирования клеток, содержащую питательные вещества, ДМСО, глицерин или их комбинацию.
80. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.50, в котором композицию замораживают для последующего использования.
81. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.50, где способ может быть осуществлен менее чем за 12 часов, менее чем за 10 часов, менее чем за 8 часов, менее чем за 6 часов, менее чем за 4 часа или менее чем за 2 часа.
82. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.50, где способ завершается за 2 часа или менее.
83. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.50, в котором множество миелоидных клеток подвергают генной модификации и/или редактированию, тем самым получая популяцию миелоидных клеток.
84. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.50, где множество миелоидных клеток вводят в контакт с одним или несколькими антигенными пептидами, получая таким образом популяцию миелоидных клеток, нагруженных антигеном.
85. Способ получения популяции миелоидных клеток с использованием способа по любому из вариантов осуществления изобретения по пп.43-84, отличающийся тем, что способ можно осуществить примерно за 6 часов или менее; и при этом популяция миелоидных клеток является недифференцированной или неполяризованной, проявляет клеточную пластичность и в ней отсутствует тоническая передача сигналов.

86. Способ по любому из вариантов осуществления изобретения по пп.50-84, где популяция миелоидных клеток для клеточной терапии содержит одно или несколько из:

(a) более, чем примерно 50% живых клеток в популяции, которые представляют собой CD14+CD16- клетки;

(b) более, чем примерно 50% живых клеток в популяции, которые представляют собой CCR2+ и/или CCR5+т клетки;

(c) менее, чем по меньшей мере 50% живых клеток в популяции, которые экспрессируют один или несколько из CD64, CD68, CD80, CD86, CD163, CD206, CD200R, CD31, CD71, CLEC9A, CD1C и AXL/SIGLEC6;

(d) моноциты M0,

(e) моноциты M1,

(f) моноциты M2,

(g) дендритные клетки и

(h) пре-дендритные клетки или дендритные клетки-предшественники.

87. Популяция миелоидных клеток для применения в клеточной терапии, содержащая недифференцированные или неполяризованные клетки, которые были выделены из биологического образца и подвергнуты дальнейшим воздействиям *in vitro* с использованием внешнего агента, выбранного из рекомбинантной нуклеиновой кислоты, пептида, углевода, соединения и малой молекулы, где миелоидные клетки в популяции миелоидных клеток представляют собой CD14+CD16- клетки; или представляют собой CD14hi клетки и CD16lo клетки; и проявляют одно или несколько из следующих свойств:

(i) клеточную пластичность,

(ii) способность дифференцироваться в несколько миелоидных линий,

(iii) способность мигрировать *in vivo* в пораженную ткань,

(iv) способность проникать в больную ткань и

(v) способность изолировать и/или разрушать болезнетворную клетку, ткань или организм.

88. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87, выделенная посредством негативной селекции.

89. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.80, где экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, пептид, углевод, липид или малую молекулу.

90. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87, где клетка популяции миелоидных клеток содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, имеющую последовательность, кодирующую пептид.

91. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87, где клетка популяции миелоидных клеток содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, имеющую последовательность, кодирующую CAR.
92. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87, где клетка популяции миелоидных клеток экспрессирует CAR, проявляющий CAR-опосредованную активацию.
93. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87, где клетка популяции миелоидных клеток экспрессирует CAR и в ней отсутствует тоническая передача сигнала с помощью CAR.
94. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87, где клетка популяции миелоидных клеток представляет собой CD14⁺ клетку.
95. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87, где клетка популяции миелоидных клеток представляет собой CD16⁻ клетку.
96. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87, где клетка популяции миелоидных клеток представляет собой CD14^{high}CD16^{low} клетку.
97. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87, где клетка популяции миелоидных клеток представляет собой CD56⁻ клетку.
98. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87, где клетка популяции миелоидных клеток представляет собой CD3⁻ клетку.
99. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87, где клетка популяции миелоидных клеток представляет собой CD19⁻ клетку.
100. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87, где клетка популяции миелоидных клеток экспрессирует один или несколько хемокиновых рецепторов.
101. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87, где клетка популяции миелоидных клеток экспрессирует CCR2.
102. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87, где клетка популяции миелоидных клеток экспрессирует CCR5.
103. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87, где клетка популяции миелоидных клеток экспрессирует CCR2 и CCR5.
104. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87, где клетка популяции миелоидных клеток представляет собой CD16⁻ /CD56⁻/CD3⁻ /CD19⁻ клетку.

105. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по пп. 87-104.

106. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87 для применения в терапии рака.

107. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87 для применения при лечении нейродегенеративных заболеваний.

108. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по 87, где клетка в популяции после введения в качестве клеточной терапии проявляет повышенную иммуногенность по сравнению с клеткой, на которую не воздействовали *in vitro*.

109. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по 87, где клетка в популяции после введения в качестве клеточной терапии проявляет повышенную клеточную миграцию в пораженную ткань по сравнению с клеткой, на которую не воздействовали *in vitro*.

110. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по 87, где клетка в популяции после введения в качестве клеточной терапии проявляет повышенную фагоцитарную активность по сравнению с клеткой, на которую не воздействовали *in vitro*.

111. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по 87, где клетка в популяции после введения в качестве клеточной терапии проявляет повышенную цитотоксичность по сравнению с клеткой, на которую не воздействовали *in vitro*.

112. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87 для применения в качестве монотерапии.

113. Популяция миелоидных клеток согласно варианту осуществления изобретения по п.87 для применения в составе комбинированной терапии.

114. Способ получения человеческих миелоидных клеток для лечения нуждающегося в этом человека, включающий:

(i) получение множества миелоидных клеток, содержащих недифференцированные или неполяризованные миелоидные клетки, из аллогенного или аутологичного биологического образца посредством негативной селекции с использованием множества антител, содержащих по меньшей мере анти-CD16-антитело, анти-CD3-антитело, анти-CD56-антитело и анти-CD19-антитело;

(ii) конструирование, культивирование, стабилизацию, активацию, обогащение и/или размножение клеток со стадии (i); и

(iii) введение клеток со стадии (ii) субъекту; при этом промежуток времени от получения на стадии (i) до введения на стадии (iii) составляет менее примерно 3 дня.

115. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.103, где биологический образец представляет собой образец периферической крови.

116. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.103, где биологический образец представляет собой образец, полученный в результате афереза.

117. Способ согласно варианту осуществления изобретения по п.103, где клетки со стадии (ii) представляют собой CD14⁺CD16⁻ клетки или CD14^{hi} и CD16^{lo} клетки.

Примеры

Пример 1. Выделение/обогащение и характеристика CD14⁺ миелоидных клеток

[0470] В этом примере для получения миелоидных эффекторных клеток для терапевтического применения миелоидные клетки, представляющие интерес, выделяли из образца, полученного в результате лейкофереза. Моноциты выделяли из коммерческого образца, полученного в результате лейкофереза периферической крови человека (Leukopak, Nemasage.com) с использованием селекции, опосредованной анти-CD14 антителами, а характеристику клеток проводили до и после выделения/обогащения с использованием антител для детекции маркеров, специфичных к клеточной поверхности. Положительную селекцию с использованием анти-CD14-антитела проводили на колонке для разделения клеток (колонка LS, Miltenyi Biotec). Результаты, приведенные на **ФИГ. 4, ФИГ. 5 и ФИГ. 6** показывают, что обогащенные клетки, полученные из образца лейкофереза с использованием связывания с анти-CD14 антителами, в основном представляют собой моноциты, которые практически не содержат клеток, экспрессирующих различные маркеры лимфоцитарной линии: CD3, CD19 и CD56. На **ФИГ. 4** (верхняя и нижняя панели) показаны относительные составы подтипов клеток, определенные на основании экспрессии указанного поверхностного маркера до (верхняя панель) и после (нижняя панель) выделения/обогащения CD14⁺ моноцитов. Использование специфических маркеров и проточной цитометрии показало, что более 95% клеток оказались жизнеспособными и 91,6% клеток из образца Leukopak представляли собой CD14⁺ клетки, что указывает на высокий выход. Образец лейкофереза до выделения/обогащения клеток, с использованием анти-CD14 антитела, содержал 57,8% CD3⁺ клеток. Анти-CD14 антитело привлекло популяцию обогащенных моноцитами клеток, содержащую только 2% CD3⁺ клеток, 2,53% CD56⁺ клеток и 0,29% CD19⁺ клеток. 66,9% клеток представляли собой CD14⁺ и CD16⁻ клетки, и 22% клеток были позитивными как по CD14, так и по CD16. На **ФИГ. 5А и 5В**

показаны результаты проточной цитометрии до и после выделения/обогащения, соответственно. Верхние панели: проточная цитометрия с использованием изотипического контроля; нижние панели: проточная цитометрия с использованием соответствующих антител. На **ФИГ. 6** представлены результаты проточной цитометрии для CD14+ клеток после выделения/обогащения, окрашенных антителами к CD14 и CD16: 6% CD14-CD16+ клеток; 22% CD14+CD16+ клеток; и 66,9% клеток CD14+CD16- клеток.

[0471] Выделенные клетки короткое время культивировали *in vitro* и стимулировали экзогенными агентами, чтобы определить, обладают ли выделенные CD14+ клетки способностью к дальнейшей дифференциации в поляризованные макрофаги M0, M1 и M2. Экзогенные агенты, используемые для стимуляции, приведены в Таблице 2 ниже.

Таблица 2. Стимулирующие агенты для индукции моноцитов

Фенотип	Стимул
M0	Обычная среда (TexMACS/MCSF)
M1-1 (низкий уровень LPC)	Обычная среда с 1 нг/мл LPS, 10 нг/мл IFN гамма
M1-2 (средний уровень LPC)	Обычная среда с 10 нг/мл LPS, 10 нг/мл IFN гамма
M1-3 (Высокий уровень LPS)	Обычная среда с 50 нг/мл LPS, 10 нг/мл IFN гамма
M2-1 (низкий уровень цитокинов)	Обычная среда с 10 нг/мл IL4, IL10, TGF бета
M2-2 (высокий уровень цитокинов)	Обычная среда с 20 нг/мл IL4, IL10, TGF бета

[0472] Культивирование клеток проводили на обычных планшетах для тканевых культур или на планшетах с низкой адгезией (cell repellent планшеты для культивирования) (**ФИГ.7**). Клетки легко дифференцировались в клетки M0, M1, M2 в ответ на заданные стимулы, как показано на **ФИГ. 7**, при этом клетки, культивированные на cell repellent планшетах, немного лучше реагировали на поляризацию линии M2 по сравнению с клетками, культивируемыми на обычных планшетах для тканевых культур. На **ФИГ. 8А** и **ФИГ. 8В** показаны клеточные фенотипы, наблюдаемые при помощи световой микроскопии через 24 часа и 48 часов, соответственно. Оба поляризующих стимула M1 и M2 приводили к изменению экспрессии CD206 и CD80. Концентрация CD206 легко увеличивалась в клетках M2. С другой стороны, клетки M0 или M1 не проявляли повышенной экспрессии CD206. С другой стороны, экспрессия CD80 повышалась в клетках M1, но не в клетках M2

(ФИГ. 9А). Анализ экспрессии CD16 показывает, что она легко повышается при культивировании, и это повышение значительно больше в ответ на стимулы M2. В поляризованных клетках M1 не наблюдается повышения экспрессии CD16 (ФИГ. 9В). Уровень экспрессии CCR2 высок в CD14⁺ клетках. Он повышен у фенотипов M1 и M2, что указывает на то, что эти клетки способны к хемотаксической миграции к месту воспаления или инфекции или к участку опухоли (ФИГ. 9С).

Пример 2. Процесс получения миелоидных клеток (CAR-экспрессирующих эффекторных миелоидных клеток).

В этом примере описан процесс выделения или обогащения и получения терапевтически эффективных миелоидных клеток (также называемых CAR-экспрессирующими эффекторными миелоидными клетками), который может быть масштабирован. Способ включает выделение CD14⁺ клеток из биологического образца или их обогащение, модификацию выделенных клеток путем введения в клетки нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, и получение терапевтической композиции для доставки субъекту, нуждающемуся в терапии на основе миелоидных клеток. На ФИГ. 10 показана схема технологического процесса. Перед выделением или обогащением клеток готовят рекомбинантную нуклеиновую кислоту для введения в клетки. В этом примере вводится информационная РНК.

Получение рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR

[0473] Получают конструкции рекомбинантных нуклеиновых кислот, кодирующих химерный антигенный рецептор (CAR) и вводят в плазмидные векторы для амплификации и/или тестирования экспрессии в эукариотической клетке. В этом примере получают несколько рекомбинантных химерных антигенных рецепторов (CAR). Рекомбинантные CAR конструируют с использованием методов молекулярного клонирования, известных в данной области. Рекомбинантный белок CAR содержит внутриклеточный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен. Каждый домен или часть домена может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты, которая создается с помощью ПЦР из гетерологичных исходных последовательностей, объединяемых вместе путем индивидуального клонирования в вектор, или лигируется в более длинную нуклеиновую кислоту, которая затем встраивается в мульти-сайты клонирования подходящей плазмиды или вектора с подходящим промотором и 3'-регуляторными элементами для амплификации. Вкратце, типичный CAR получают путем введения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или несколько сигнальных доменов (например,

рекрутирующий домен РІЗ-киназы), последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей шарнирный и трансмембранный домен CD8, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей внеклеточный домен, содержащей последовательность, кодирующую HER2-связывающий scFv (HER2 scFv) на внеклеточном конце. Некоторые конструкции включают последовательность FLAG-пептида на внеклеточном конце, сконструированную таким образом, что она не препятствует связыванию scFv с его мишенью, в данном случае с HER2. Эти компоненты лигируют вместе в последовательность, которая кодирует полностью функциональный трансмембранный CAR. Субъединицы нуклеиновой кислоты, кодирующие отдельные домены рекомбинантного белка, конструируют таким образом, чтобы они содержали короткие гибкие линкерные последовательности интронов между двумя доменами. Конструкцию лигируют в плазмиду, содержащую промотор и 3'-стабилизирующие структурные единицы. В одном варианте конструктор помещают в элемент *Alu* ретротранспозона, который кодирует ORF2p и имеет соответствующие 5'- и 3'-последовательности UTR и промотор CMV. Плазмиду амплифицируют в *E. coli*, подтверждают секвенированием или хранят при -80°C.

Получение мРНК

[0474] мРНК получали путем транскрипции *in vitro* с использованием расщепленной плазмиды в качестве матрицы, очищали для удаления контаминирующей ДНК и полиаденилировали. РНК-продукт очищали, ресуспендировали в воде, не содержащей РНКазы, с получением концентрации 1 мг/мл, и хранили в криопробирках.

Выделение/обогащение CD14+ клеток

[0475] Клетки из контейнеров для лейкофереза (Leukopak, Miltenyi Biotec) разбавляли и подвергали фиколл-разделению. Центрифугирование проводили при 400g в течение 40 минут. Обогащенный моноцитами лейкоцитарный слой удаляли, промывали буфером, слегка центрифугировали, ресуспендировали в буфере и проводили негативную селекцию, используя смесь антител, связывающихся с CD3, CD16, CD19, CD56, и пропуская через колонку для разделения клеток (колонка LS, Miltenyi Biotec). Колонки предназначены для удержания клеток, связанных с антителами, и элюированные клетки практически не содержали клеток, экспрессирующих CD3, CD16, CD19, CD56. После повторного прохождения через колонки клетки центрифугировали, промывали и культивировали в течение ночи перед стабилизацией.

Электропорация и хранение/выделение

[0476] Перед электропорацией образец мРНК, кодирующий CAR, размораживали на льду. мРНК электропорировали в клетки с использованием кюветной электропорации. Перед тем как подвергнуть клетки характеристике или валидации для выделения, или криоконсервации, или процессингу для введения, их культивировали в течение нескольких часов.

[0477] Стадии от выделения/обогащения клеток до хранения/выделения происходили в течение 72 часов.

[0478] Трехдневный профиль экспрессии CAR в CD14⁺ клетках показан на **ФИГ. 11**. Уровень экспрессии является самым высоким в день 1 и, хотя экспрессия CAR обнаруживается через 72 часа, она постепенно снижается от пиковой экспрессии. Эти профили экспрессии предполагают отсутствие тонической передачи сигналов посредством CAR в этих клетках.

[0479] Для удобства описания в остальной части раздела «Примеры» эти клетки могут называться эффекторными миелоидными клетками.

Пример 3. Характеристика поляризующего потенциала выделенных CD14⁺ клеток, экспрессирующих CAR.

[0480] Этот пример демонстрирует способность выделенных CD14⁺ клеток, экспрессирующих CAR (эффекторные миелоидные клетки), дифференцироваться в различные миелоидные клеточные линии, что определяется по экспрессии маркеров клеточной поверхности. Клетки, которые были получены и заморожены, как описано, например, в Примере 2, размораживали и культивировали в течение 24 часов. Затем на эти эффекторные миелоидные клетки воздействовали стимулами поляризации, например, как показано на **ФИГ. 12**, (i) GMCSF, (ii) IL4, IL10 и TGFβ (стимулы M2), (iii) среда, кондиционированная активированными Т-клетками (TCM), и (iv) MCSF. Клетки анализировали через 24, 48 и 72 часа с помощью проточной цитометрии, а анализ цитокинов выполняли с помощью Luminex. Экспрессия CD14 не изменялась при экспрессии CAR на 1-й день после размораживания и увеличивалась в присутствии большинства поляризующих стимулов на 2-й день, но была немного ниже в клетках M2 (**ФИГ. 13А**, слева). На 1-й день уровни CD16 в клетках, экспрессирующих или не экспрессирующих CAR, не изменились, за исключением клеток M2, в которых экспрессия CD16 была повышена. Однако на 2-й день уровни экспрессии CD16 были индуцированы в большинстве линий, экспрессирующих или не экспрессирующих CAR, с помощью GMCSF,

IL4, IL10, TGF-beta и TCM, за исключением экспрессирующих CAR клеток, индуцированных с помощью MCSF (**ФИГ. 13А**).

[0481] Как показано на **ФИГ. 13В**, CD206 легко индуцировался любым из стимулов, и изменение было выше в клетках, экспрессирующих CAR, по сравнению с клетками, не экспрессирующими CAR, в то время как экспрессия CD163 мало изменялась в течение 1-го дня, причем изменения были одинаковыми в клетках, экспрессирующих и не экспрессирующих CAR, а также в ответ на различные стимулы. CD206, и CD163 - это маркеры активации макрофагов. Повышенный уровень CD206 или рецептора маннозы указывает на более высокую фагоцитарную активность, а повышенный уровень CD163 указывает на более сильную воспалительную реакцию. Уровень экспрессии PDL1 в клетках M2 был выше по сравнению с другими стимулами в 1-й день и везде повышался на 2-й день. Экспрессия CCR была высокой в CD14 клетках, экспрессирующих или не экспрессирующих CAR, и обычно еще повышалась на 2-й день (**ФИГ. 13С**). Экспрессию МНСI и МНСII анализировали в по-разному стимулированных экспрессирующих CAR и контрольных клетках. В каждом случае клетки, экспрессирующие CAR, имели несколько более высокие уровни экспрессии МНС I и МНСII по сравнению с контрольными (CAR-) клетками.

Пример 4. Клетки, экспрессирующие CAR, обладают высокой специфичностью к мишени и отвечают за распознавание мишени.

[0482] мРНК, кодирующую HER2-CAR, экспрессировали в THP-1 клетках, клеточной линии моноцитов человека, и инкубировали с гранулами, покрытыми HER2. HER2-THP-1 клетки отвечали, секретируя воспалительные цитокины, которые обнаруживали при анализе супернатанта с использованием наборов для анализа Luminex (**ФИГ. 14А и 14В**). Как показано на **ФИГ. 14В**, HER2-THP-1 клетки экспрессируют MIP-1 альфа, IL-8, эотаксин и PIGF-1 только в ответ на гранулы, покрытые HER2, но не на гранулы, покрытые BSA.

[0483] Затем, после размораживания в соответствии с протоколом, описанным в Примере 3, на эффекторные миелоидные клетки, экспрессирующие HER2-FCR-PI3K, воздействовали поляризационным стимулом. Активационный потенциал, опосредованный CAR, и специфичность этих клеток оценивали путем культивирования клеток с поляризующим стимулом (Таблица 2), затем клетки приводили в контакт с гранулами HER2 или контрольными гранулами BSA. Через 18 часов анализировали секрецию цитокинов с помощью мультиплексных наборов Luminex (**ФИГ. 14С**). Результаты показаны на **ФИГ. 14D**. CD14+ CAR клетки, нацеленные на HER2, которые были далее поляризованы с

использованием стимулов M1, при обработке гранулами HER2 экспрессировали и секретировали самые высокие уровни IL1-бета и TNF-альфа по сравнению M0 или M2 поляризованными миелоидными клетками, экспрессирующими HER2-CAR, которые контактировали с гранулами HER2. Экспрессирующие HER2-CAR эффекторные миелоидные клетки, поляризованные M2, при контакте с гранулами HER2 секретировали высокие уровни IFN-гамма, которые были выше, чем для M1 или M0 клеток, которые также экспрессировали HER2-CAR и были активированы гранулами HER2. В отсутствие мишени экспрессия тонических воспалительных цитокинов не наблюдалась.

[0484] Чтобы лучше понять влияние этих эффекторных миелоидных клеток на опухолевые клетки или контрольные неопухолевые клетки, миелоидные клетки, экспрессирующие HER2-специфические и CD5-специфические CAR, подвергали поляризационному сигналу M0, M1 или M2 и инкубировали в среде для культивирования в присутствии опухолевых или неопухолевых клеток в течение 18 часов (**ФИГ. 15A**). Профили цитокинов и хемокинов показаны на **ФИГ. 15Bi**, а профили экспрессии CD80 или CD206 показаны на **ФИГ. 15Bii**. Клетки M1, экспрессирующие HER2-CAR или C5-CAR, при инкубации в присутствии клеточных линий SKOV3 или MSTO легко секретировали CCL3, что указывает на активацию этих клеток. Хемокин CCL3 помогает миграции моноцитов к опухолевым клеткам. M2 дифференцированные клетки высвобождали высокие уровни IL10 в отсутствие опухолевых или контрольных клеток (**ФИГ. 15Bi**). На присутствие H9 (клетки лимфомы) все клетки реагировали повышенными уровнями хемокина CCL3, или IL6, или IL10. Не желая быть связанными какой-либо теорией, можем отметить, что наблюдение, относящееся к повышенным уровням CCL3 в ответ на клетки H9 в некоторых случаях может быть связано с взаимодействием миелоидной клетки с клеткой лимфомы. Уровни экспрессии CD80 и CD206 в этих клетках не изменялись, несмотря на различные обработки, что указывает на то, что клетки сохраняют пластичность и не экспрессируют маркеры зрелых клеток. Кроме того, поляризация в условиях M1 показывает аналогичный результат, например, экспрессия CAR не изменяет способность клеток поляризоваться в этих условиях. Совместная инкубация с опухолевыми клетками не изменяла поляризацию, однако наблюдалась сильная экспрессия МНС и изменения в уровне хемокинов (данные не показаны).

[0485] Результаты, обсуждаемые в этом примере, показывают, что CD14⁺ клетки, экспрессирующие CAR, активны и реагируют на специфические опухолевые клетки, которые экспрессируют мишень, для распознавания и связывания которой предназначен CAR (например, HER2).

Пример 5. Фагоцитарный потенциал CD14+ миелоидных клеток

[0486] В этом примере сначала использовались клетки THP-1, экспрессирующие CAR, содержащий внеклеточный HER2-связывающий домен и FLAG-метку; активные внутриклеточные сигнальные домены, например, внутриклеточный домен CD3z, или домены рекрутирования киназы Megf10-PI3Kinase; или FcR сигнальный домен и домен рекрутирования киназы PI3Kinase. Клетки инкубировали с мечеными опухолевыми клетками и с помощью визуализации отслеживали фагоцитоз, который стимулировали РМА или контролем. Фагоцитоз экспрессирующих HER2 опухолевых клеток наблюдался во всех группах (**ФИГ. 16А**).

[0487] Трансдуцированные лентивирусом экспрессирующие HER2 CAR миелоидные клетки, как описано выше, инкубировали с HER2-положительными опухолевыми клетками (клетки-мишени) или HER2-отрицательными клетками Jurkat, и количество фагоцитированных клеток определяли с помощью проточной цитометрии (**ФИГ. 16В**). Экспрессирующие HER2 миелоидные клетки специфически фагоцитировали HER2-положительные клетки SKOV3, но не клетки Jurkat. На **ФИГ. 16С** показаны результаты визуализации, согласующиеся с данными цитометрии.

Пример 6. Действие специфических эффекторных миелоидных клеток, экспрессирующих CAR, на мышинной опухолевой модели

[0488] В этом примере исследовали *in vivo* действие эффекторных миелоидных клеток, экспрессирующих CAR. Задача заключалась в том, чтобы подготовить мышиную модель опухоли, ввести мышам подходящие миелоидные клетки, отследить результат и определить эффективные уровни доз. Здоровым мышам подкожно вводили 1×10^6 клеток опухолевой клеточной линии CD5-HU9 синдрома Шери, и примерно через 7-10 дней в этом месте у них развивалась опухоль размером около 200 мм^3 . Указанная модель опухоли была использована для эксперимента. Мышей разделили на четыре группы: (а) носитель, лечебные группы: (b) I ($0,8 \times 10^6$ эффекторных миелоидных клеток/мышь); (с) II ($0,1,4 \times 10^6$ эффекторных миелоидных клеток/мышь); и (d) III ($0,1,4 \times 10^6$ эффекторных миелоидных клеток/мышь). Каждые 3 дня проводили пять инфузий, как показано на **ФИГ. 17А**, наблюдали за выживаемостью мышей и проводили финальные анализы, включающие проточную цитометрию и биовизуализацию. На **ФИГ. 17В** показаны данные визуализации через одну неделю после введения 3 лечебных доз. Неожиданно регрессия опухоли наблюдалась у нескольких мышей даже после однократной дозы, а полная ремиссия наблюдалась у пары мышей после трех доз (**ФИГ. 17В**). Количественные данные регрессии опухоли представлены на **ФИГ. 17С** и **ФИГ. 17D**.

Пример 7. Выделение/обогащение миелоидных клеток и получение CAR+ миелоидных клеток

[0489] В этом примере для получения CAR+ миелоидных клеток миелоидные клетки выделяли и обогащали с использованием образца периферической крови, полученного от здоровых доноров или из контейнеров Leukopak, в соответствии с **Протоколом 1** или **Протоколом 2**.

[0490] **Протокол 1.** Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из образца Leukopak, полученного от здорового донора, с использованием Ficoll-Paque для центрифугирования в градиенте плотности. Классические моноциты выделяли (обогащали) с использованием коктейля антител (коммерчески доступные античеловеческие антитела против CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 и CD235a) для истощения множественных клеточных популяций.

[0491] **Протокол 2.** Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из образца Leukopak, полученного от здорового донора, с использованием Ficoll-Paque для центрифугирования в градиенте плотности. CD14+ моноциты выделяли (обогащали) с использованием античеловеческого антитела для мечения и выделения CD14+ клеток.

[0492] Жизнеспособность и общее количество клеток оценивали для каждого образца как до выделения/обогащения, так и после выделения/обогащения. Миелоидные клетки, предназначенные для получения CAR+ (CD14+/CD16-) миелоидных клеток, подсчитывали в каждом образце. Моноциты, обогащенные с использованием **Протокола 1** и **Протокола 2**, окрашивали античеловеческими антителами против CD14, CD16 и анализировали с помощью проточной цитометрии. Оба протокола показали высокое обогащение CD14+/CD16- клетками. Как показано в Таблице 3, при использовании Протокола 1, донорские образцы 1, 2, 3, 5 и 6 показали 4,74-кратное, 7,06-кратное, 7,6-кратное, 24,96-кратное и 9,61-кратное обогащение CD14+/CD16- клеток, соответственно; в каждом случае жизнеспособность клеток превышала 90%. При использовании Протокола 2, донорские образцы 4, 8, 9 и два образца, полученных в результате лейкофереза, показали 5,14-кратное, 4,51-кратное, 5,49-кратное, 4,3-кратное и 3,02-кратное обогащение CD14+/CD16- клеток, соответственно; в каждом случае жизнеспособность клеток также была более 90%.

[0493] **Протокол 3.** Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из образца Leukopak, полученного от здорового донора, с помощью элютриации. CD14+ моноциты обогащали на основании размера и плотности.

[0494] В Таблице 3 показано количество клеток до выделения/обогащения и после выделения/обогащения, их жизнеспособность и популяция CD14+/CD16-клеток,

полученные с использованием **Протокола 1 (Пр. 1)**, Протокола 2 (Пр. 2) и **Протокола 3 (Пр. 3)**.

Таблица 3

Донор	До выделения/обогащения		Способ обогащения	После выделения/обогащения		
	Всего клеток	CD14+/CD16-клетки (% ядерных клеток)		Всего клеток	Жизнеспособность	CD14+/CD16-клетки (% ядерных клеток)
1	3.60E+09	20%	Пр. 1	3.00E+08	94%	94,80%
2	3.60E+09	20%	Пр. 1	3.00E+08	94%	94,80%
3	1.40E +09	11%	Пр. 1	1.40E+09	95%	83,7%
4	5.50E +09	13%	Пр. 2	9.30E+08	95%	66,9%
5	2.10E+09	3%	Пр. 1	2.54e8	97%	74,9%
6	2.85E+09	8%	Пр. 1	3.85E+08	95%	76,9%
Miltenyi Leukopak	N/A	н/д	Пр. 1	2.40E+08	98%	82,8%
7	Огромные агрегаты, плохо анализируемые					
8	4.95E9	16,4%	Пр. 2	2.32e8	97,7%	74%
9	6.8E+09	14,2%	Пр. 2	8.58E+08	-	78%
Miltenyi Leukopak	1.0E+10	17,3%	Пр. 2	1.20E+09	-	74,5%
Astarte 12.5 л Leukopak	9.0E+10	25%	Пр. 2	2.0E+09	-	75,3%
10	1,53E+10	11,6%	Пр. 3	1.53E+09	-	>85%
11	1.13E+10	19,5%	Пр. 3	2.59E+09	-	>78%
12	2,57E+10	14,3%	Пр. 3	8.37E+08	-	>74%
13	1.20E+10	10,2%	Пр. 3	1.71E+09	-	>91%

[0495] Иммунофенотип PBMC и моноциты, обогащенные, согласно **Протоколу 1** и **Протоколу 2**, окрашивали античеловеческими антителами против CD14, CD16, CD3, CD19 и CD56 и анализировали с помощью проточной цитометрии. На **ФИГ. 18А** показан один из репрезентативных анализов с использованием донорского образца 6 из Таблицы 3. В образце присутствовало менее 1% положительных по CD3, CD19 и CD56 клеток, что свидетельствует об эффективном выделении и обогащении CD14+/CD16- клеток с незначительной примесью Т-клеток, В-клеток и NK-клеток. Аналогично, на **ФИГ. 19А** показано репрезентативное иммунофенотипирование донорского образца 9 из PBMC с использованием моноцитов, выделенных, согласно Протоколу 2, и дополнительно окрашенных античеловеческими антителами против CD14, CD16, CD3, CD19 и CD56, которые были проанализированы с помощью проточной цитометрии. В этом эксперименте 78% выделенных моноцитов представляли собой CD14+CD16- клетки с менее чем 5% клеток, положительных по CD3, CD19 и CD56.

[0496] После выделения и обогащения CD14+/CD16- моноцитов, как показано в примере, клетки электропорировали мРНК, кодирующей рекомбинантный CD5 CAR.

[0497] Через 18 ч или 24 ч после электропорации моноциты окрашивали античеловеческими антителами против CD14 и CD16, а также реагентом для определения экспрессии CD5-CAR трансгена, а затем клетки анализировали с помощью проточной цитометрии. Результаты, полученные с использованием Протокола 1, показывают, что 82,5% клеток представляют собой CD14+CD16- клетки и 79,1% клеток экспрессируют CD5 CAR (**ФИГ. 18В**); при использовании Протокола 2 было 68,8% CD14+CD16- клеток и 94% клеток экспрессировали CD5 CAR (**ФИГ. 19В**). Результаты, полученные при использовании Протокола 3, показаны на **ФИГ. 23**.

[0498] Репрезентативные аминокислотные последовательности CD5-CAR и HER2-CAR представлены ниже.

[0499] CD5-FcR-PI3K

MWLQSLLLLGTVACSIQELVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAP
GKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRR
GYDWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICR
ASQDINSYLSWFQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGI
YYCQQYDESPWTFGGGTKLEIKSGGGGSGALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPT
PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCRRLKIQ
VRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYLKHEKPPQGSGSYEDMRGILYAAPQLRSIR
GQPGPNHEEDADSYENM (SEQ ID NO: 1)

[0500] HER2-FcR-PI3K

MWLQSLLLLGTVACSIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPGK
 APKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTK
 VEIKRTGSTSGSGKPGSGEGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ
 APKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS
 RWGGDGFYAMDVWGQGTLLTVSSSGGGGSGALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPR
 PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRL
 KIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETIYETLKHEKPPQGSYEDMRGILYAAPQLR
 SIRGQPGPNHEEDADSYENM (SEQ ID NO: 2)

[0501] CD5-FcR-CD40

MWLQSLLLLGTVACSIQILVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAP
 GKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRR
 GYDWYFDVWGQGTLLTVSSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCR
 ASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSRSGSGTDTYTLTISSLQYEDFGI
 YYCQQYDESPWTFGGGKLEIKSGGGGSGALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPT
 PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKIQV
 RKAATSIEKSDGVYTGLSTRNQETIYETLKHEKPPQKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINF
 PDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ (SEQ ID NO: 3).

Пример 8. Влияние вирусной трансдукции на клетки

[0502] Этот пример демонстрирует пробный цикл процесса получения CFP-экспрессирующих клеток и их культивирования *ex vivo* для стабилизации трансдуцированных клеток перед замораживанием. В течение определенного периода времени в клетках отслеживали экспрессию CD14 и CD16. В описанном здесь иллюстративном исследовании CD14+/CD16- моноциты выделяли из донорской крови, трансдуцировали лентивирусом 4^{-го} поколения, экспрессирующим HER2-CFP, при 50MOI и замораживали. Моноциты размораживали (день 0) и культивировали в концентрации $2,5 \times 10^6$ /мл в TexMACS с 100 нг/мл MCSF в адгезивных планшетах Corning UltraLow в течение четырех дней. Каждый день клетки ресуспендировали пипетированием и 100000 клеток окрашивали антителом против CD14, конъюгированным с Alexa700 (разведение 1:20) и антителом против CD16, конъюгированным с PE (разведение 1:20) или подходящими по изотипу контрольными антителами. Затем окрашенные антителами клетки анализировали на проточном цитометре Attune NXT. Данные анализировали на FlowJo. Как показано на точечных диаграммах на **ФИГ. 20**, в день 0 - 72% клеток представляют собой CD14+/CD16- клетки, и уровень экспрессии CD16 постепенно

увеличивается в ходе культивирования. На 2-й день только около 27,3% клеток были CD14+/CD16-; на 3-й день только около 19,6% клеток были CD14+/CD16-; а на 4-й день только около 12% клеток были CD14+/CD16-. Это указывает на то, что CD14+/CD16- клетки не способны сохранять свою CD14+/CD16- сигнатуру при вирусной трансдукции и, вероятно, не подходят для терапевтического производственного процесса.

Пример 9. Влияние M-CSF и GM-CSF на культивирование *ex vivo*

[0503] Этот пример демонстрирует пробный цикл процесса получения CFP экспрессирующих клеток, и их *ex vivo* культивирования в присутствии M-CSF или GM-CSF. В этом исследовании CD14+/CD16- моноциты выделяли из донорской крови и замораживали. Клетки размораживали и культивировали в течение ночи со 100 нг/мл MCSF или 100 нг/мл GM-CSF, а затем электропорировали с конструктами, кодирующими один из четырех CD5-связывающих CFP: конструктом CD5-FcR-PI3K, конструктом CD5-FcR-CD40, конструктом CD5-FcR-MDA5, конструктом CD5-FcR-MyD88. Два набора контролей представляли собой контроль до электропорации и контроль mock-электропорации. После электропорации (ЭП) клетки в концентрации $2,5 \times 10^6$ /мл культивировали в TechMACS с 100 нг/мл MCSF или 100 нг/мл GM-CSF в адгезивных планшетах Corning UltraLow в течение четырех дней. Клетки собирали, анализировали на экспрессию связывающего белка, экспрессию цитокинов и проводили анализ фагоцитоза, как описано в другом разделе данного документа. Далее следовала общая схема анализа: день 0: выделение/обогащение – день 1: электропорация (ЭП) – день 2: фагоцитоз – день 3: сбор цитокинов.

[0504] Данные показаны на **ФИГ. 21А** (жизнеспособность клеток), **ФИГ. 21В** (анализ экспрессии рецептора (связывающего белка)), **ФИГ. 21С** (анализ фагоцитоза) и **ФИГ. 21D** (выделение цитокинов). Эти исследования показали, что M-CSF и GM-CSF могут влиять на фенотип клеток и активность рецепторов. Данные, приведенные на **ФИГ. 21А**, показывают, что культивирование клеток в GM-CSF незначительно снижает жизнеспособность и количество клеток. При этом GM-CSF повышал уровень экспрессии конструктов, как показано на **ФИГ. 21В**. Однако данные анализа фагоцитоза, продемонстрированные на примере поглощения опухолевыми клетками H9 при 37°C, указывают на то, что GM-CSF снижает способность к фагоцитозу CFP-экспрессирующих клеток (**ФИГ. 21С**). В то же время на **ФИГ. 21D** показано, что GM-CSF подавлял уровень различных цитокинов в CFP-экспрессирующих клетках. Эти исследования могут указывать на то, что GM-CSF играет более сложную роль, чем M-CSF, поскольку GM-CSF индуцирует воспалительный моноцитоподобный фенотип, который может очень быстро демонстрировать истощение воспалительного потенциала. Они также могут указывать на то, что GM-CSF способствует

иммунологической толерантности и может действовать как иммунорегуляторный цитокин. Его роль может зависеть от концентрации и контекста. С другой стороны, М-CSF подходит для краткосрочного (например, в течение ночи) культивирования и предохраняет клетки от быстрой трансформации их фенотипа.

Пример 10. Получение *ex vivo* популяции человеческих клеток, экспрессирующих рекомбинантную нуклеиновую кислоту

[0505] Следующие примеры демонстрируют успешное получение для включения в фармацевтическую композицию *ex vivo* популяции человеческих клеток, содержащих рекомбинантную нуклеиновую кислоту с последовательностью, кодирующей анти-CD5 CFP (CD5-CFP-экспрессирующие клетки) или анти-HER-2 CFP (HER2-CFP-экспрессирующие клетки), причем более 70% клеток в *ex vivo* популяции человеческих клеток представляют собой CD14+ и CD16- клетки. Для исследования, представленного на **ФИГ. 22**, выделяли человеческие CD14+/CD16- моноциты, и соответствующие нуклеиновые кислоты, кодирующие CD5-связывающий CFP (слева) или HER2-связывающий CFP (справа), инкорпорировали в клетки, после чего для экспрессии белка клетки культивировали в течение ночи. 100 000 клеток окрашивали антителом против CD14, конъюгированным с Alexa700 (разведение 1:20), и антителом против CD16, конъюгированным с PE (разведение 1:20), или контрольными антителами подходящих изотипов. Затем окрашенные антителами клетки анализировали на проточном цитометре Attune NXT. Данные анализировали на FlowJo. Экспрессию CD5-CFP или HER2-CFP анализировали с использованием анти-CD5-CFP и анти-HER2-CFP антител. Как показано на **ФИГ. 22**: 71,3% клеток представляли собой CD14+/CD16- клетки (слева) и 76% клеток экспрессировали CD5-CFP (посередине); 76,7% клеток представляли собой CD14+/CD16- клетки, и 95% клеток экспрессировали HER2-CFP (справа).

[0506] В другом опытном цикле, в рамках клинического производственного протокола, клинические донорские CD14+/CD16- клетки посредством негативной селекции выделяли из образца, полученного путем лейкофереза, и конструкторы (показаны в Таблице 4) (CD5-FcR-PI3K, HER2-FcR-PI3K, последовательность антигена CoVID 19 и последовательность антигена глиобластомы (GBM)) вводили в выделенные человеческие CD14+/CD16- клетки. Один донорский образец использовали для конструктора CD5-FcR-PI3K и один донорский образец использовали для конструктора HER2-FcR-PI3K. Для наборов с конструкторами антигенов CoVID 19 проводили 4 клинических эксперимента с 4 независимыми донорами, данные показывают среднее значение для всех четырех экспериментов. Для наборов с антигеном GBM проводили 3 клинических эксперимента с 3 независимыми донорами.

Сразу после этого клетки были заморожены. Клетки размораживали к моменту введения (путем инъекции) и аликвоту образца анализировали с помощью проточной цитометрии, как описано в предыдущих разделах.

Таблица 4

	(CD5-Fcg-PI3K)	(HER2-Fcg-PI3K)	(SARS-CoV-2)	(GBM)
CD14+CD16-	71,3%	76,9%	89.05	>70%
% экспрессии связывающего белка	76,1%	95%	N/A	N/A
Копий клеток/лунку	76	N/A	3,6	>2 копий на клетку

[0507] В другом иллюстративном эксперименте клетки выделяли и культивировали или до электропорации, или после размораживания электропорированных клеток в мешках для культивирования клеток (Bioprocessor) или в различных типах флаконов для культивирования, отличающихся производителем, маркой, моделью или площадью поверхности. Результаты тестового цикла, приведенные на **ФИГ. 23**, показывают, что более высокий выход терапевтически эффективных клеток достигался при культивировании во флаконах, а не в мешках для культивирования. Например, более высокий процент клеток, экспрессирующих CD5-связывающий CFP, был получен при культивировании во флаконах, а не в мешках. Однако некоторые наборы образцов показали снижение экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты через 48 часов или 72 часа после трансфекции.

[0508] В иллюстративном образце, полученном в результате лейкофереза, отбирали соответствующие фракции лейкофереза, и типы клеток из этих фракций оценивали на однородность типов клеток, например, при получении положительных по CD14+ и CD11b клеток в пуле фракций. Клетки, объединенные из трех последовательных фракций анализа лейкофереза (например, между фракциями 2-5), последовательно обогащали клетками, которые экспрессировали CD14 и CD11b, с высоким процентом клеток, которые

представляли собой CD16- и CD3- клетки. Пример взятого образца от одного донора-человека приведен на **ФИГ. 24**, где показаны результаты оценки после элютриации. В типичном анализе трансфекция клеток путем электропорации после того, как клетки из образцов лейкофереза были собраны, как описано выше, приводила к клеточной популяции с высоким уровнем CD14+ клеток, высоким уровнем CD11b+ клеток, низким уровнем CD16+ клеток и низким уровнем CD3+ клеток, как показано на **ФИГ. 25A** и **25B**; и клетки показали высокую эффективность трансфекции при электропорации (**ФИГ. 25C**). На **ФИГ. 25D** показан процент живых клеток, окрашенных 7AAD, в примерном цикле после электропорации. Высокий процент клеток оставался живым как в нетрансфицированных, так и в трансфицированных клетках, экспрессирующих связывающий CD5 CFP. После электропорации клетки замораживали. Анализ проводили через 0 ч после размораживания. UNT- нетрансфицированный; CD5 - CD5-связывающий CFP, трансфицированный.

[0509] С использованием способов и протоколов, приведенных в описании, были получены клетки высокого качества для терапевтического применения, качество клеток было проверено перед введением пациентам-людям. На **ФИГ. 26** показано, что клетки, протестированные перед выпуском в оборот, соответствовали нужным характеристикам. Моноциты были гейтированы, как показано. По данным проточной цитометрии более 80% клеток были одиночными клетками (синглетами), согласно анализу параллельной проточной цитометрии с использованием 7AAD в качестве маркера апоптоза, более 90% клеток были живыми клетками. Более 90% клеток были положительными в отношении экспрессии CFP в образце. Образцы анализировали через 18 ч после электропорации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая *ex vivo* популяцию CD14+/CD16- клеток, где *ex vivo* популяция CD14+/CD16- клеток представляет собой рекомбинантную *ex vivo* популяцию клеток и/или содержит экзогенный агент.
2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что *ex vivo* популяция CD14+/CD16- клеток представляет собой популяцию человеческих клеток.
3. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что *ex vivo* популяция CD14+/CD16- клеток представляет собой популяцию неполяризованных или недифференцированных миелоидных клеток.
4. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую белок или пептид, который экспрессируется в клетке из популяции CD14+/CD16- клеток.
5. Композиция по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP).
6. Композиция по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что CFP содержит: (a) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, и (b) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом.
7. Композиция по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую белок или пептид, который экспрессируется на поверхности мембраны клетки в популяции CD14+/CD16- клеток.
8. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что белок или пептид, экспрессируемый на поверхности мембраны, содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном или болезнетворным агентом.
9. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что антиген представляет собой раковый антиген.
10. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что антиген представляет собой микробный патогенный антиген.
11. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует белок или пептид, усиливающий иммунный ответ клетки.
12. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует биспецифический или триспецифический рекрутер.

13. Композиция по пп. 1-4, отличающаяся тем, что белок или пептид содержит один или несколько антигенов или их фрагментов.
14. Композиция по п.13, отличающаяся тем, что антиген из одного или нескольких антигенов слит с эндосомальной нацеливающей последовательностью.
15. Композиция по п.13, отличающаяся тем, что антиген из одного или нескольких антигенов содержит секреторную последовательность.
16. Композиция по любому из пп. 13-15, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует первый антиген, который слит с эндосомальной нацеливающей последовательностью, и второй антиген, содержащий секреторную последовательность.
17. Композиция по любому из пп. 1-4 или 13-16, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует белок или пептид, который секретируется клеткой популяции CD14+/CD16- клеток.
18. Композиция по п.16, отличающаяся тем, что первый антиген и второй антиген кодируются одним и тем же геном.
19. Композиция по любому из пп. 13-18, отличающаяся тем, что белок или пептид представляет собой эндосомально процессированный белок.
20. Композиция по любому из пп. 13-19, отличающаяся тем, что белок или пептид представляет собой эпитоп антигена, который экспонируется на клеточной поверхности.
21. Композиция по любому из пп. 13-20, отличающаяся тем, что антиген представляет собой вирусный, бактериальный, антиген простейших или грибковый антиген.
22. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую белок или пептид, который представляет собой цитоплазматический белок или пептид.
23. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что экзогенный агент представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую белок или пептид, который является иммуногенным.
24. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что экзогенный агент представляет собой антиген.
25. Композиция по пп. 1-24, отличающаяся тем, что:
 - (i) по меньшей мере 25% клеток в популяции клеток представляют собой CD14+ и CD16-клетки, и
 - (ii) менее 25% клеток в популяции клеток представляют собой дендритные клетки.

26. Композиция по любому из пп. 1-25, отличающаяся тем, что: по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CCR2+ и/или CCR5+ клетки.
27. Композиция по пп.1-26, отличающаяся тем, что по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD63+ клетки.
28. Композиция по любому из пп. 1-27, отличающаяся тем, что по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD56-, CD3- и/или CD19- клетки.
29. Композиция по любому из пп. 1-28, отличающаяся тем, что менее 40% клеток в популяции клеток представляют собой клетки-макрофаги.
30. Композиция по пп.1-29, отличающаяся тем, что *ex vivo* популяция человеческих клеток содержит по меньшей мере 1×10^7 клеток.
31. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому из пп. 1-30 и фармацевтически приемлемый эксципиент.
32. Фармацевтическая композиция, содержащая:
 - (a) популяцию человеческих клеток, содержащую рекомбинантную нуклеиновую кислоту, при этом рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), где:
 - (i) по меньшей мере 25% клеток в популяции человеческих клеток представляют собой CD14+ и CD16- клетки, и
 - (ii) менее 25% клеток в популяции человеческих клеток представляют собой дендритные клетки; и
 - (b) фармацевтически приемлемый эксципиент.
33. Фармацевтическая композиция по п.32, отличающаяся тем, что CFP содержит:
 - (i) внеклеточный антигенсвязывающий домен и
 - (ii) трансмембранный домен, где внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен функционально связаны.
34. Фармацевтическая композиция по п.32 или п.33, отличающаяся тем, что CFP дополнительно содержит один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов, функционально связанных с трансмембранным доменом.
35. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 32-34, отличающаяся тем, что CFP содержит внутриклеточный домен, полученный из фагоцитарного рецептора или рецептора-мусорщика.
36. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 32-35, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой CD5-связывающий домен или HER2-связывающий домен.

37. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 32-36, отличающаяся тем, что трансмембранный домен получен из CD8 трансмембранного домена, CD28 трансмембранного домена или CD68 трансмембранного домена.
38. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 32-37, отличающаяся тем, что что один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов содержат домен рекрутирования киназы.
39. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 32-38, отличающаяся тем, что CFP содержит:
 - (a) внеклеточный домен, содержащий:
 - (i) scFv, который специфически связывается с CD5 или HER2, и
 - (ii) шарнирный домен, полученный из CD8 или CD28 или внеклеточный домен CD68 или его часть;
 - (b) CD8 трансмембранный домен, CD28 трансмембранный домен или CD68 трансмембранный домен; и
 - (c) внутриклеточный домен, содержащий по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена, при этом по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена содержат:
 - (i) первый внутриклеточный сигнальный домен, полученный из FcγR или FcεR, и
 - (ii) второй внутриклеточный сигнальный домен, который:
 - (A) содержит домен рекрутирования PI3-киназы (PI3K) или
 - (B) получен из CD40.
40. Фармацевтическая композиция по п.32, отличающаяся тем, что популяция человеческих клеток представляет собой *ex vivo* сконструированные клетки.
41. Фармацевтическая композиция, содержащая:
 - (a) популяцию человеческих клеток, содержащих рекомбинантную нуклеиновую кислоту, где рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую последовательность, кодирующую антигенный пептид, где:
 - (i) по меньшей мере 25% клеток в популяции человеческих клеток представляют собой CD14+ и CD16- клетки, и
 - (ii) менее 25% клеток в популяции человеческих клеток представляют собой дендритные клетки; и
 - (b) фармацевтически приемлемый эксципиент.
42. Фармацевтическая композиция по п.41, отличающаяся тем, что CD14+ и CD16- клетки популяции человеческих клеток экспонируют на клеточной поверхности

микробный антиген или его фрагмент, соединенный с молекулой МНС класса I или МНС класса II.

43. Фармацевтическая композиция по п. 41 или 42, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую антигенный пептид, выбранный из CMVpp65 пептида, мутантного R132H, пептида изоцитратдегидрогеназы 1 (IDH), TRP2 пептида и антигенного пептида SARS-CoV-2.
44. Фармацевтическая композиция по любому из пп.41-42, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует первый антиген, который слит с эндосомальной нацеливающей последовательностью, и второй антиген, содержащий секреторную последовательность.
45. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 41-44, отличающаяся тем, что антиген эндосомально процессируется CD14+ и CD16- клетками.
46. Композиция по п.1 или фармацевтические композиции по любому из пп. 32-45, отличающиеся тем, что клетки популяции человеческих клеток выделены из биологического образца субъекта.
47. Композиция по п.1 или фармацевтические композиции по любому из пп. 32-46, отличающиеся тем, что клетки выделены из периферической крови.
48. Композиция по п.1 или фармацевтические композиции по любому из пп. 32-47, отличающиеся тем, что что клетки сконструированы *ex vivo*.
49. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 32-48, отличающаяся тем, что:
 - (а) по меньшей мере 25% клеток в популяции клеток представляют собой CCR2+ и/или CCR5+ клетки;
 - (b) по меньшей мере 25% клеток в популяции клеток представляют собой CD63+ клетки;
 - (с) по меньшей мере 50% клеток в популяции клеток представляют собой CD56-, CD3- и/или CD19- клетки; и
 - (d) менее 40% клеток в популяции клеток представляют собой клетки-макрофаги.
50. Фармацевтическая композиция по любому из пп.32-49, отличающаяся тем, что популяция клеток представляет собой популяцию неполяризованных или недифференцированных миелоидных клеток.
51. Фармацевтическая композиция по любому из пп.32-50, отличающаяся тем, что фармацевтическая композиция содержит от около 10^7 клеток до около 10^{10} клеток.

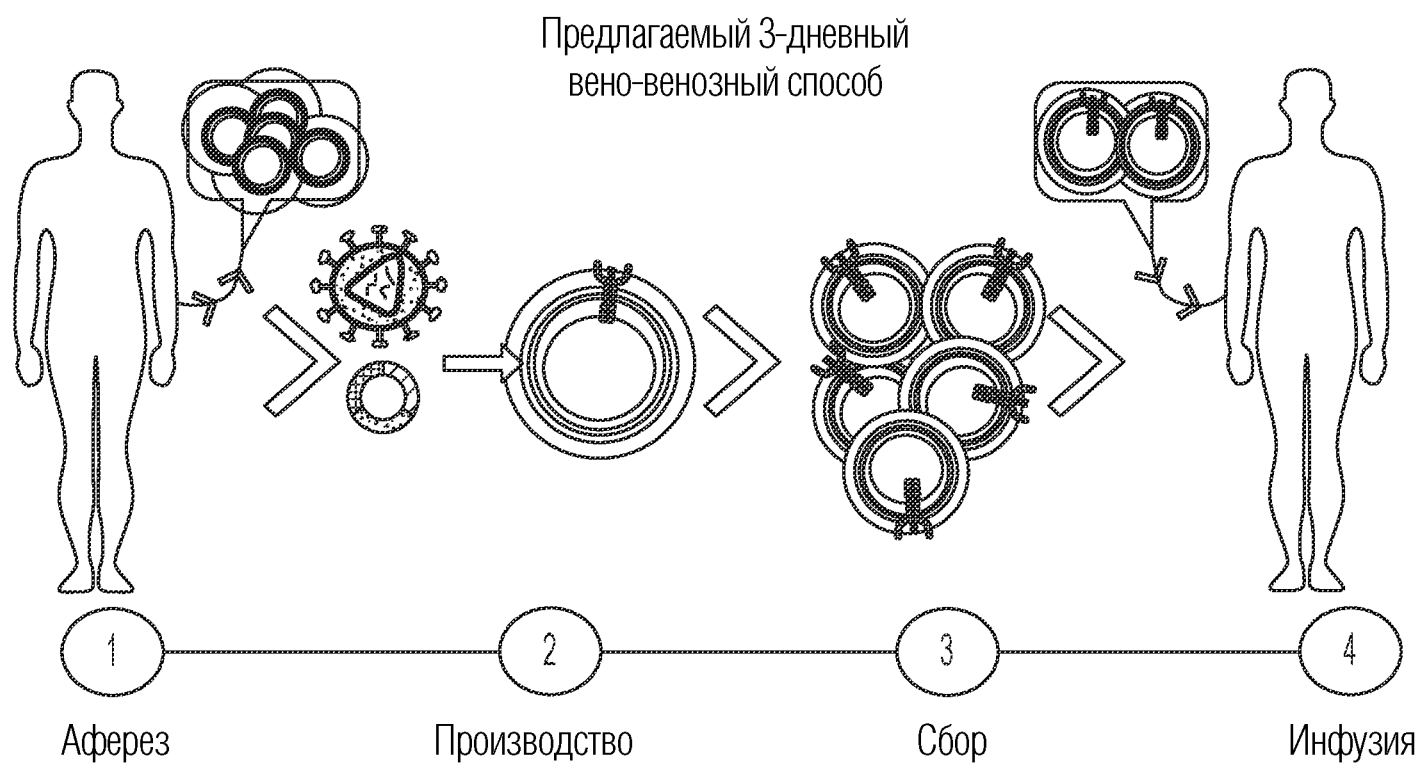
52. Фармацевтическая композиция по любому из пп.32-51, отличающаяся тем, что клетки композиции подвергались двум или менее циклам замораживания/размораживания.
53. Композиция по п.1 или фармацевтические композиции по любому из пп. 32-52, отличающиеся тем, что после выделения из биологического образца или обогащения клетки культивировали *ex vivo* менее 48 часов.
54. Композиция по п.1 или фармацевтические композиции по любому из пп. 32-52, отличающиеся тем, что до введения жизнеспособность клеток составляет более 80%, более 85%, более 90% или более 95%.
55. Способ лечения микробной инфекции у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по любому из пп.41-54.
56. Способ по п.55, дополнительно включающий получение перед введением CD14+ и CD16- клеток, экспрессирующих микробный антиген, где способ включает:
- (i) выделение CD14+ и CD16- клеток из биологического образца или их обогащение,
 - (ii) введение в клетки, полученные на стадии (i), рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую по меньшей мере один антиген, для экспрессии и презентации антигена на поверхности клетки.
57. Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по любому из пп.31-40.
58. Способ по п.57, отличающийся тем, что заболевание или состояние представляет собой рак.
59. Способ по п.57, дополнительно включающий получение перед введением CD14+ и CD16- клеток, экспрессирующих CFP, где способ включает:
- (i) выделение CD14+ и CD16- клеток из биологического образца или их обогащение,
 - (ii) введение в клетку, полученную на стадии (i), рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую CFP.
60. Способ по пп. 55 или 57, отличающийся тем, что введение в клетку включает электропорацию клетки рекомбинантной нуклеиновой кислотой.
61. Способ по любому из пп. 55-59, отличающийся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой РНК.

62. Способ по п.60, отличающийся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.
63. Способ по любому из пп.55-61, отличающийся тем, что перед инкорпорацией в клетку рекомбинантную нуклеиновую кислоту ассоциируют с одним или несколькими липидами в водной смеси.
64. Способ по любому из пп. 55-62, отличающийся тем, что перед введением CD14+/CD16- клетки подвергают двум или менее циклам замораживания/размораживания.
65. Способ по любому из пп. 55-63, отличающийся тем, что перед введением клетки фармацевтической композиции культивируют *ex vivo* менее 48 часов.
66. Способ по любому из пп.55-64, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят субъекту-человеку в течение 48 часов после инкорпорации рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетки, культивируемые *in vitro*, или замораживают для последующего введения.
67. Способ по любому из пп. 55-65, отличающийся тем, что что *ex vivo* популяцию человеческих клеток культивируют *ex vivo* в течение менее 36 часов, 24 часов, менее 18 часов, менее 12 часов или менее 6 часов перед введением.
68. Способ по любому из пп. 55-66, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере 10^7 клеток в популяции клеток.
69. Способ по любому из пп. 55-67, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере 10^8 клеток в популяции клеток.
70. Способ по любому из пп. 55-68, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере 10^9 клеток в популяции клеток.
71. Способ по любому из пп. 55-67, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят однократно.
72. Способ по любому из пп. 55-70, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят вводят более одного раза.
73. Способ по любому из пп. 55-71, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят раз в две недели, раз в 4 недели, раз в 6 недель, раз в 8 недель, раз в 10 недель, раз в 12 недель, раз в 16 недель, раз в 20 недель, раз в 24 недели или один раз в год.
74. Способ по любому из пп. 55-72, отличающийся тем, что клетки являются аутологичными по отношению к субъекту.
75. Способ по любому из пп. 55-73, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит клетки, которые могут:

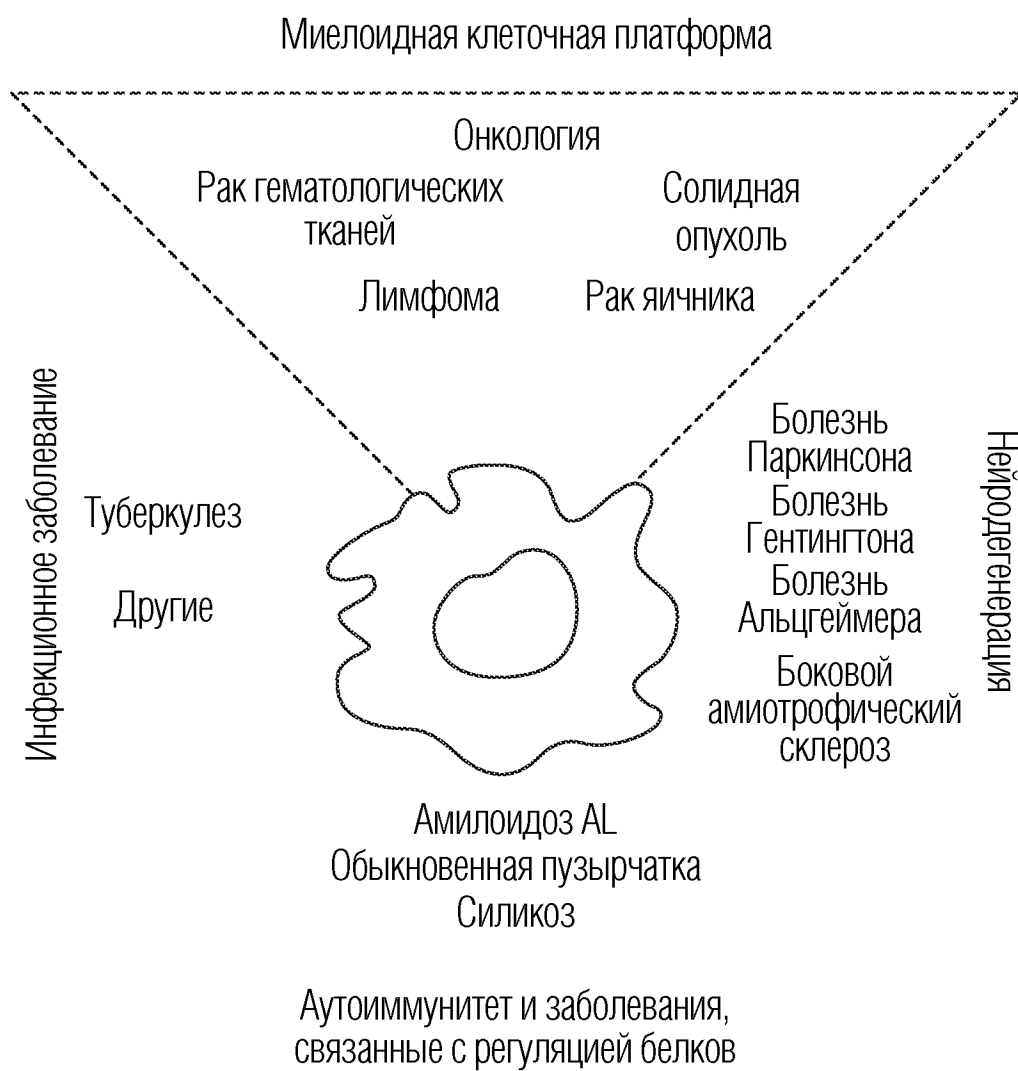
- (a) после введения субъекту дифференцироваться в эффекторные клетки;
 - (b) после введения проникать в пораженный участок субъекта или мигрировать в пораженный участок субъекта; или
 - (c) после введения субъекту имеют продолжительность жизни по меньшей мере 5 дней.
76. Применение композиции или фармацевтической композиции по любому из пп. 1-54 для получения терапевтического средства на основе клеток для лечения заболевания или состояния.
77. Применение по п.76, отличающееся тем, что заболевание или состояние представляет собой рак, инфекцию или аутоиммунное заболевание.
78. Применение композиции или фармацевтической композиции по любому из пп. 1-54 для лечения заболевания или состояния.
79. Применение по п.78, отличающееся тем, что заболевание или состояние представляет собой рак, инфекцию или аутоиммунное заболевание.
80. Способ негативной селекции клеток для получения фармацевтической композиции, включающий:
- (a) приведение биологического образца, полученного от субъекта-человека, в контакт с анти-CD16 антителом и одним или несколькими антителами, выбранными из анти-CD56 антитела, анти-CD3 антитела и анти-CD19 антитела, и
 - (b) сбор клеток биологического образца, которые не связались с анти-CD16 антителом и не связались с одним или несколькими антителами,
 - (c) введение рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую CFP, в клетки, собранные на стадии (b), с получением популяции клеток, где:
 - (i) по меньшей мере 25% клеток в популяции клеток представляют собой CD14+ и CD16 клетки, и
 - (ii) менее 25% клеток в популяции клеток представляют собой дендритные клетки.
81. Способ по п.80, отличающийся тем, что способ включает проточную цитометрию или сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS).
82. Вакцинная композиция, содержащая популяцию CD14+/CD16- клеток, содержащих рекомбинантную нуклеиновую кислоту, где клетки культивировали *ex vivo* менее 48 часов.
83. Композиция по пп.14 или 82, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит эндосомальную нацеливающую последовательность, причем

эндосомальная нацеливающая последовательность представляет собой последовательность LAMP1.

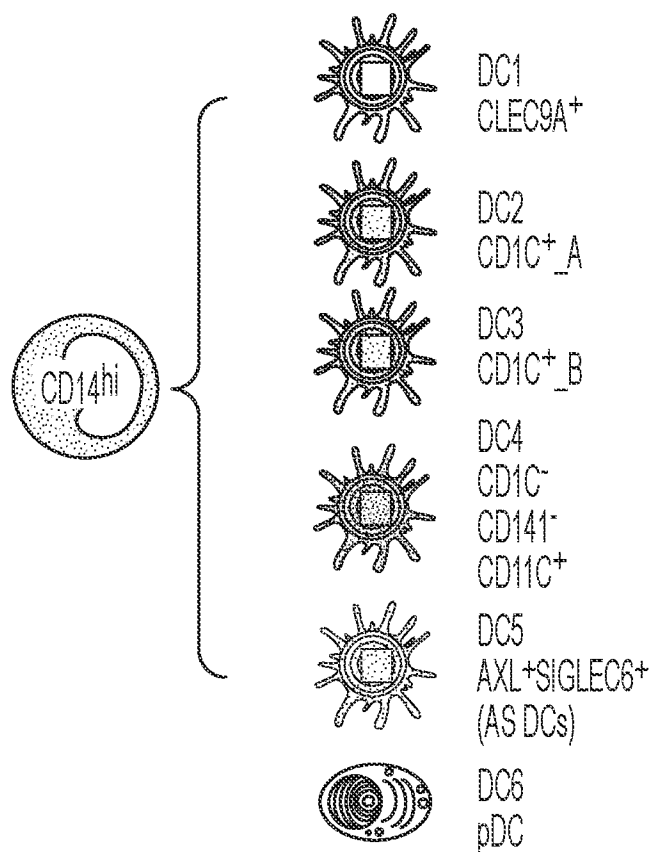
84. Композиция по пп.15 или 82, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит секреторную последовательность, которая представляет собой последовательность секреторного сигнального пептида сигнальной последовательности человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), сигнальную последовательность тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина, сигнальную последовательность легкой цепи человеческого иммуноглобулина, сигнальную последовательность человеческого сывороточного альбумина, сигнальную последовательность человеческого азуроцидина или цистатин человека.
85. Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом человека, включающий введение человеку фармацевтической композиции, содержащей композицию по любому из пп.82-84.



ФИГ. 1



ФИГ. 2



Субпопуляции и функции дендритных клеток

ФИГ. 3

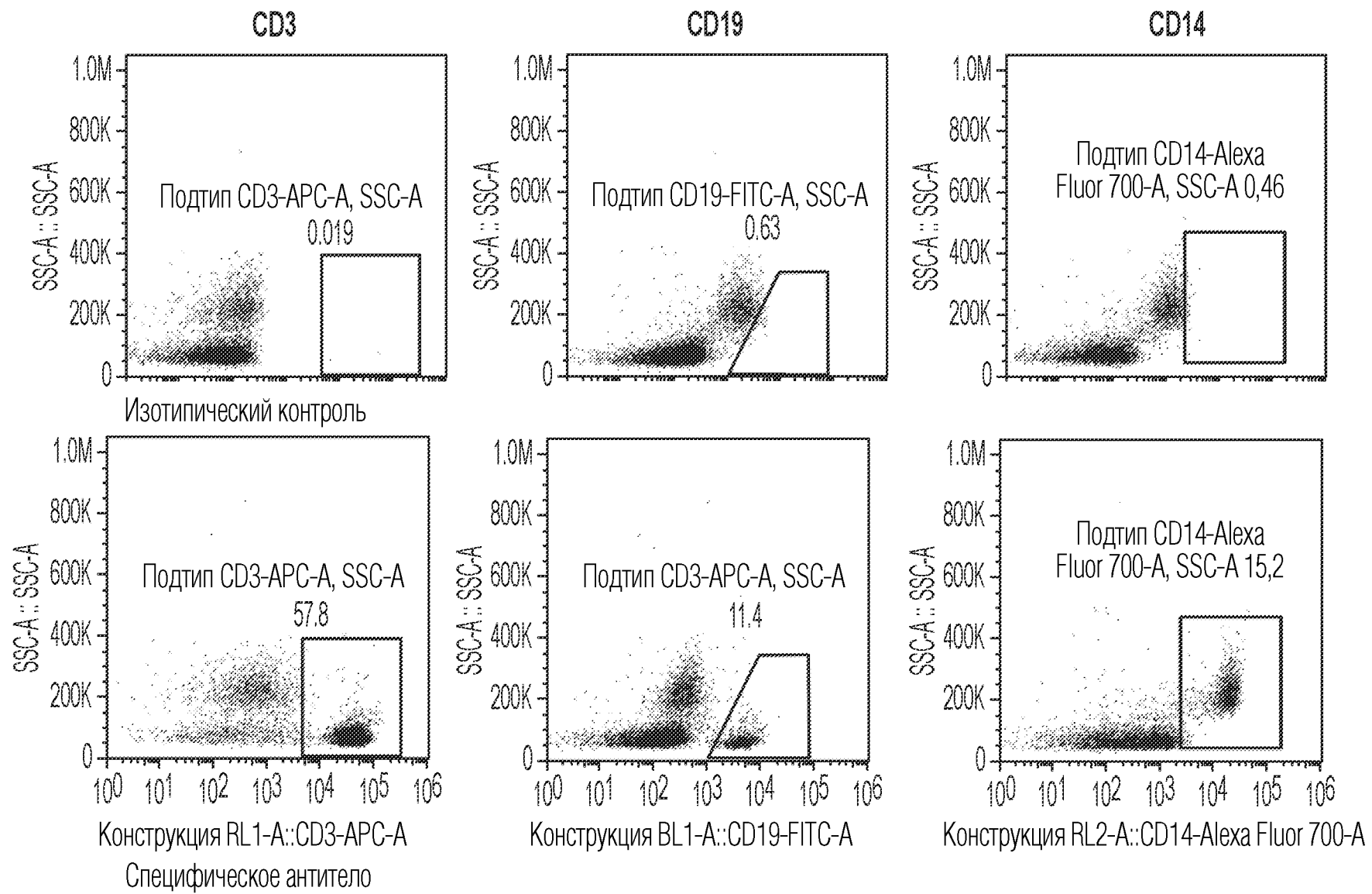
Перед выделением моноцитов:

Донор	Размер образца Leukopak	Выход моноцитов (спецификация)	Общее количество РВМС	Тип колонки	Количество использованных колонок	CD3+ %	CD19+ %	CD56+ %	CD14+ %
1	Полный, 291 мл	2.28e9	5.5e9	LS	8	57.8%	11.4%	13%	15.2%

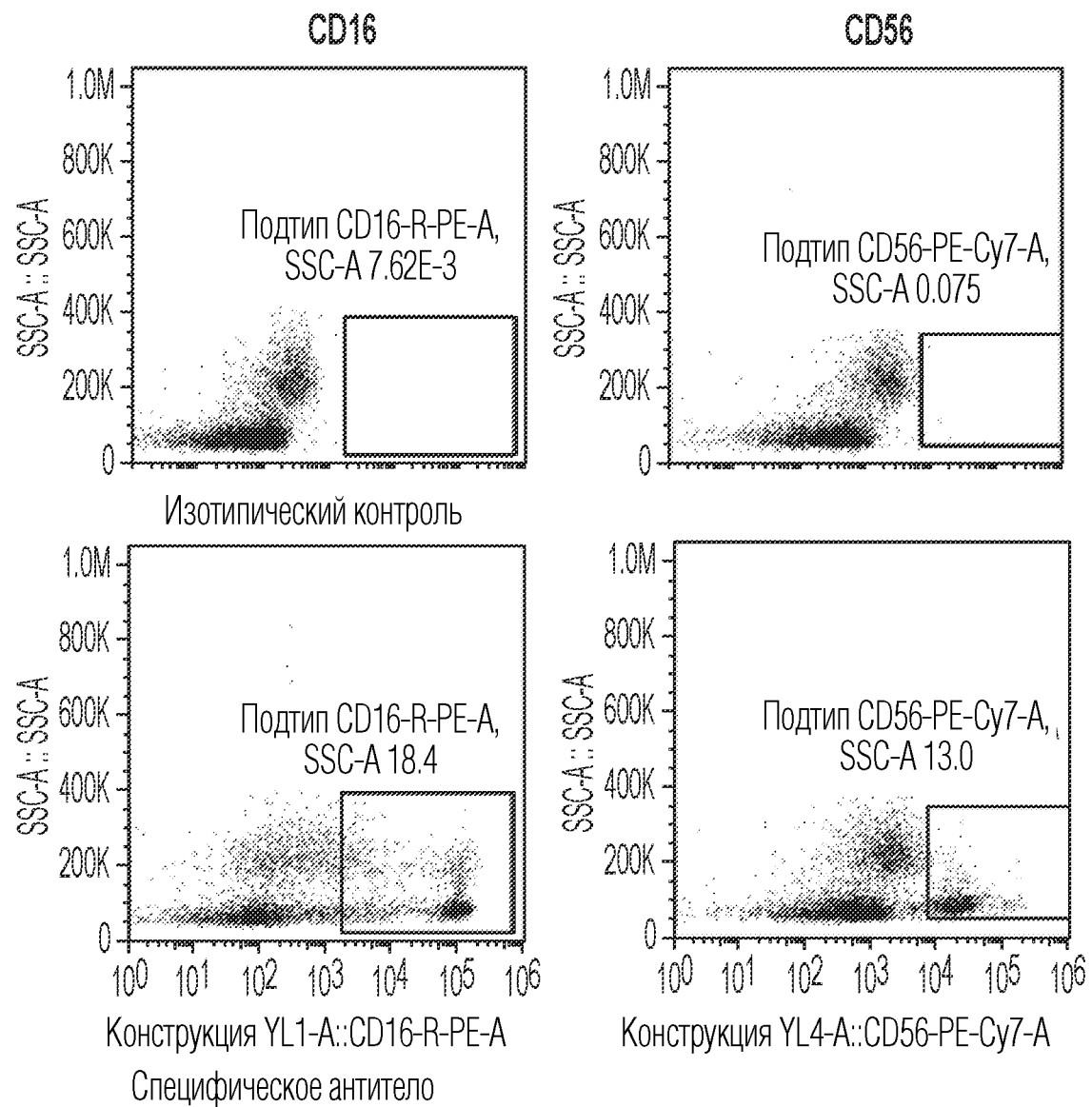
После выделения моноцитов (положительная селекция):

Донор	Выделенные моноциты	% жизнеспособности	CD3+ %	CD19+ %	CD56+ %	CD14+ / CD16(-) %	CD14- / CD16+ %	CD14+ / CD16+ %
1	*9.3e8	>95%	2%	0.29%	2.53%	66.9%	6%	22%

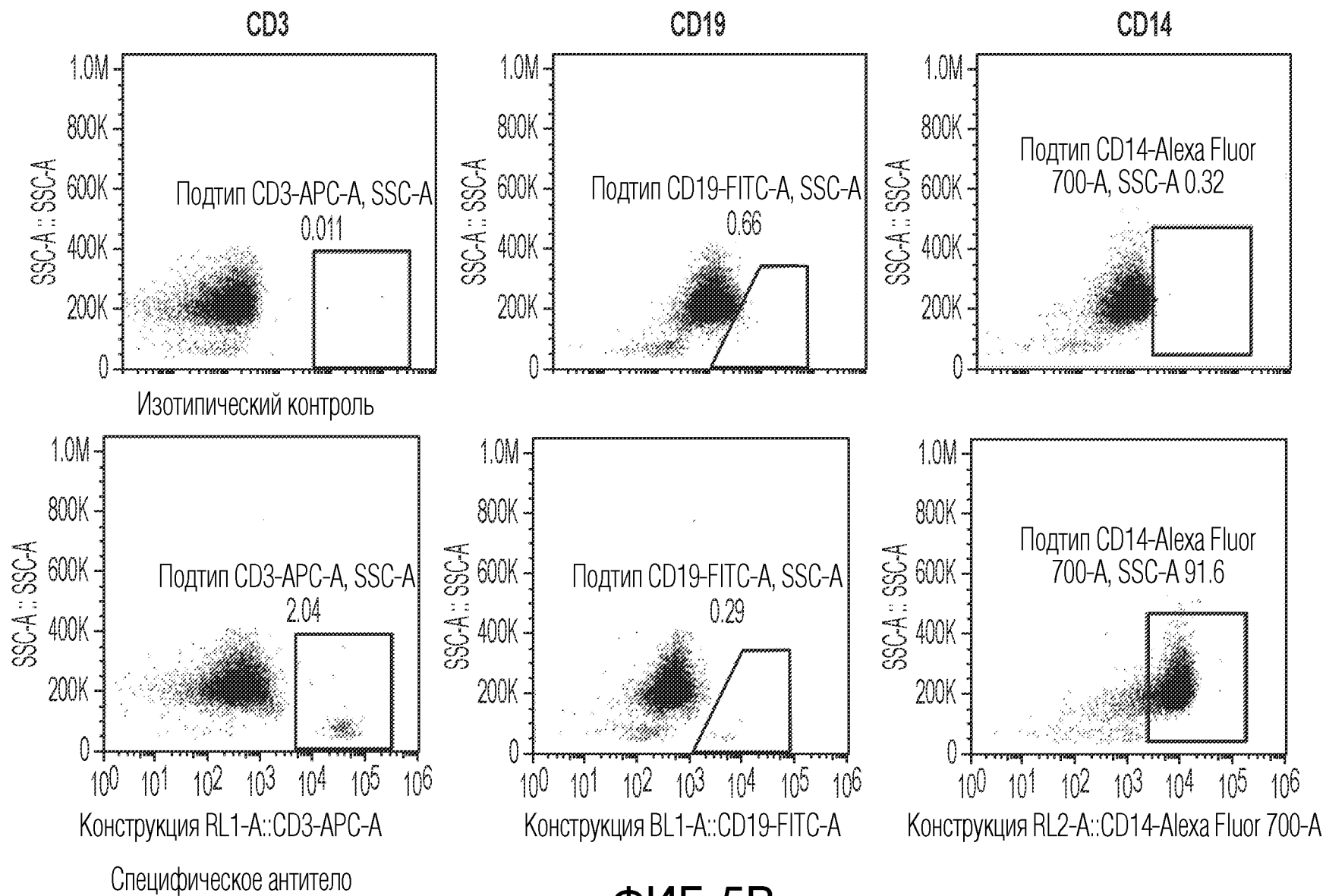
ФИГ. 4



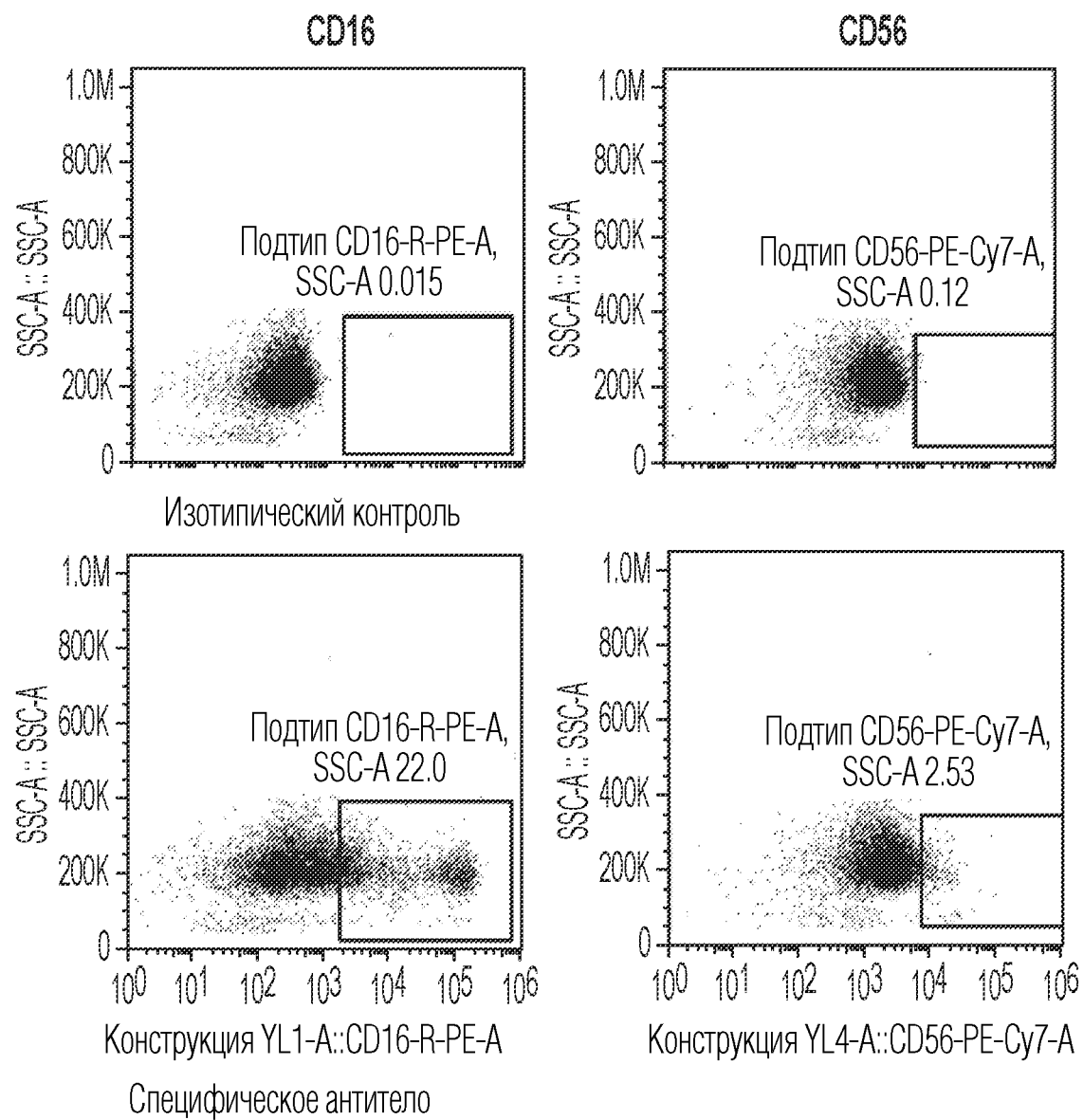
ФИГ. 5А



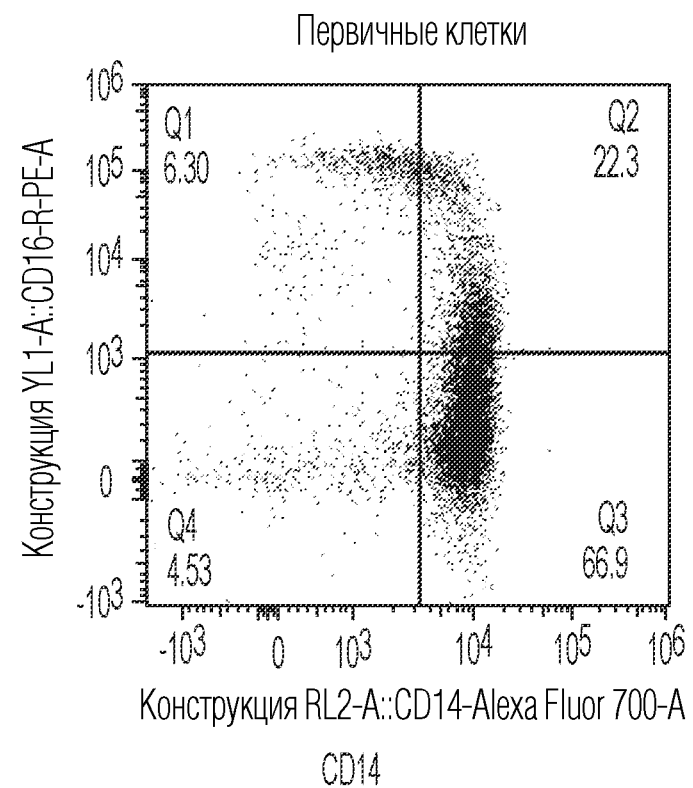
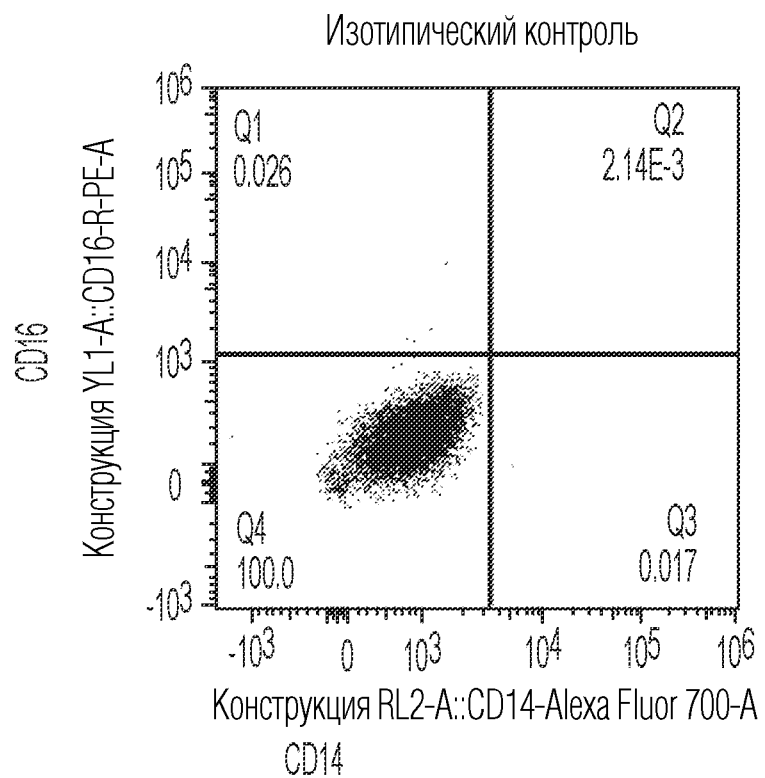
ФИГ. 5А ПРОДОЛЖЕНИЕ



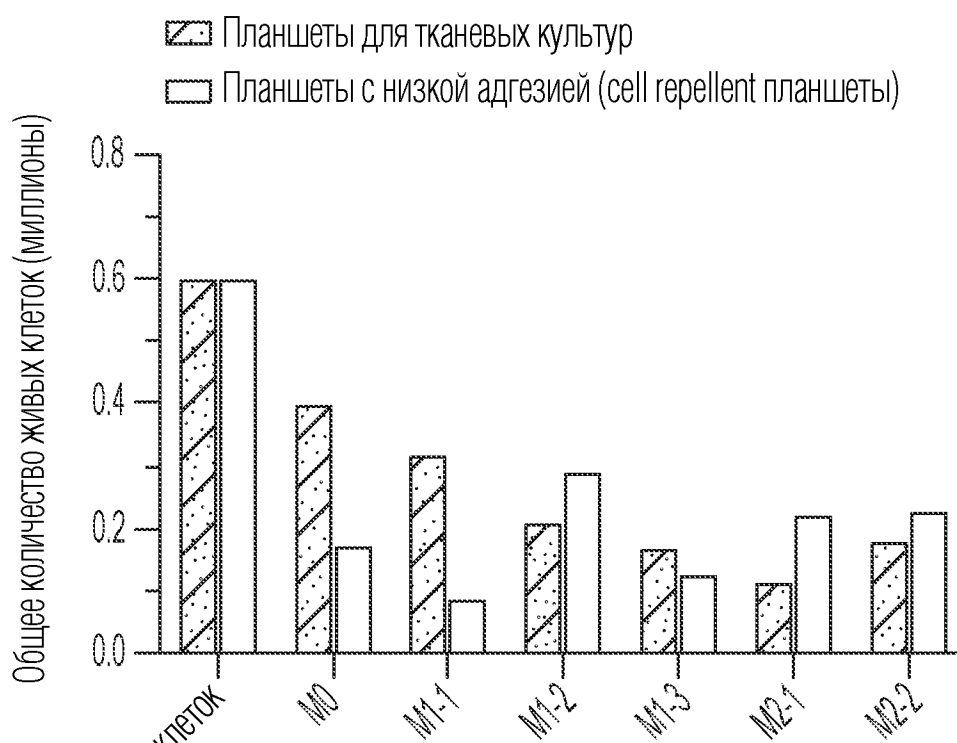
ФИГ. 5В



ФИГ. 5В ПРОДОЛЖЕНИЕ

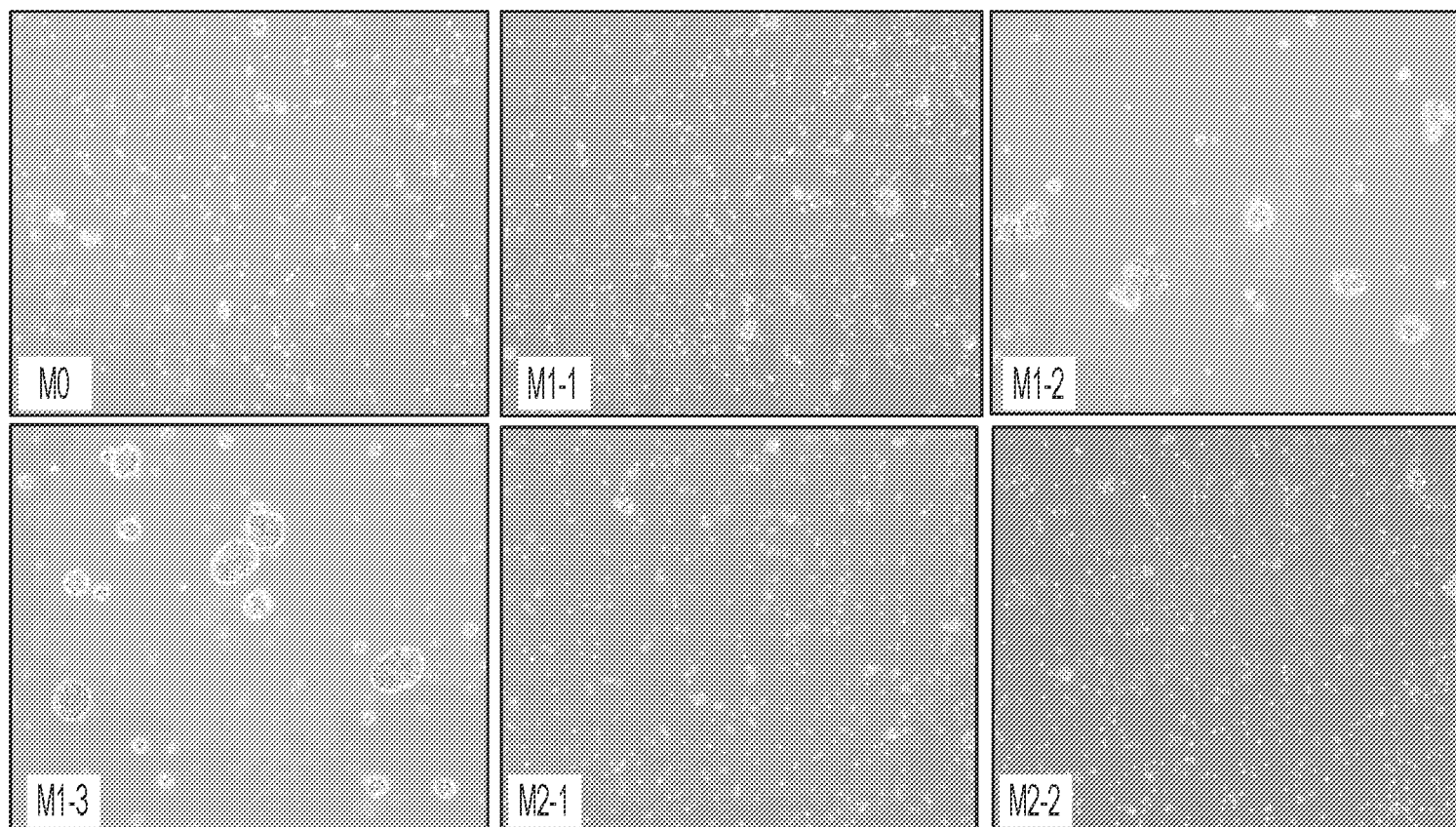


ФИГ. 6

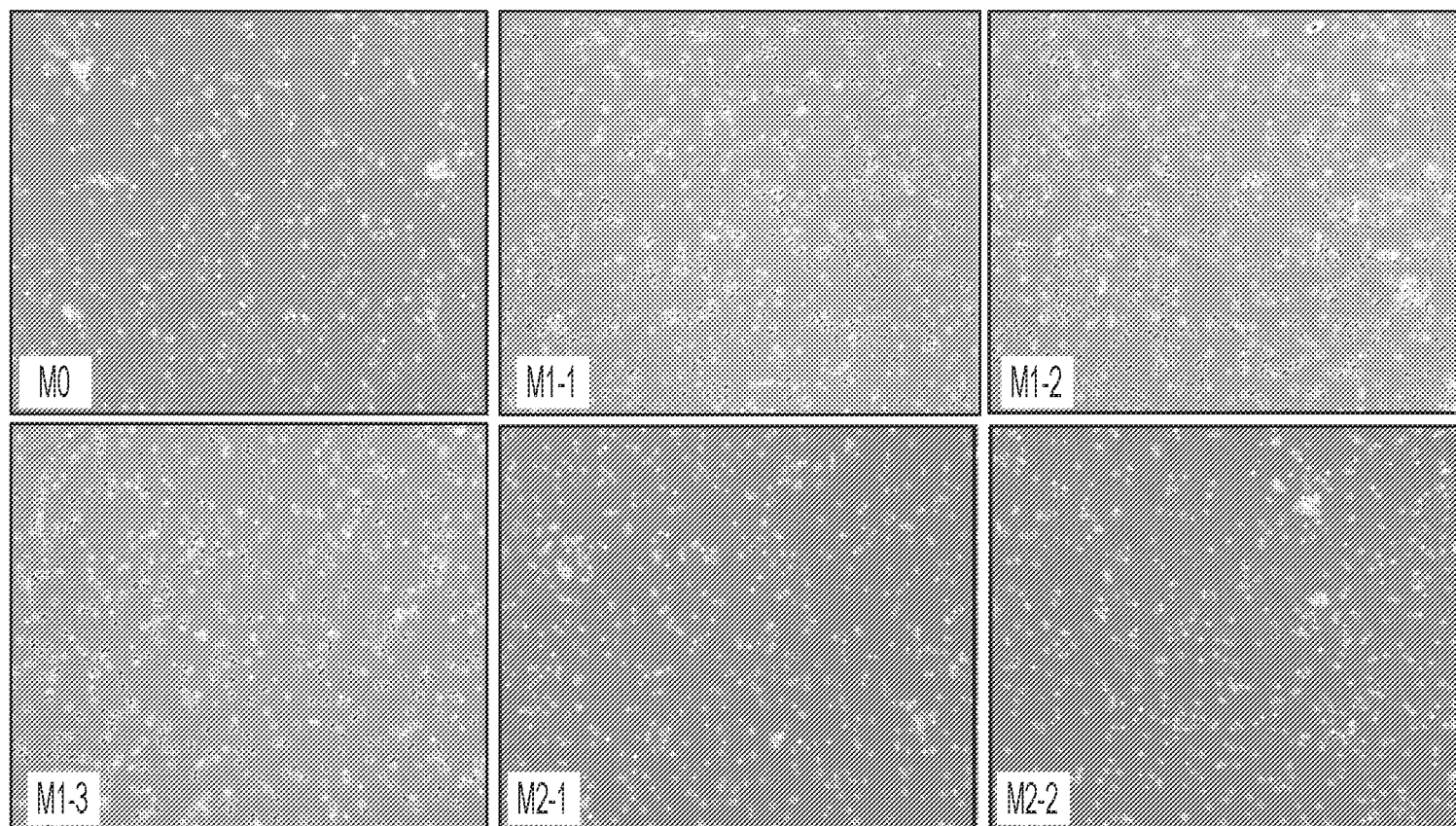


ФИГ. 7

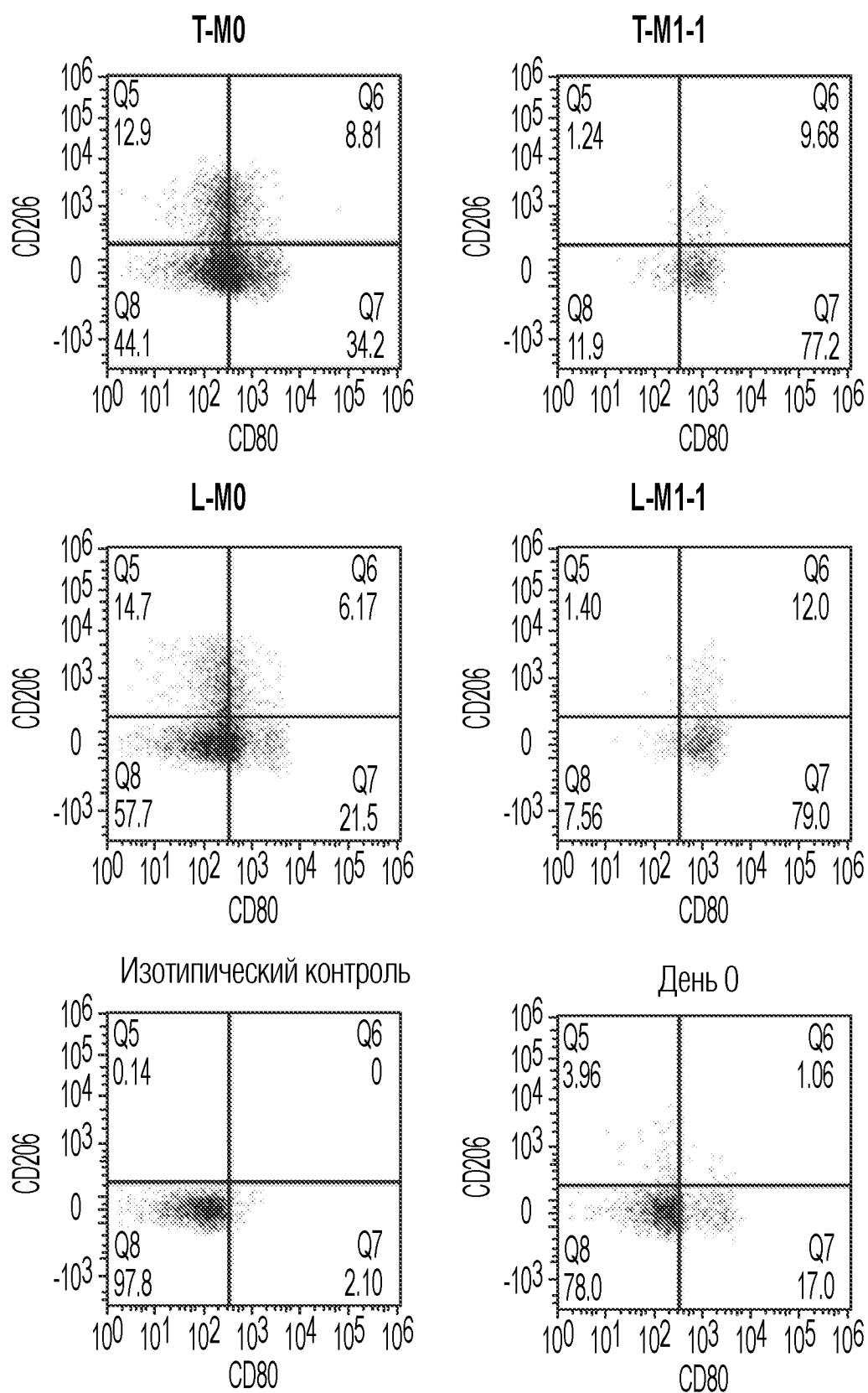
Исходное общее количество клеток



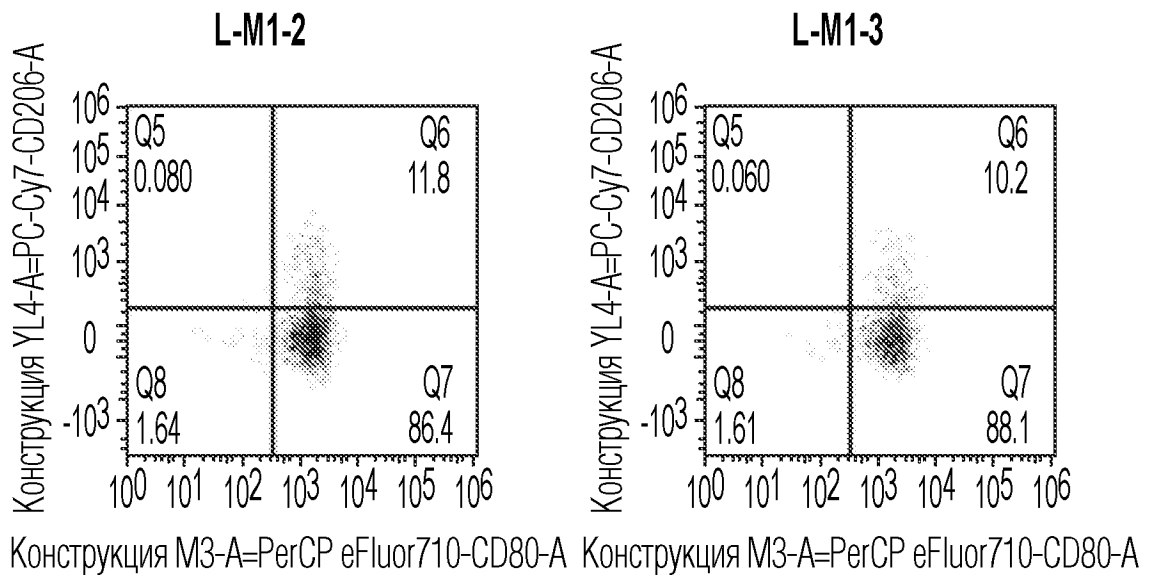
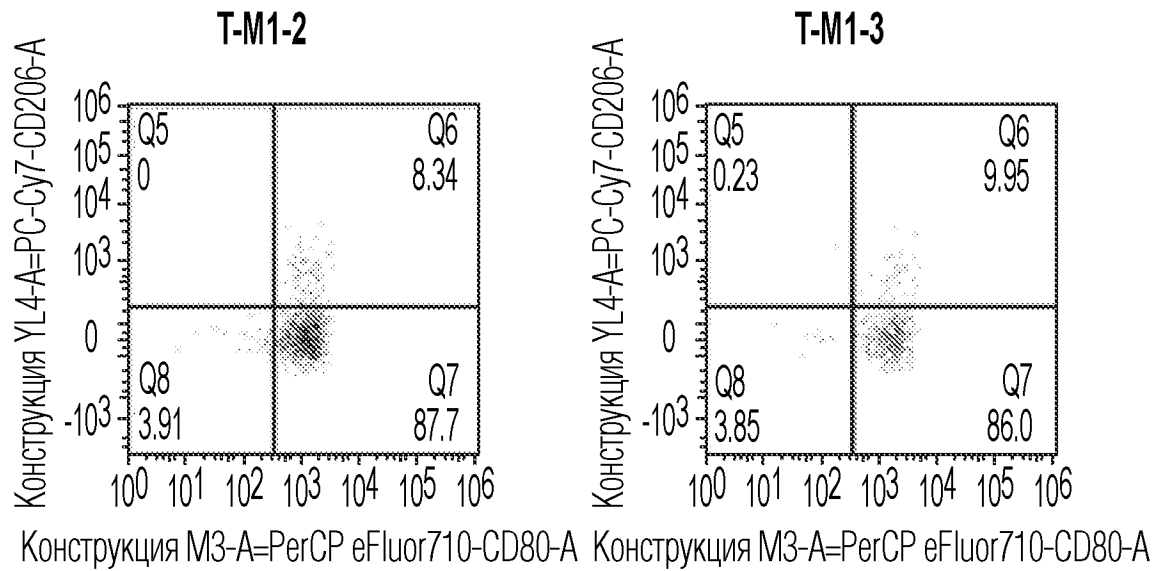
ФИГ. 8А



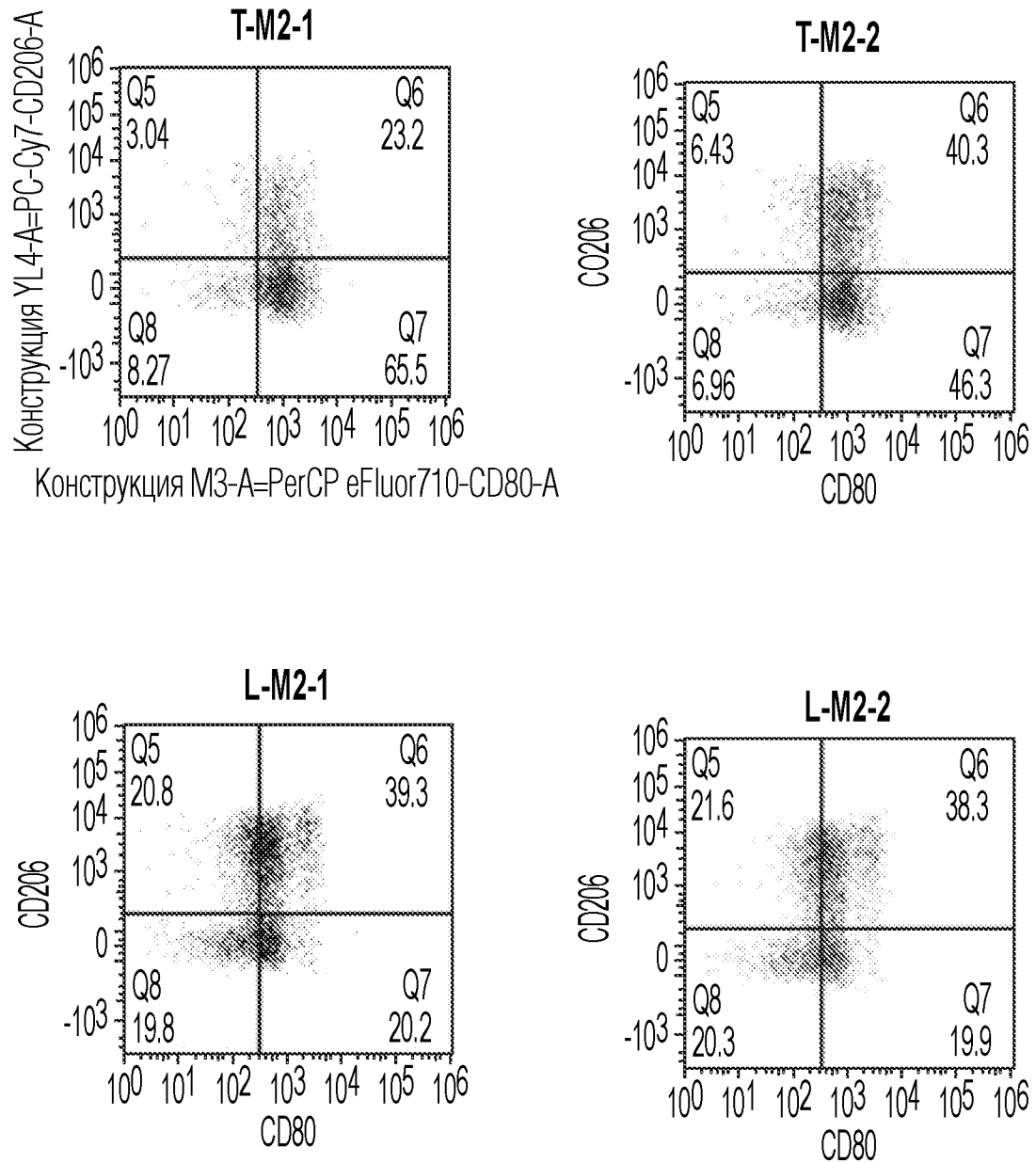
ФИГ. 8В



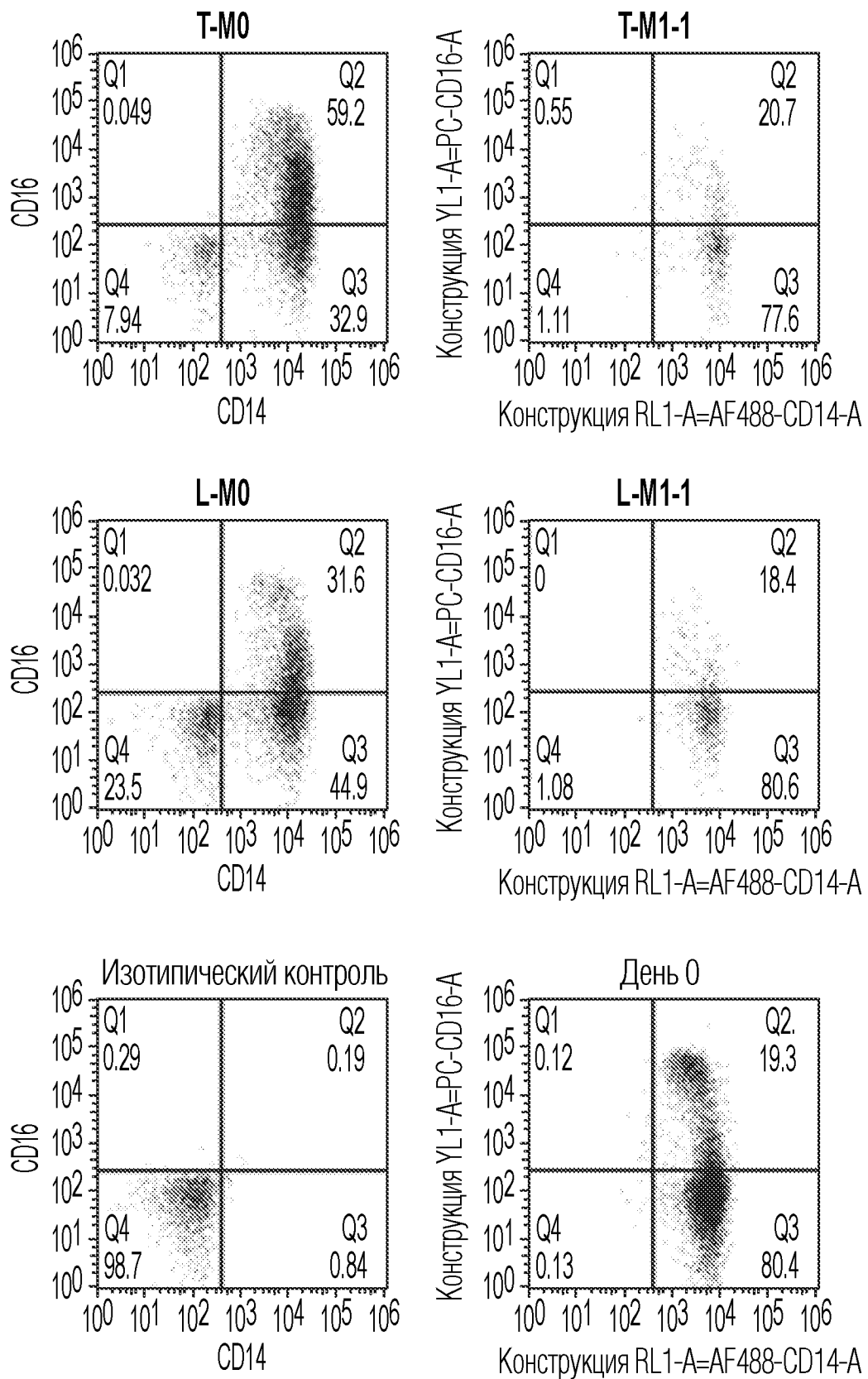
ФИГ. 9А



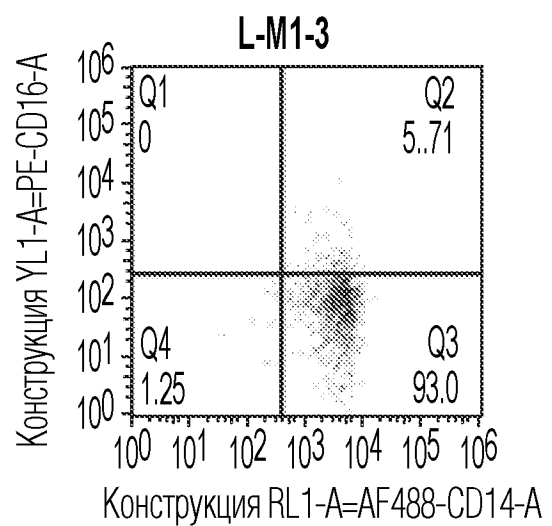
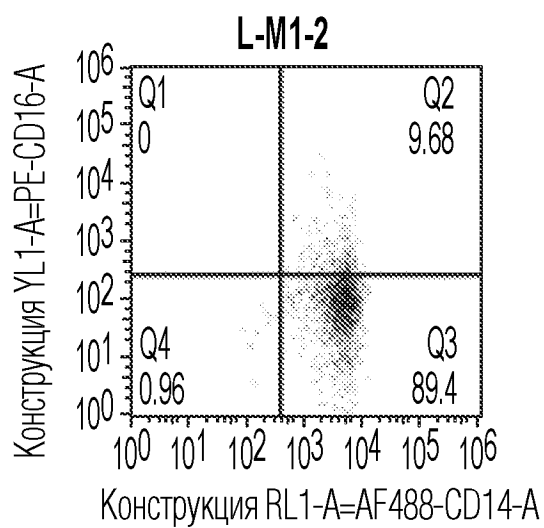
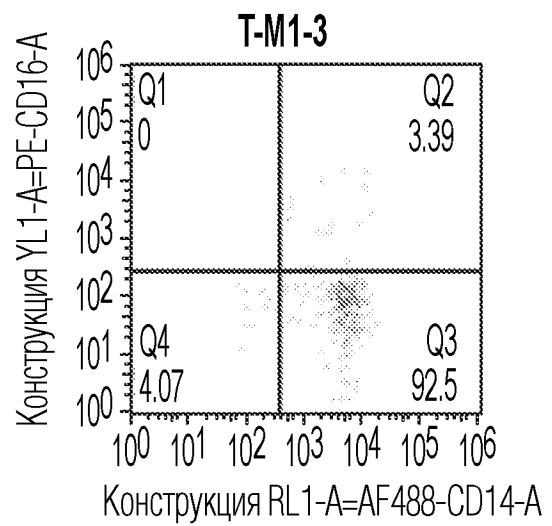
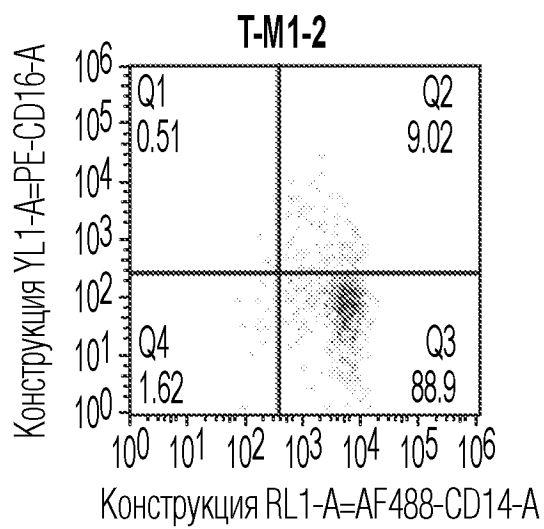
ФИГ. 9А ПРОДОЛЖЕНИЕ



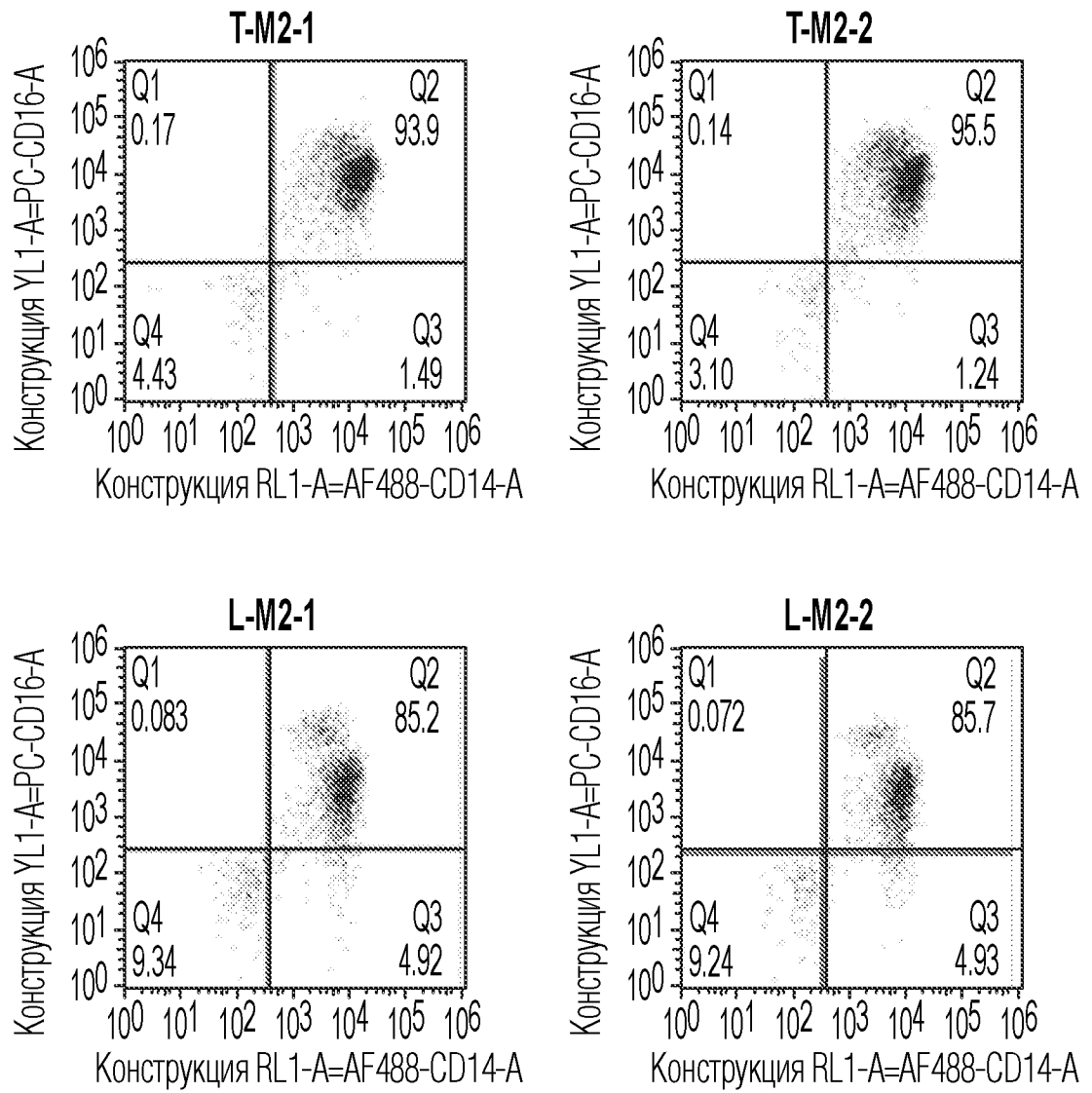
ФИГ. 9А ПРОДОЛЖЕНИЕ



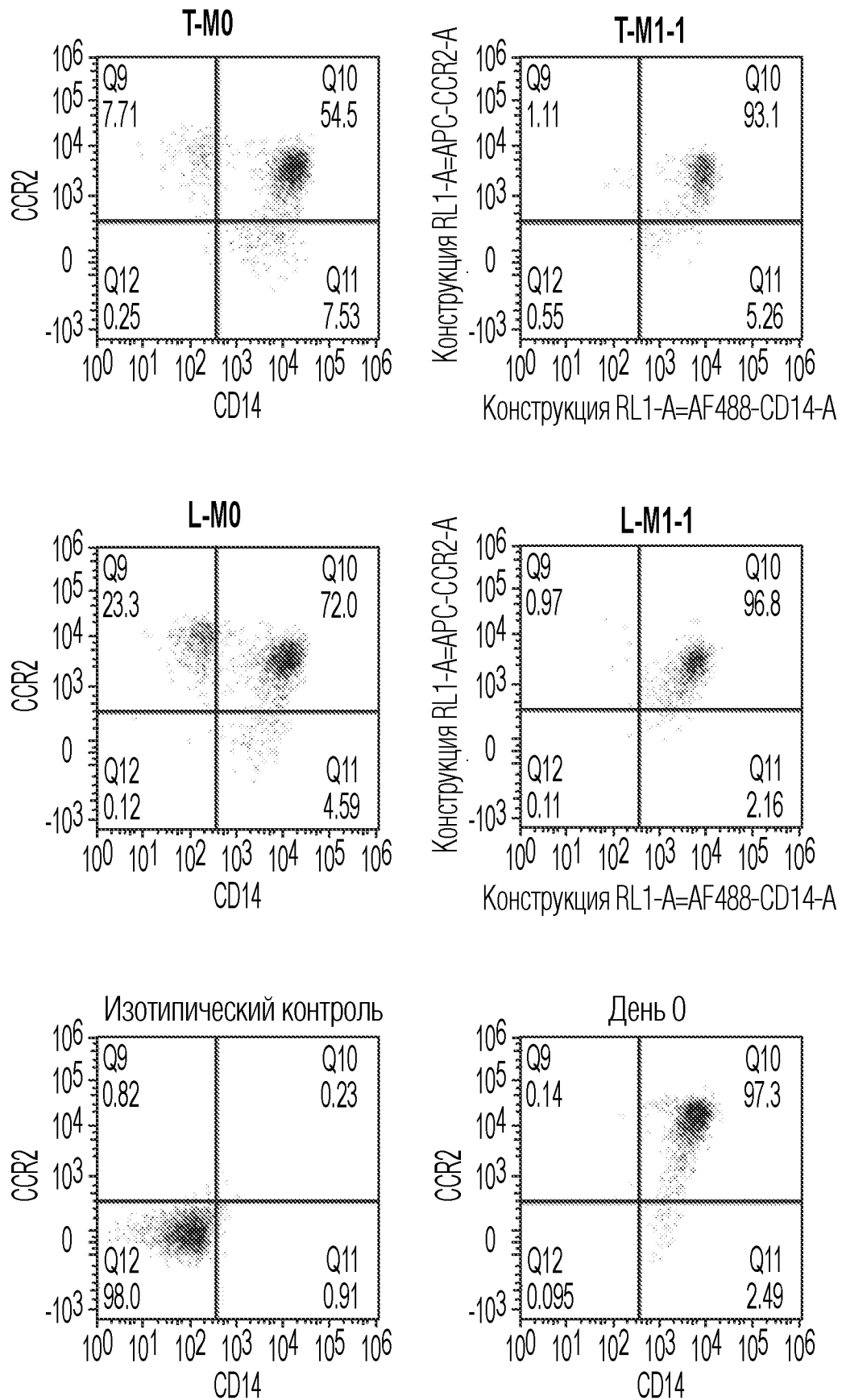
ФИГ. 9В



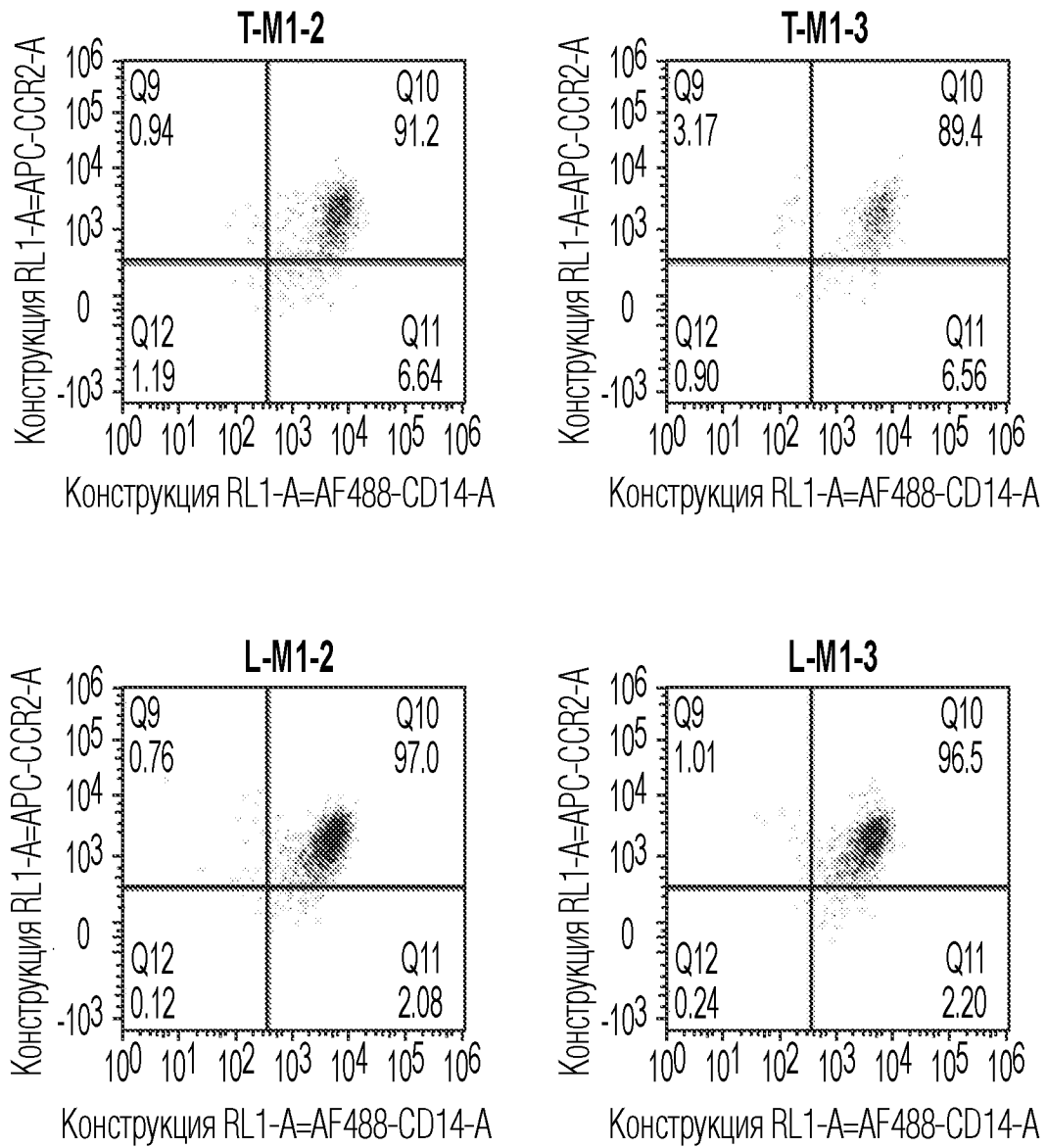
ФИГ. 9В ПРОДОЛЖЕНИЕ



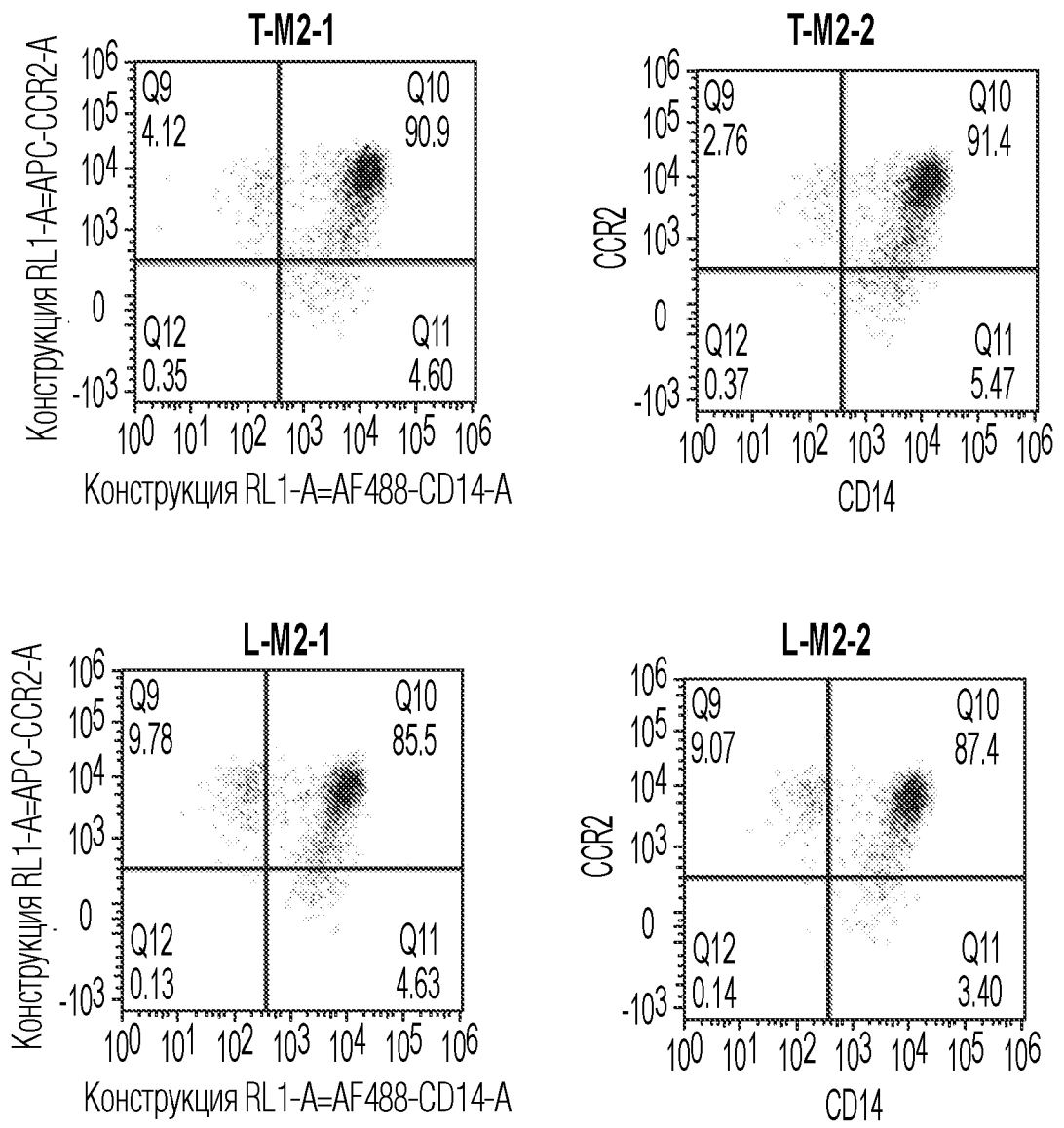
ФИГ. 9В ПРОДОЛЖЕНИЕ



ФИГ. 9С

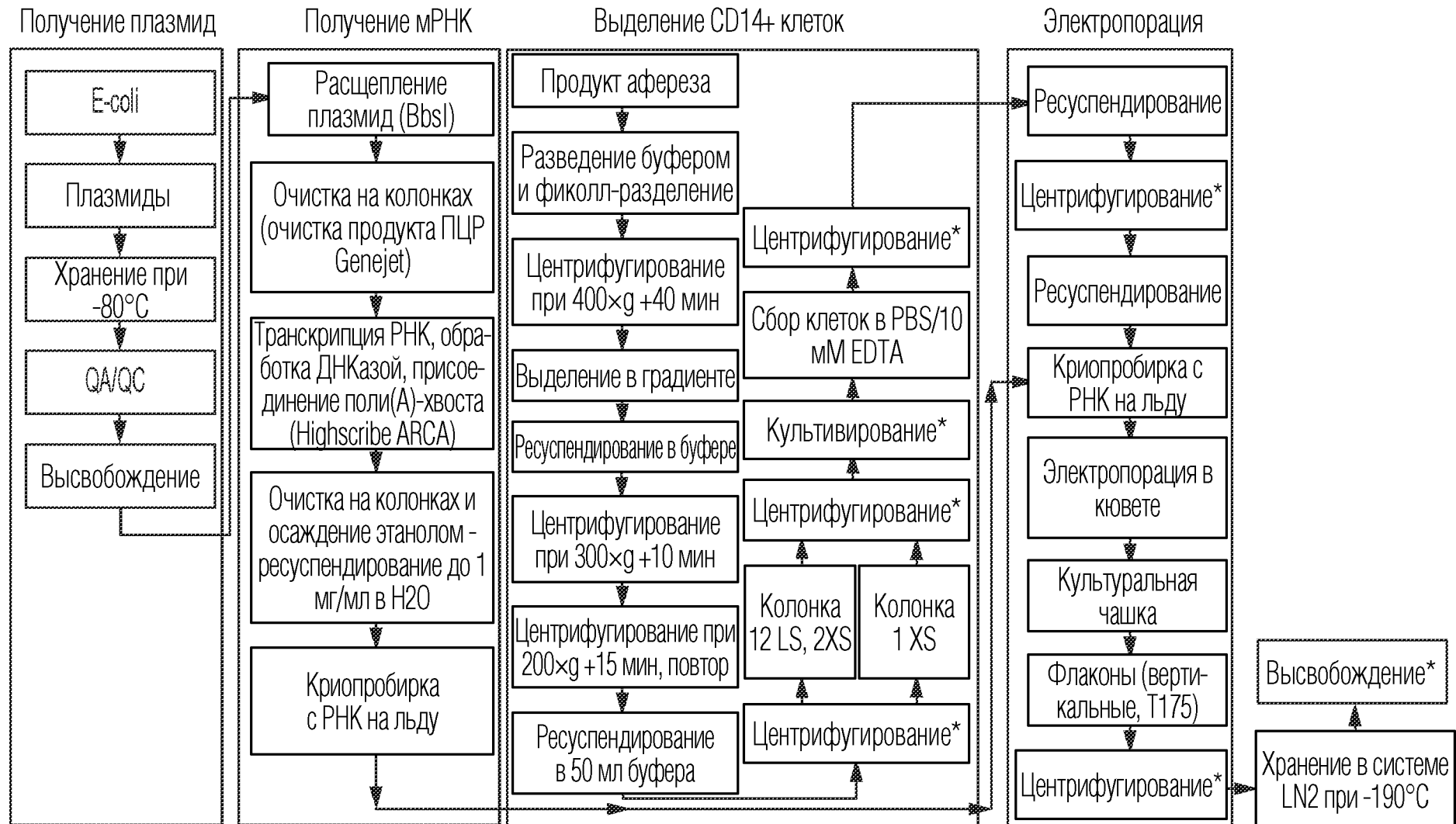


ФИГ. 9С ПРОДОЛЖЕНИЕ



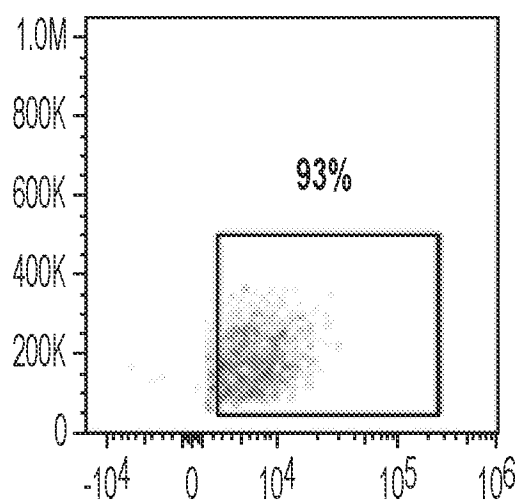
ФИГ. 9С ПРОДОЛЖЕНИЕ

Процесс, разработанный для выделения CD14+CD16- клеток

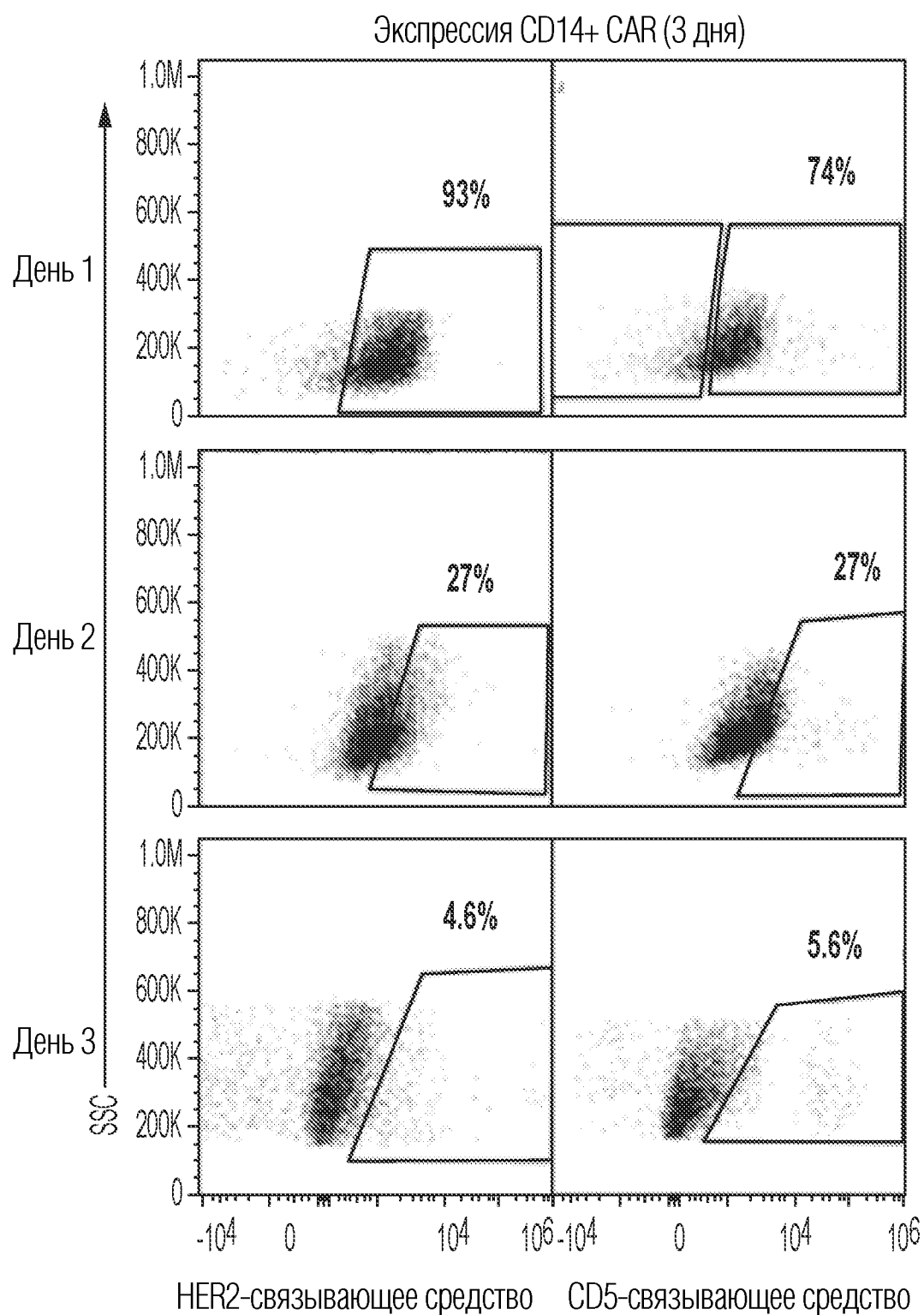


ФИГ. 10

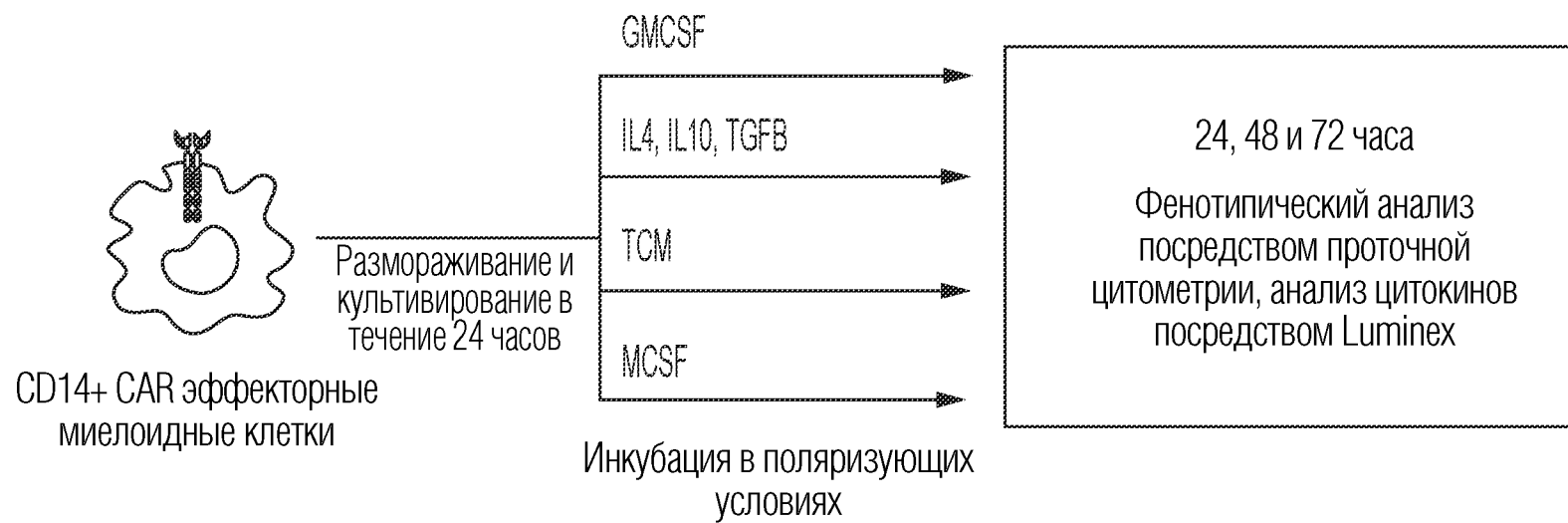
Клетки THP1 через 72 часа, >90%



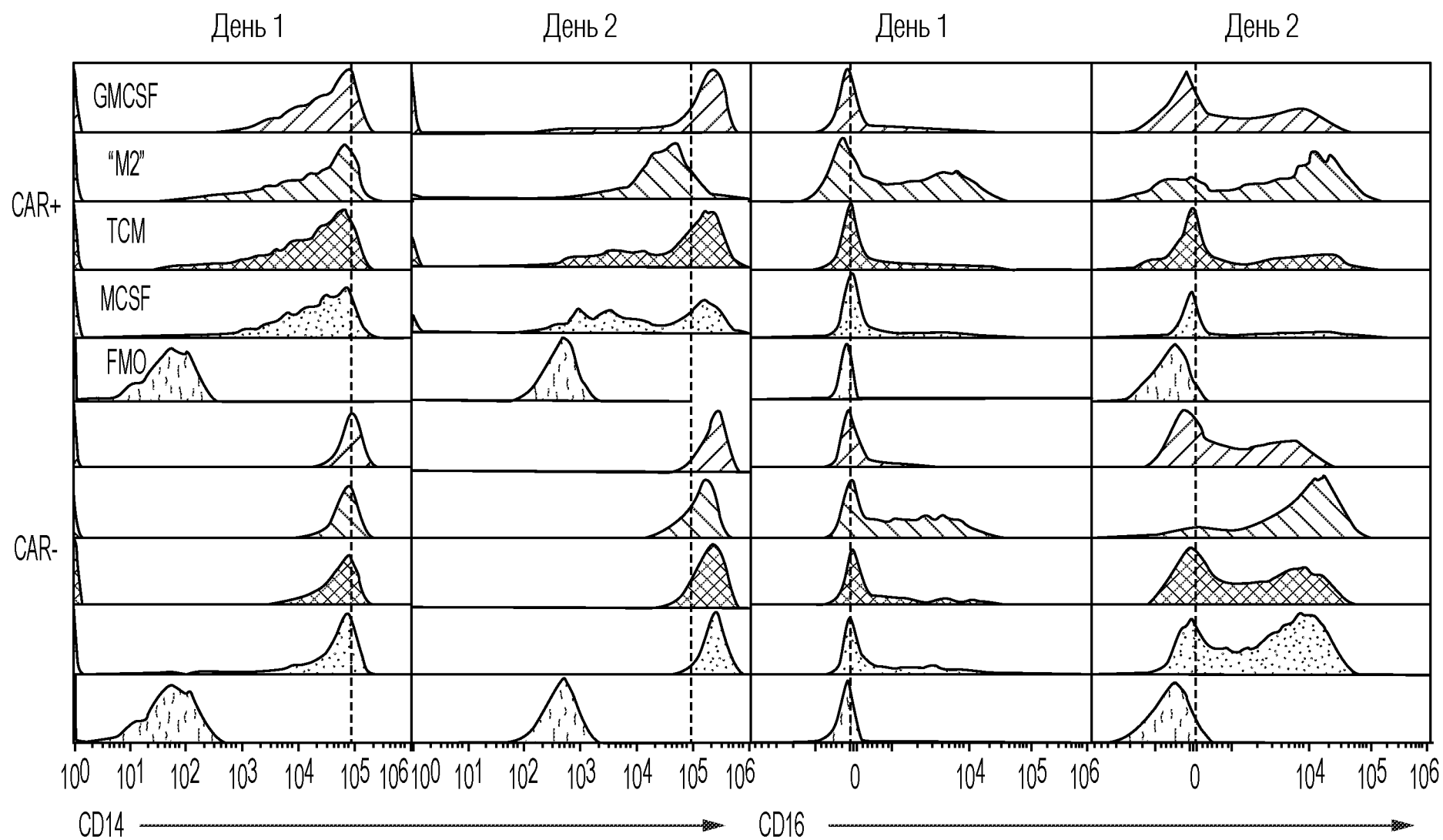
ФИГ. 11



ФИГ. 11 ПРОДОЛЖЕНИЕ

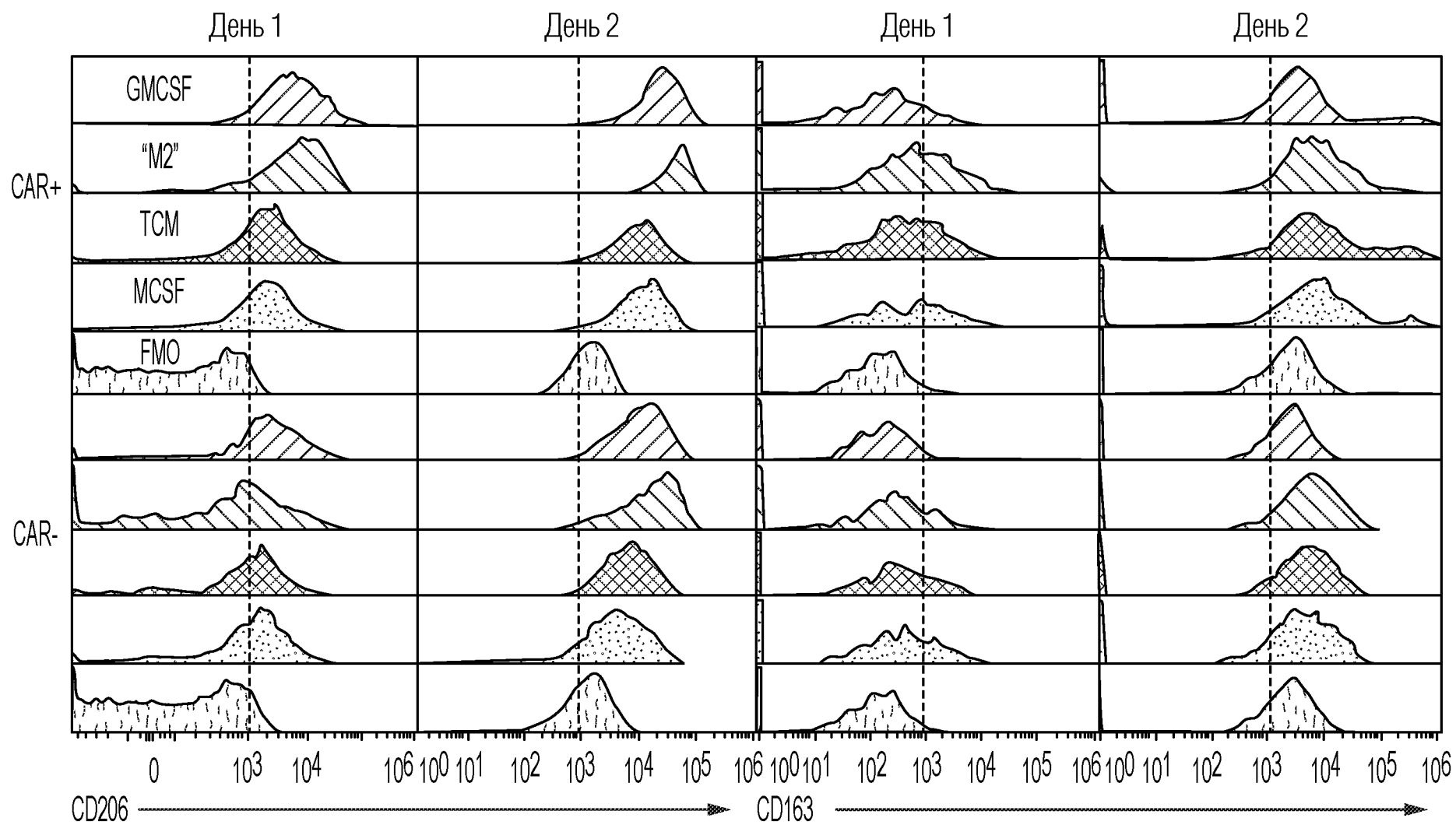


ФИГ. 12



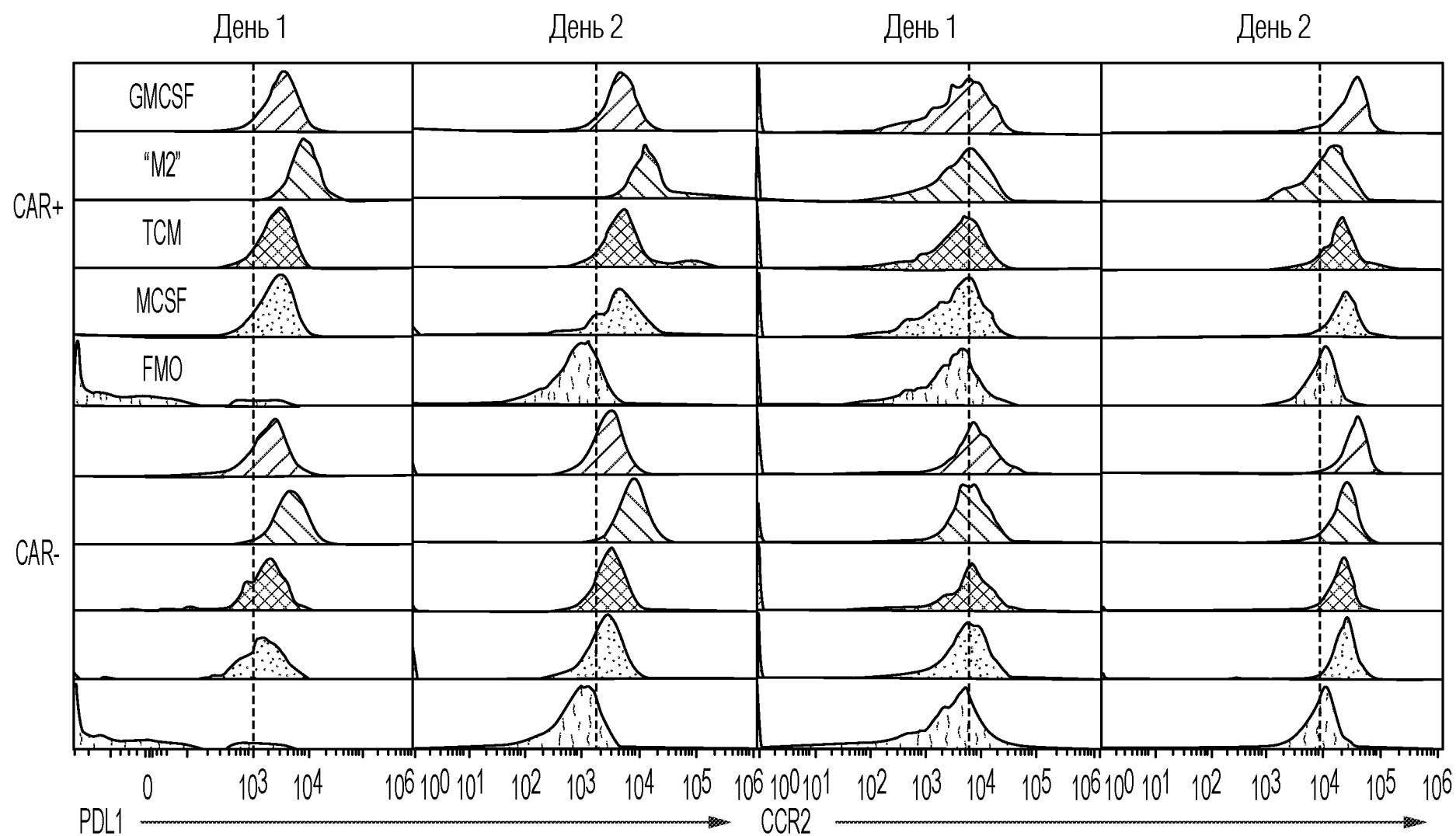
26/81

ФИГ. 13А



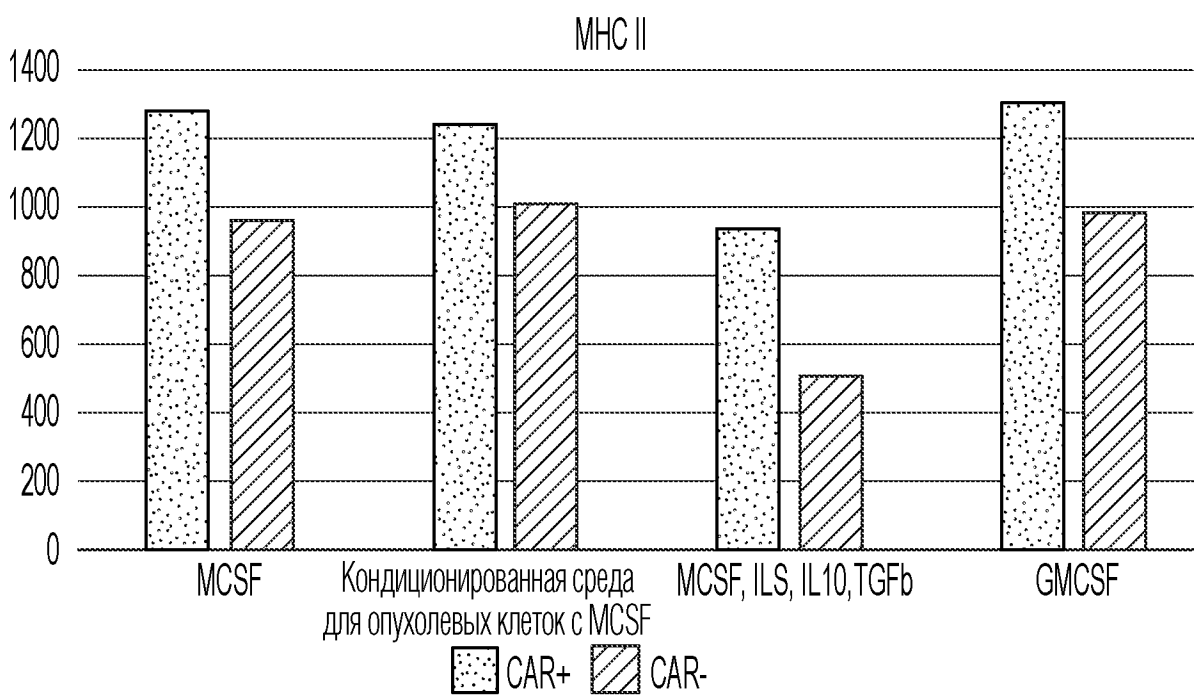
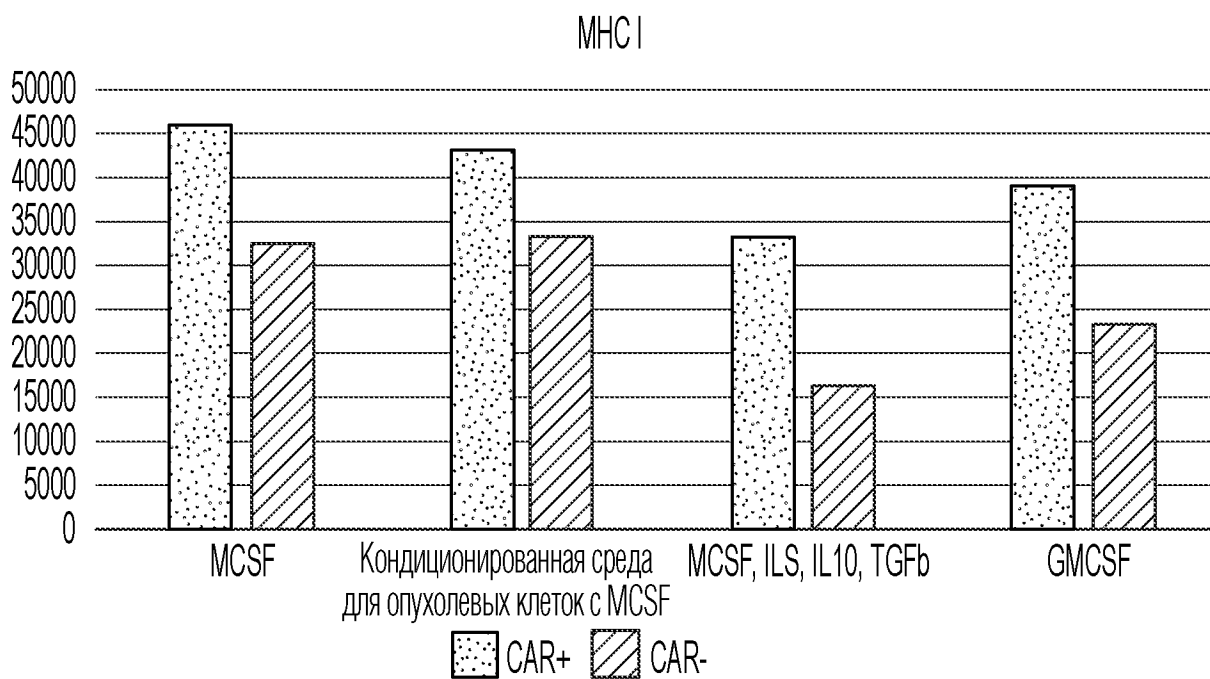
27/81

ФИГ. 13В



28/81

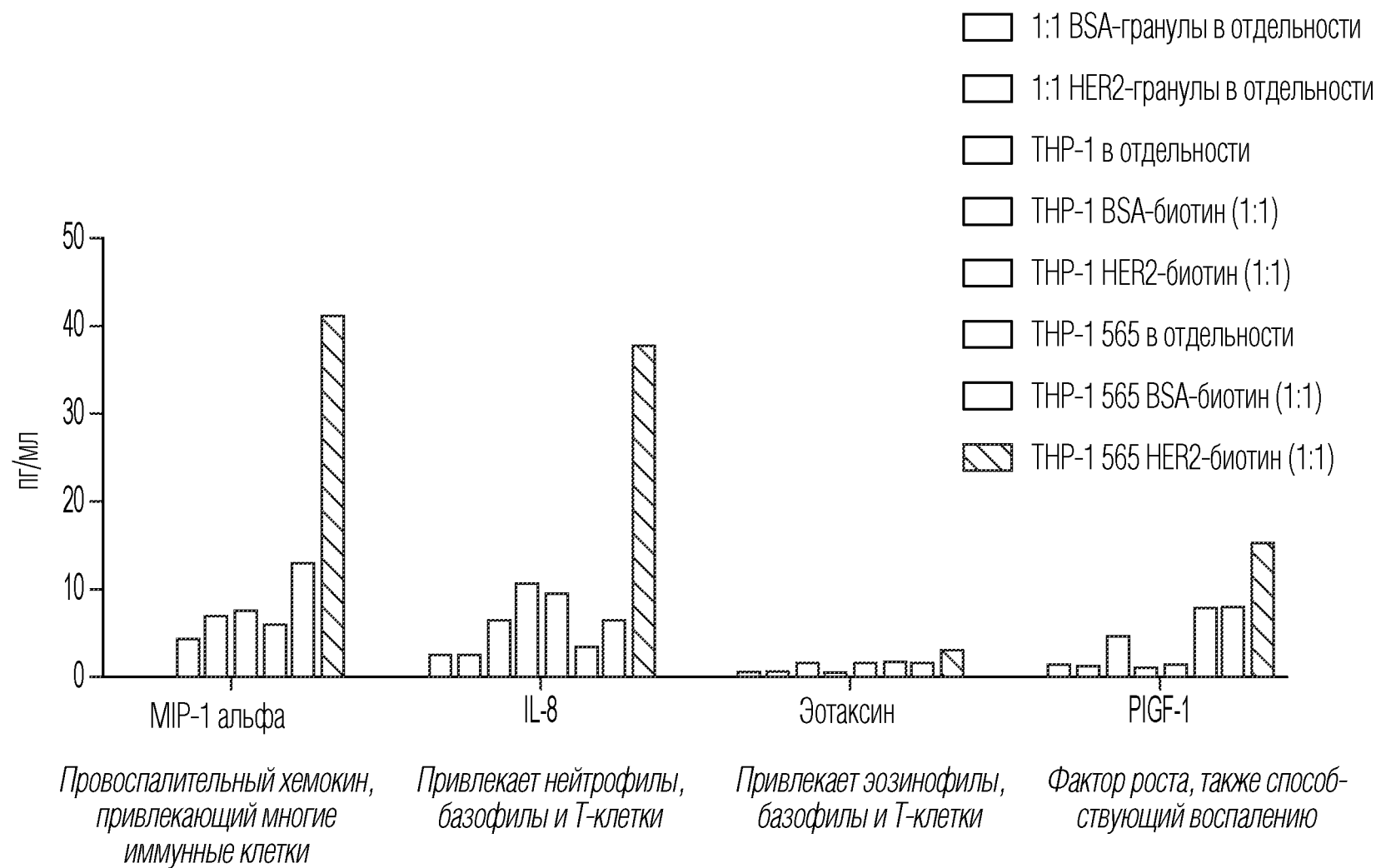
ФИГ. 13С



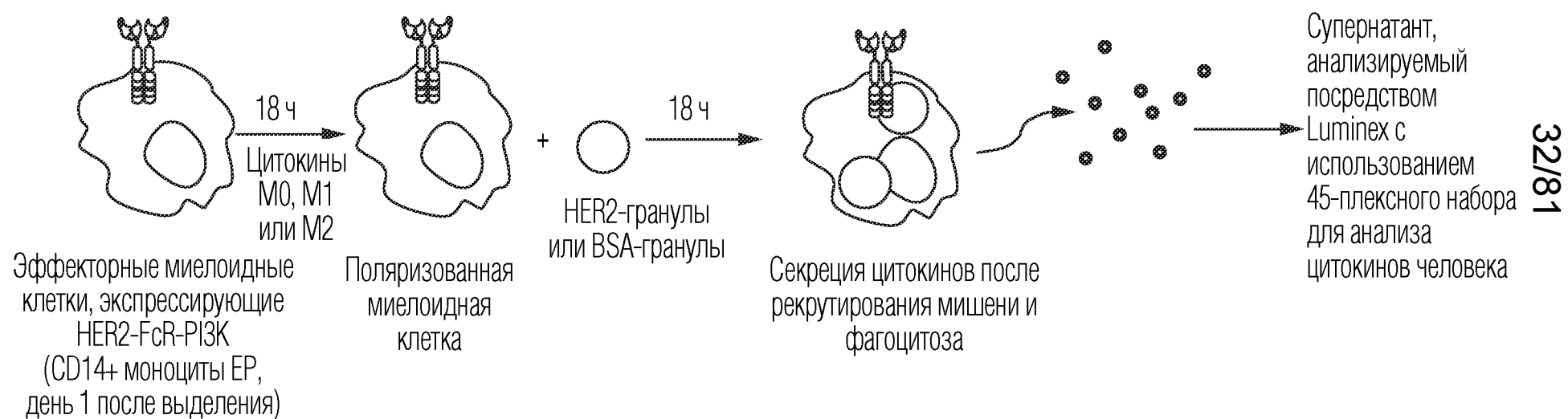
ФИГ. 13D



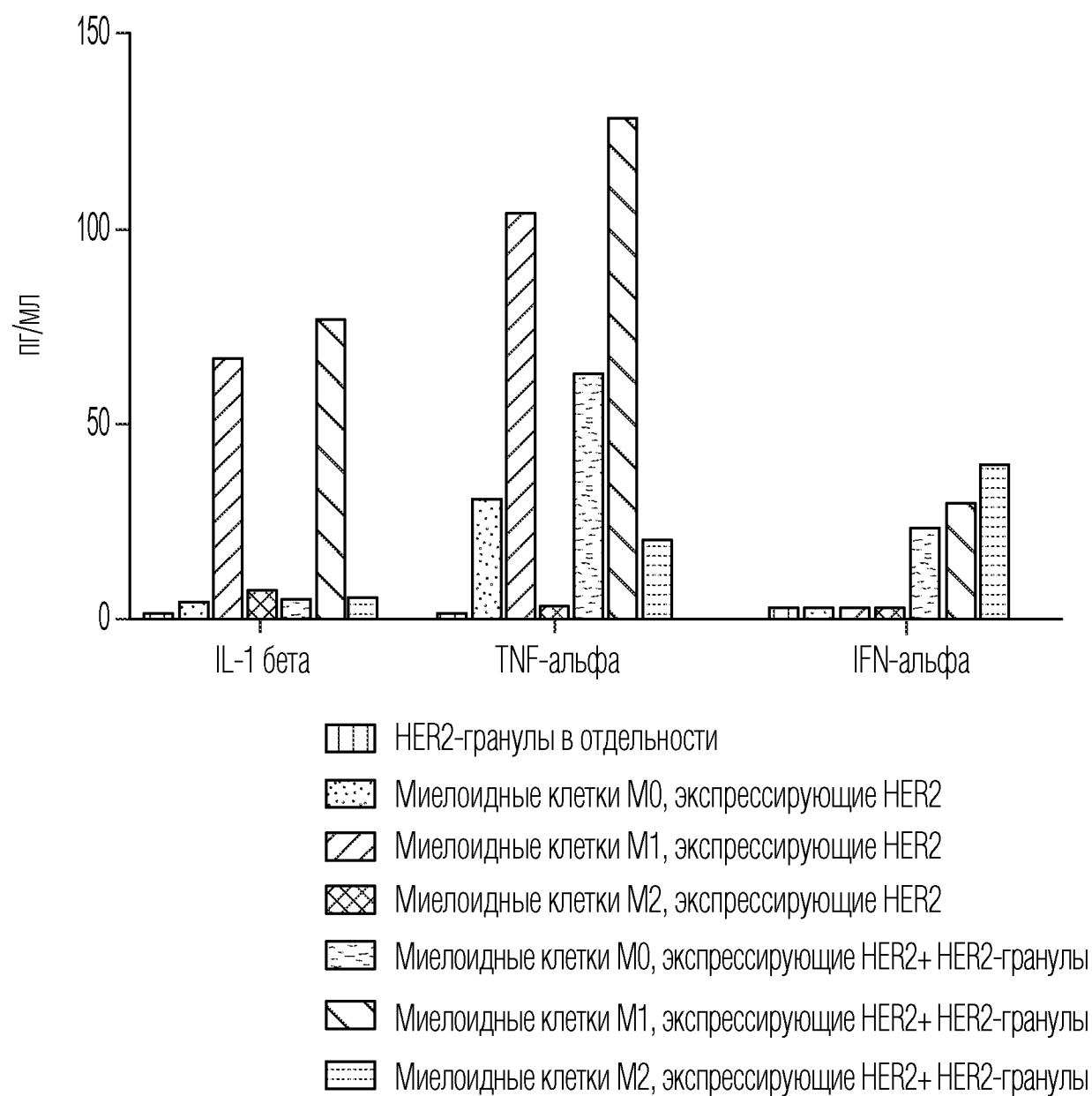
ФИГ. 14А



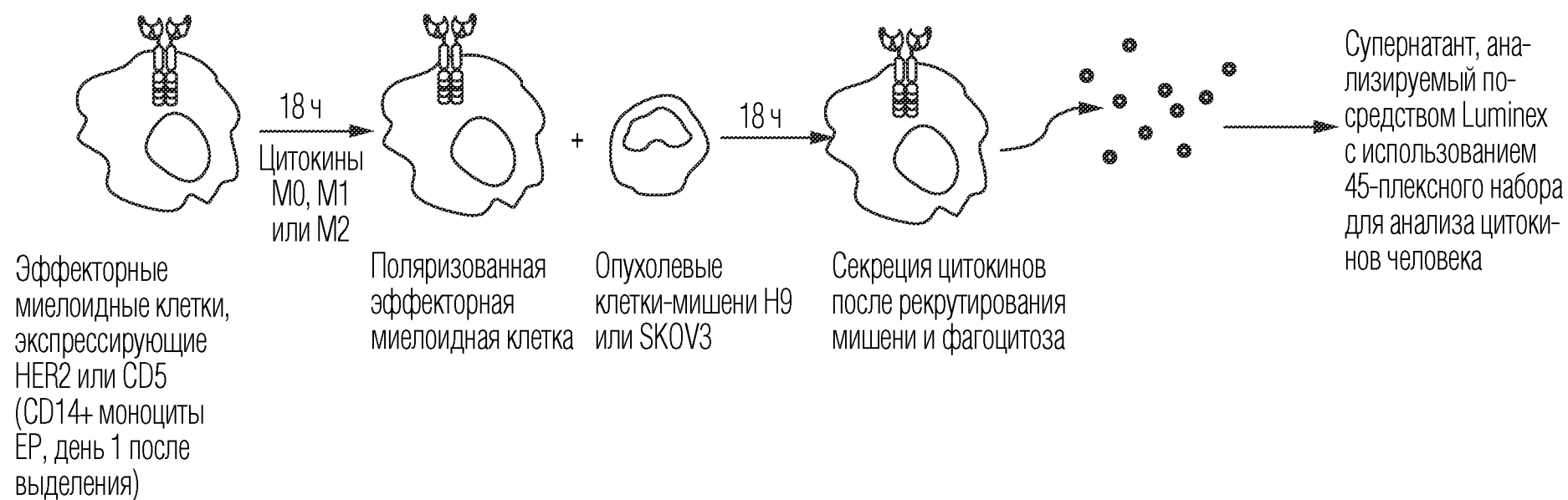
ФИГ. 14В



ФИГ. 14С

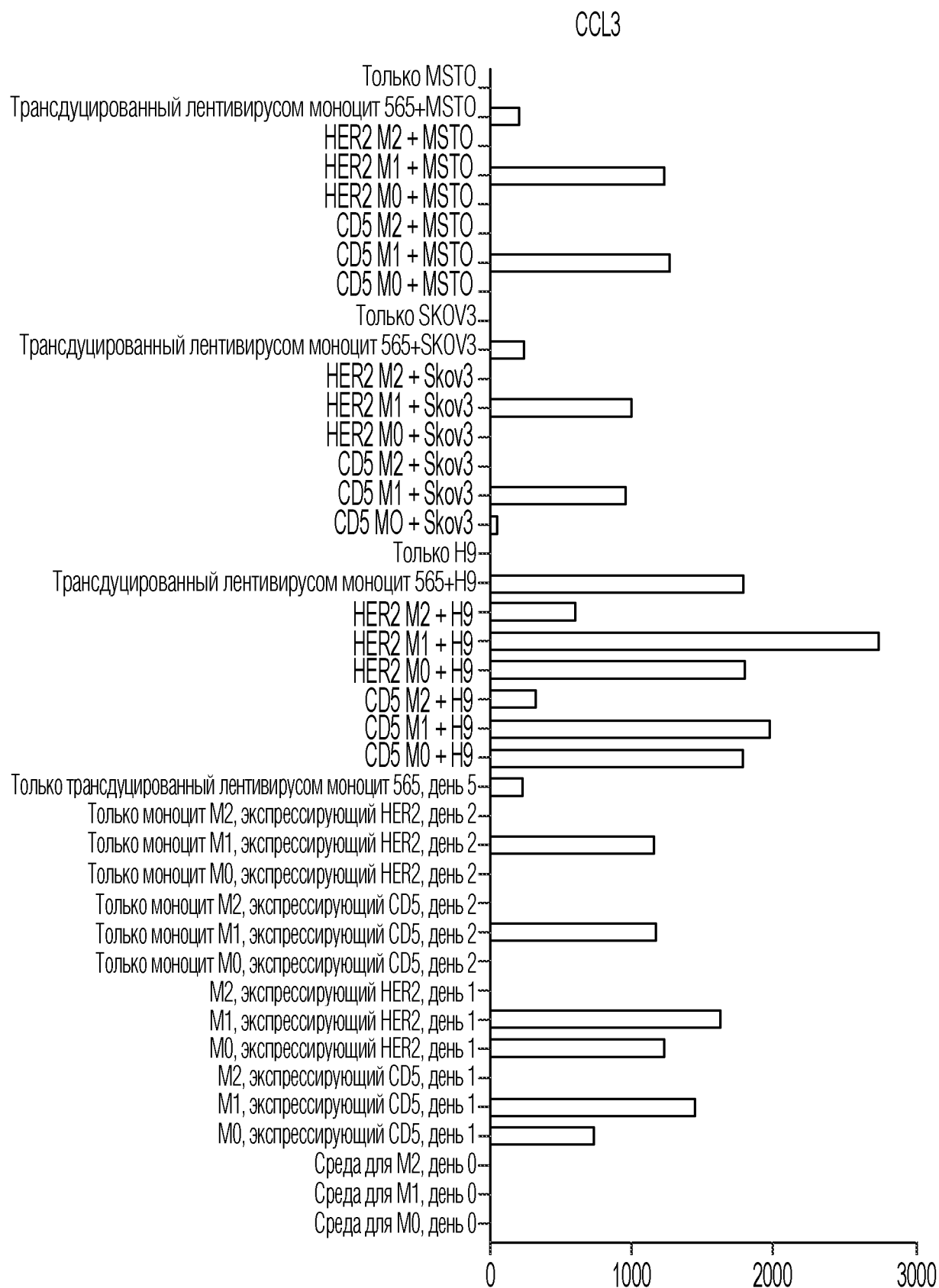


ФИГ. 14D

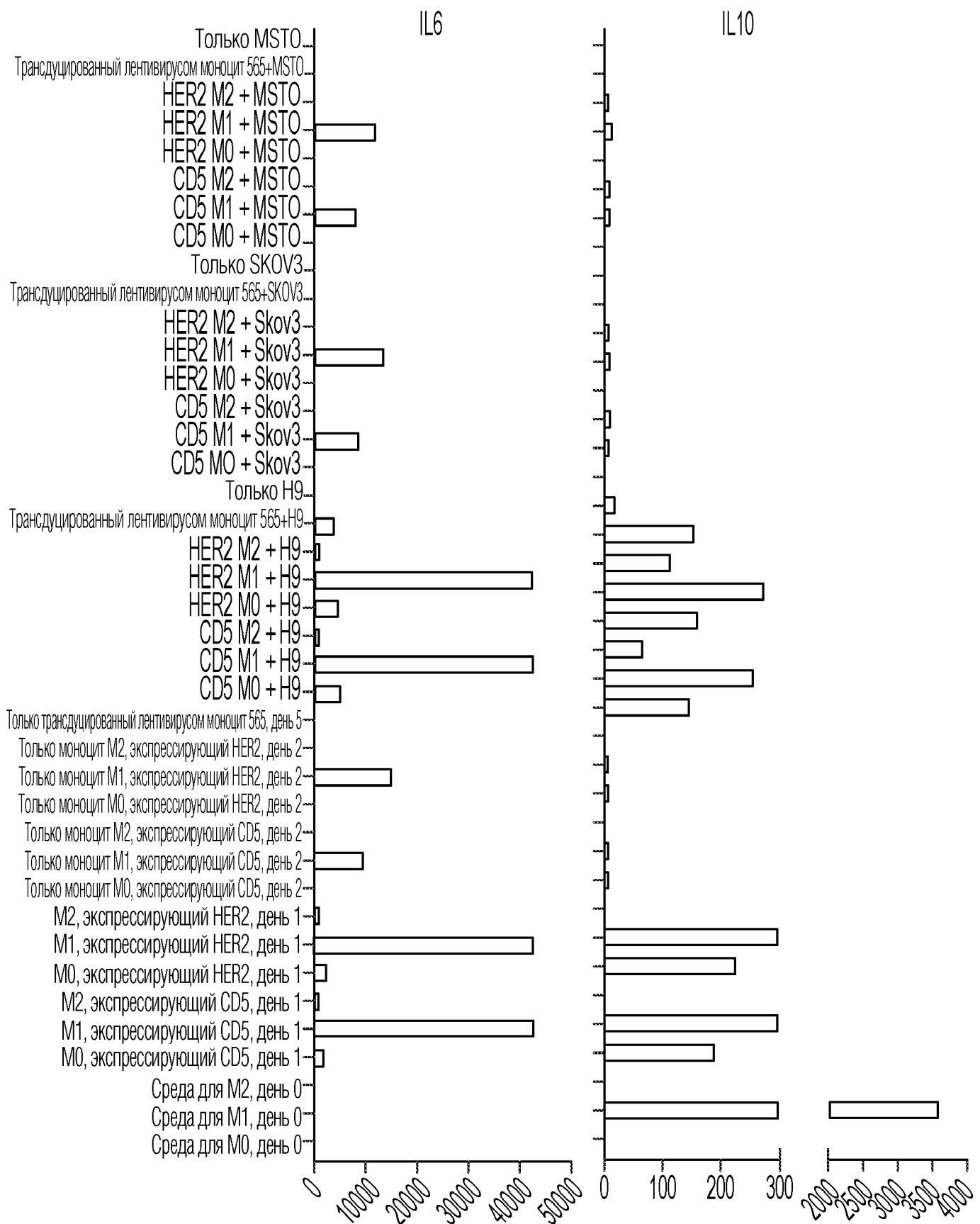


34/81

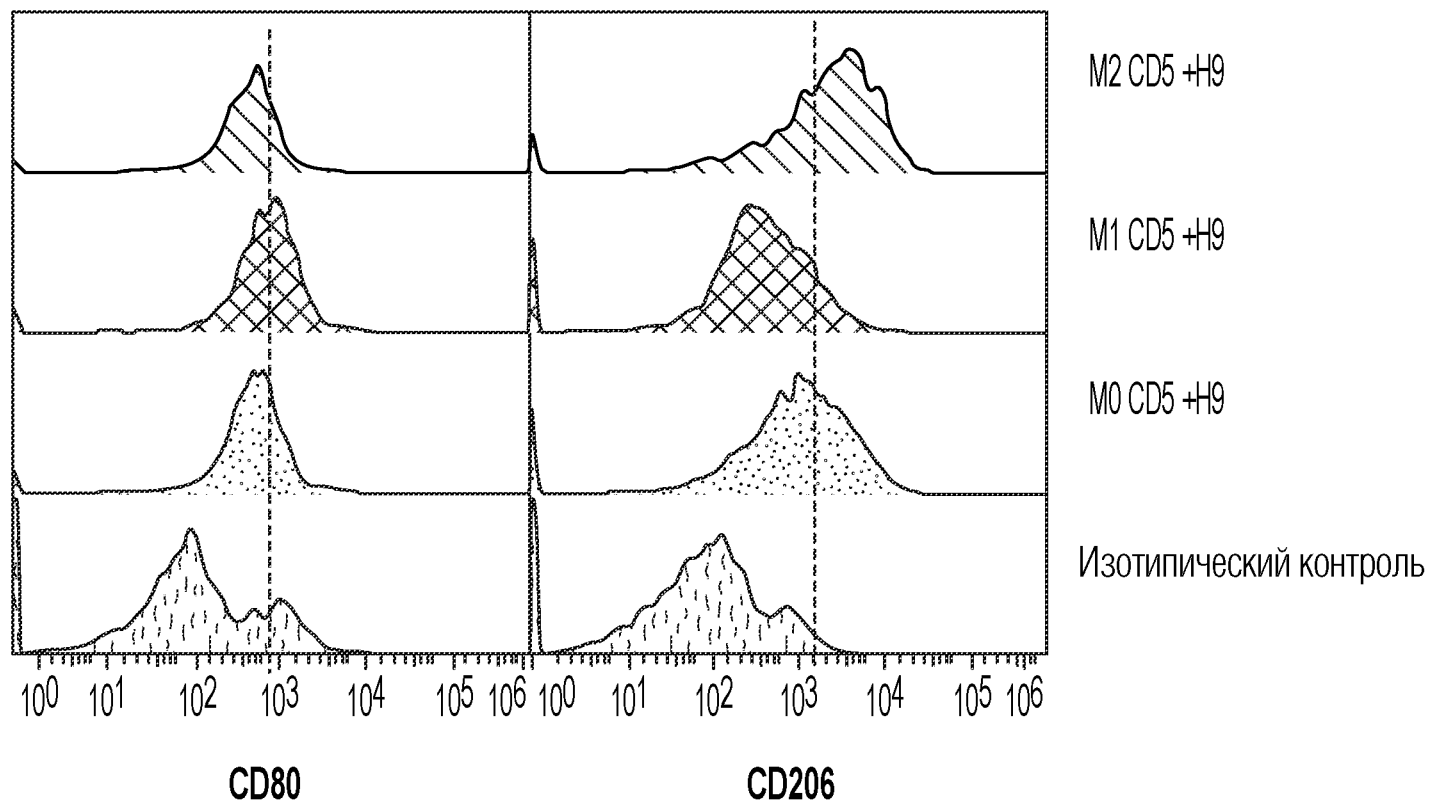
ФИГ. 15А



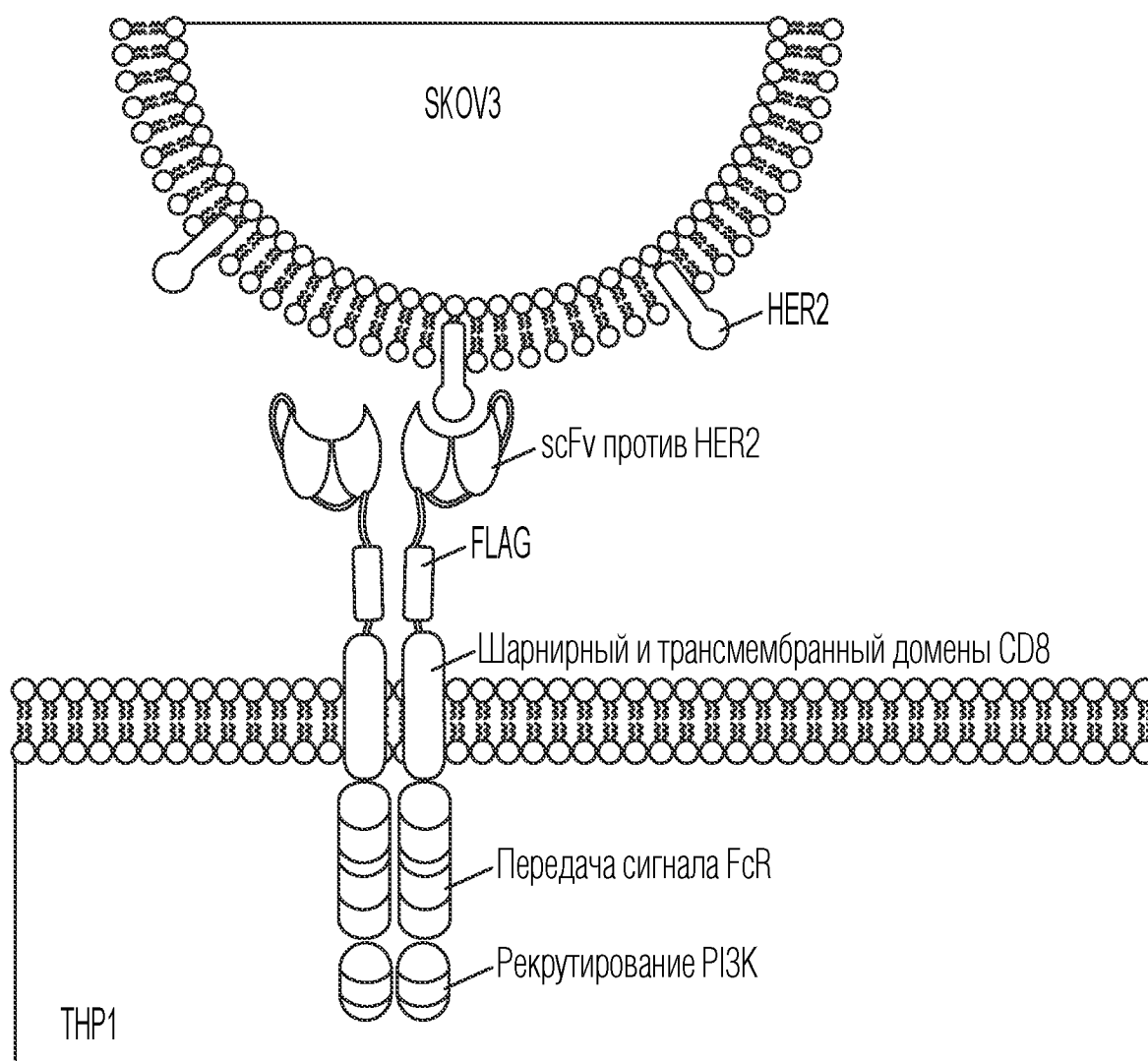
ФИГ. 15Bi



ФИГ. 15Ві ПРОДОЛЖЕНИЕ

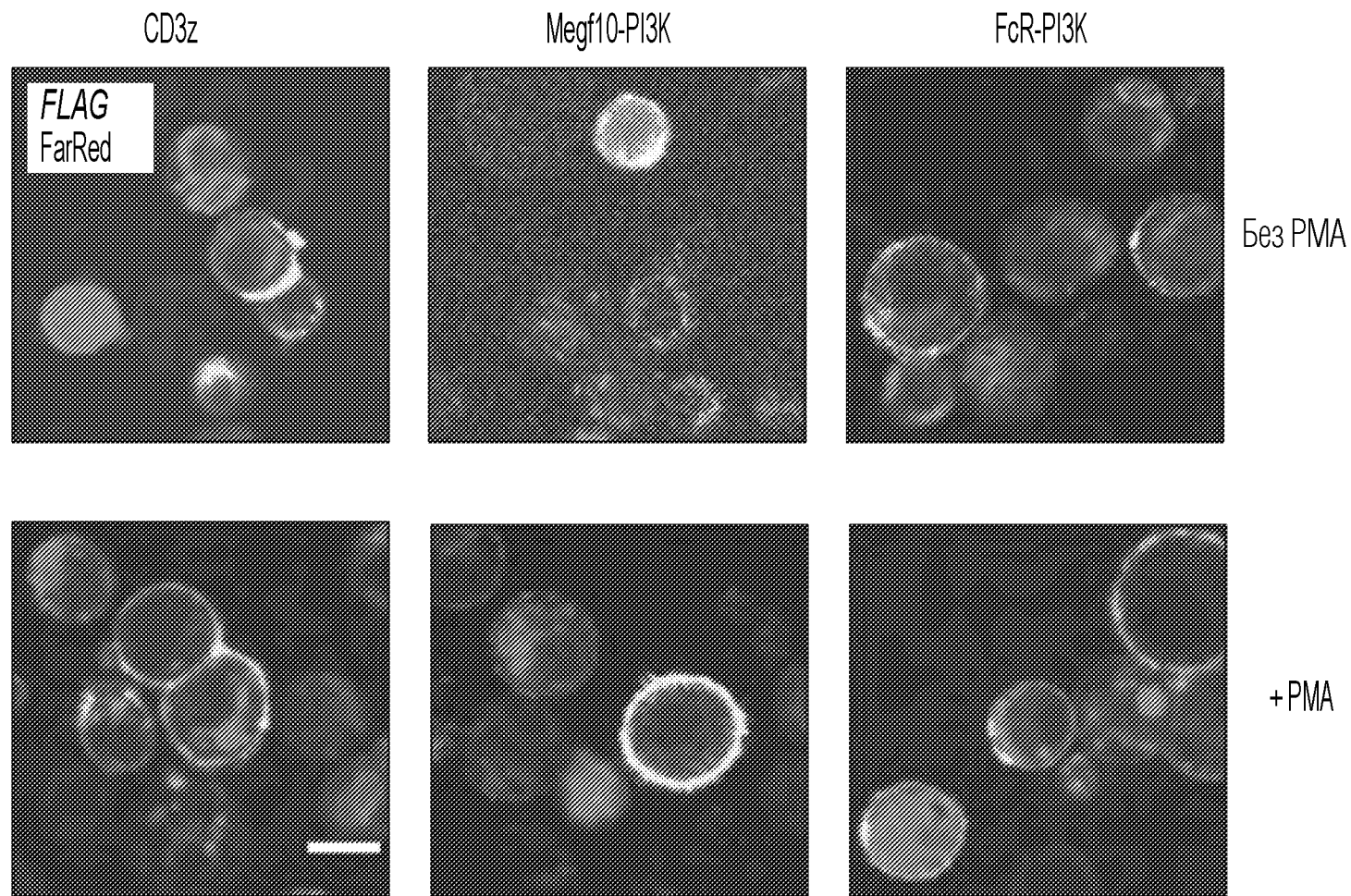


ФИГ. 15Bii



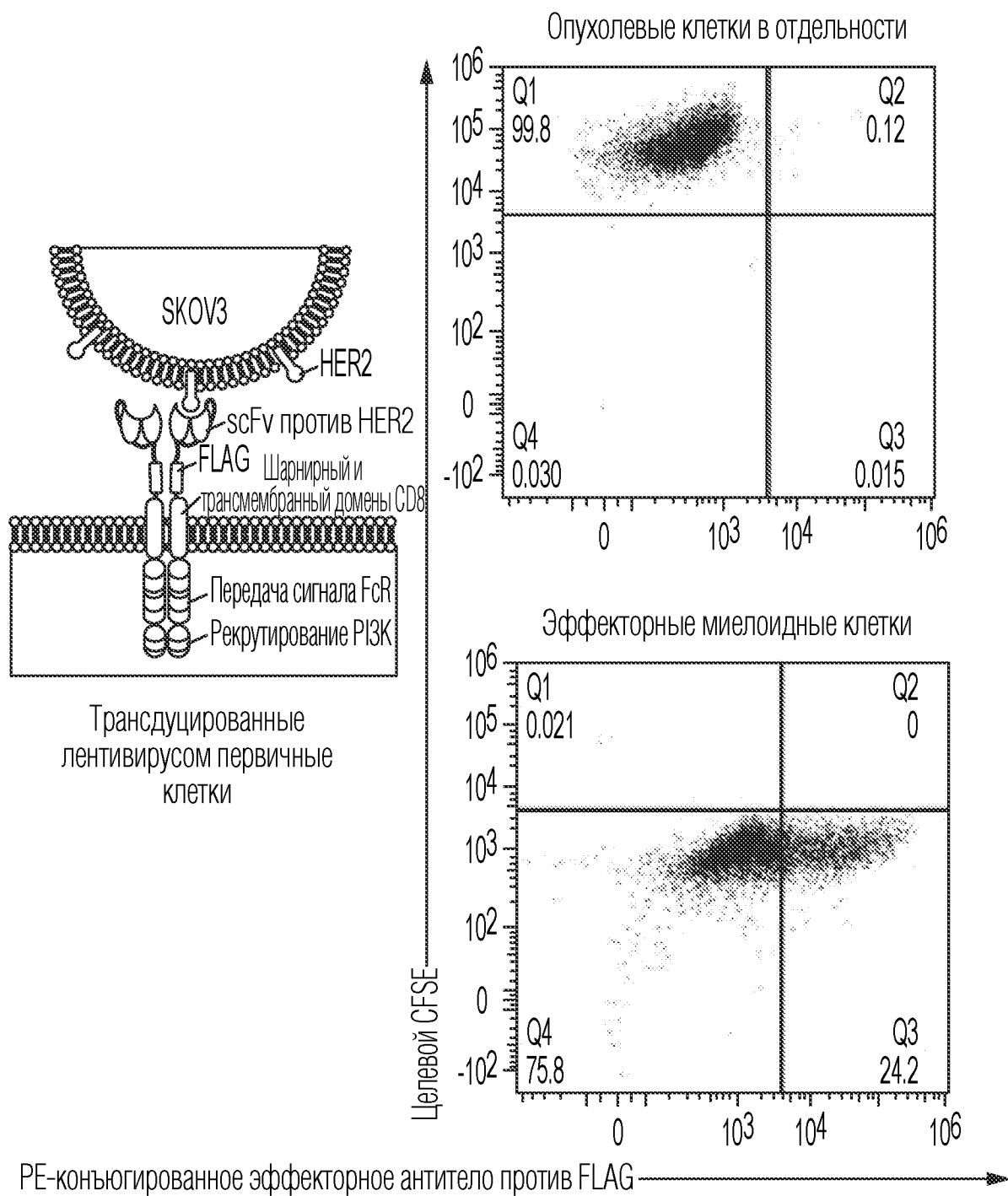
Подвергнутые электропорации трансдуцированные клетки THP1

ФИГ. 16А

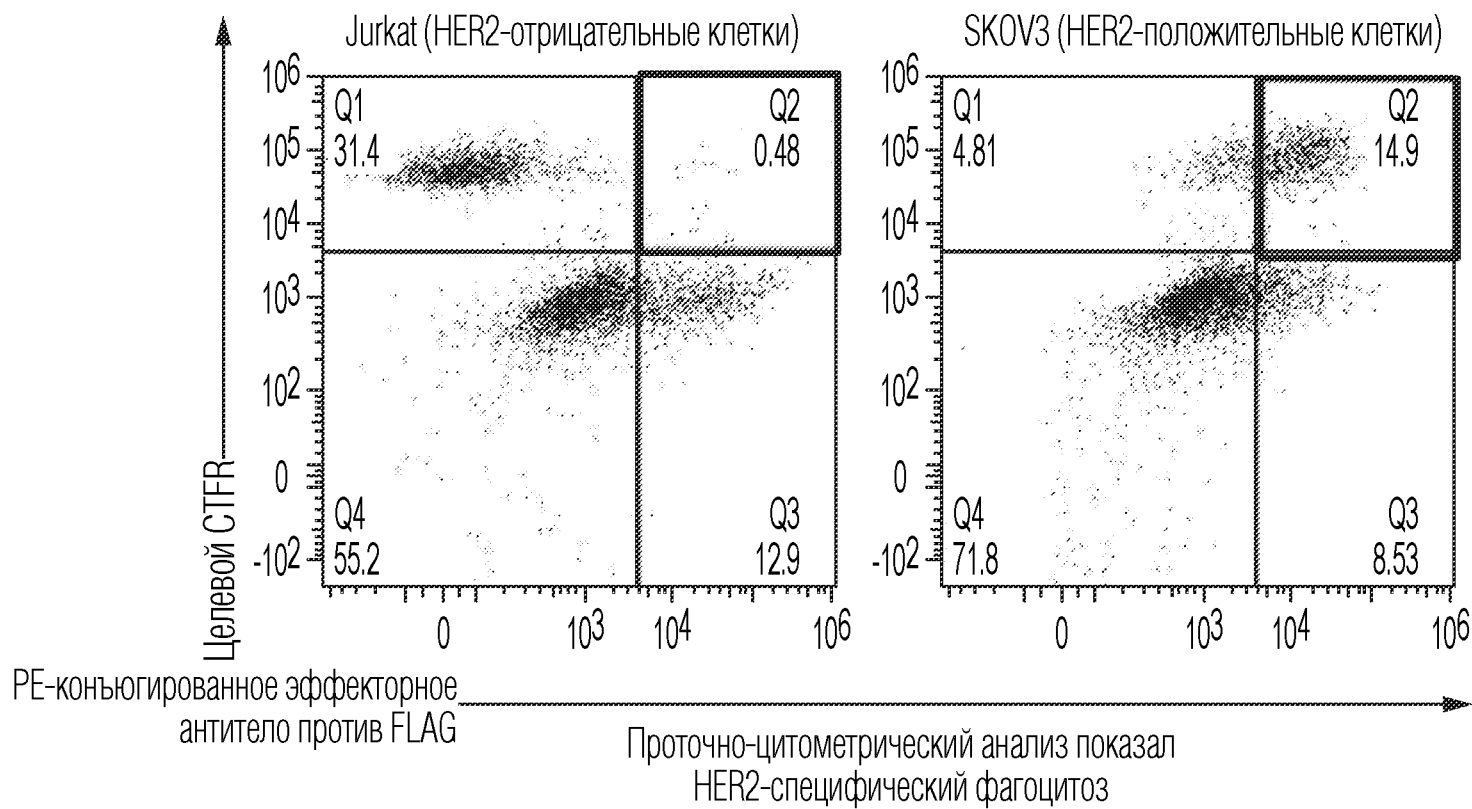


Масштабная линейка: 10 мкм

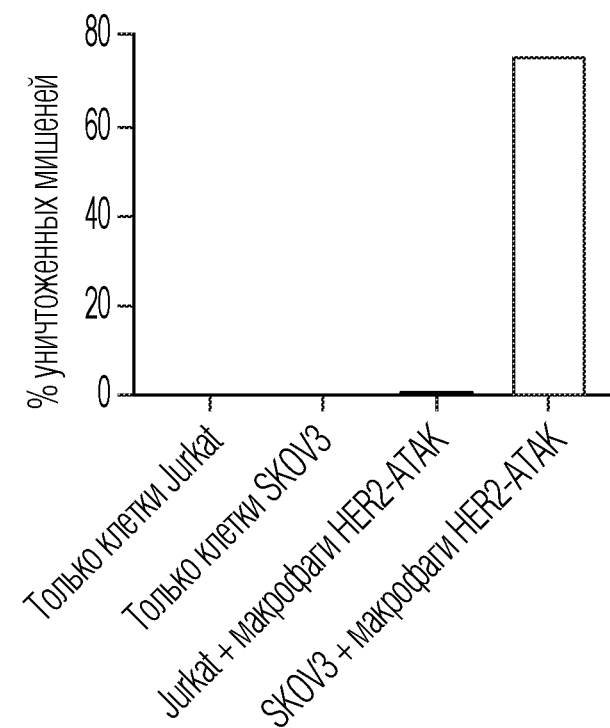
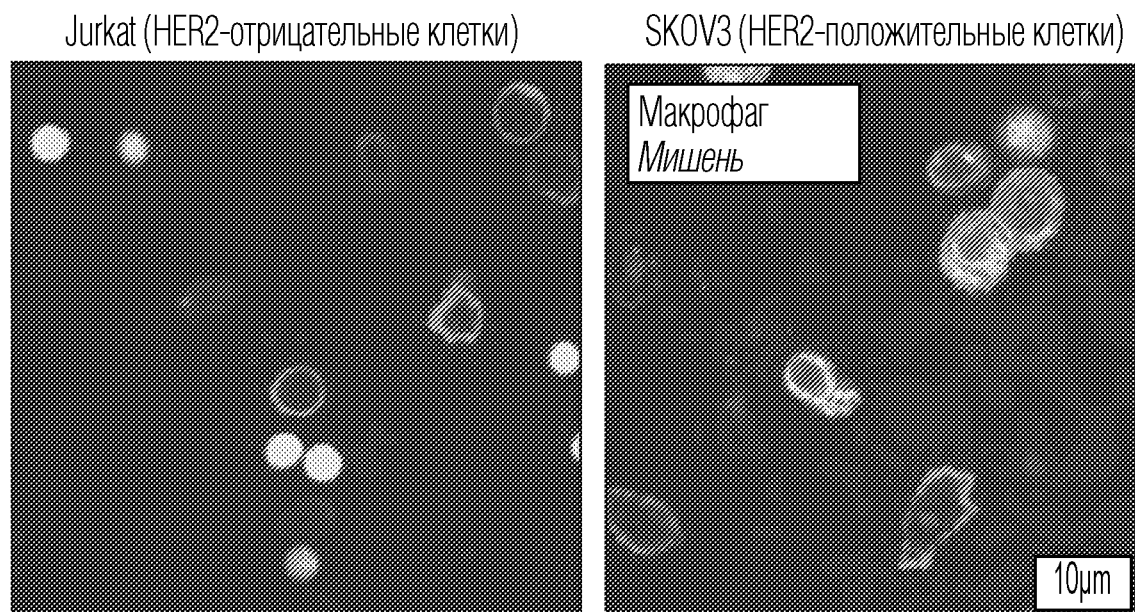
ФИГ. 16А ПРОДОЛЖЕНИЕ



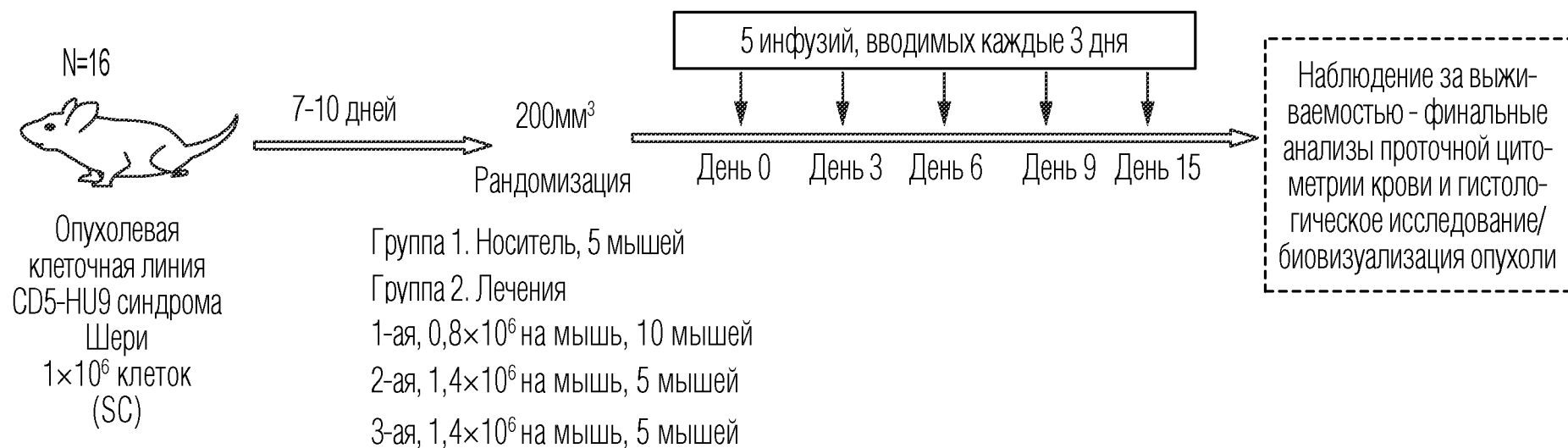
ФИГ. 16В



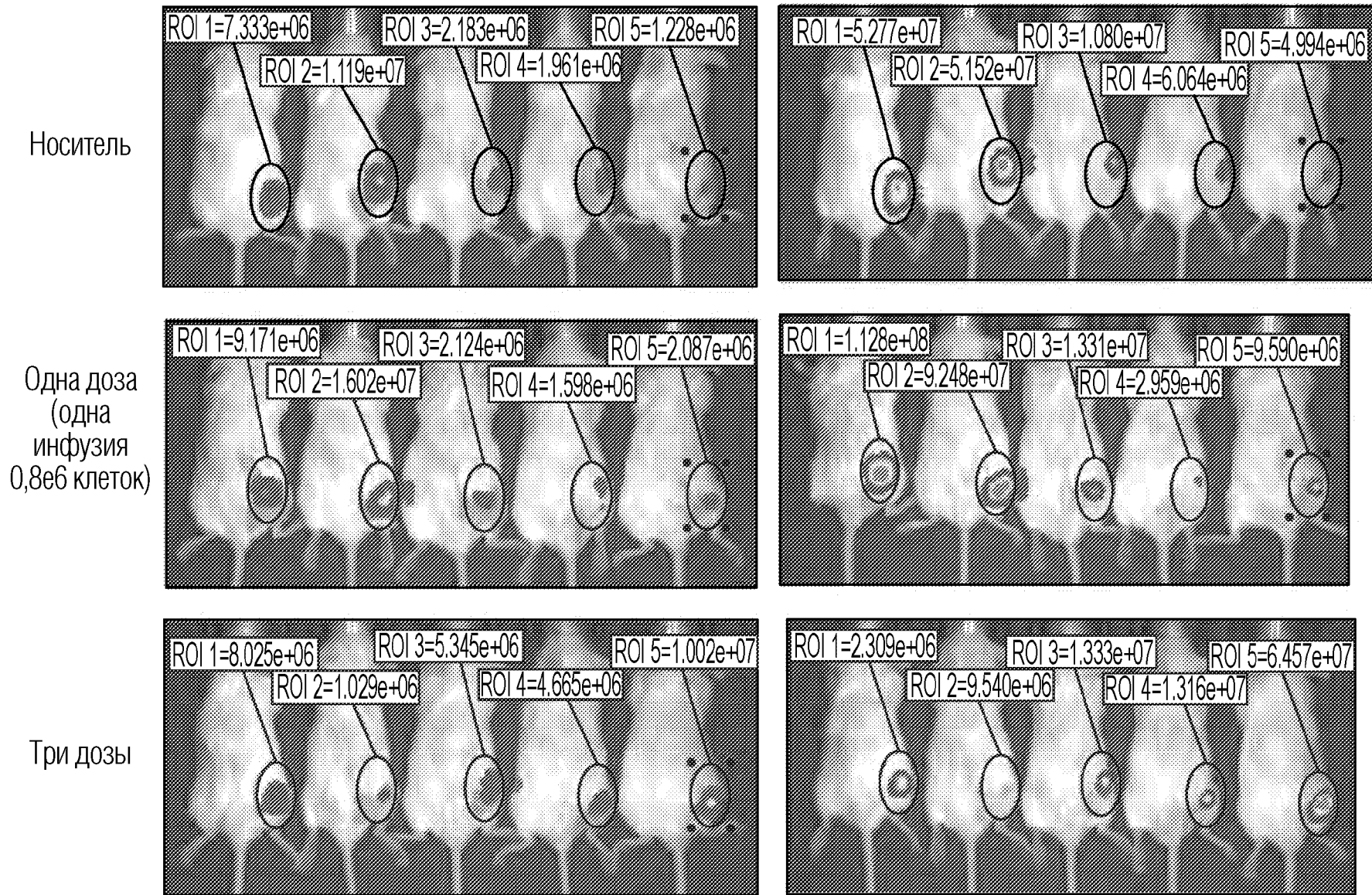
ФИГ. 16В ПРОДОЛЖЕНИЕ



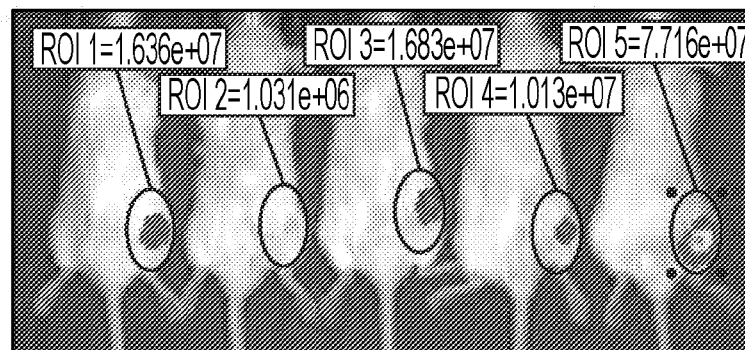
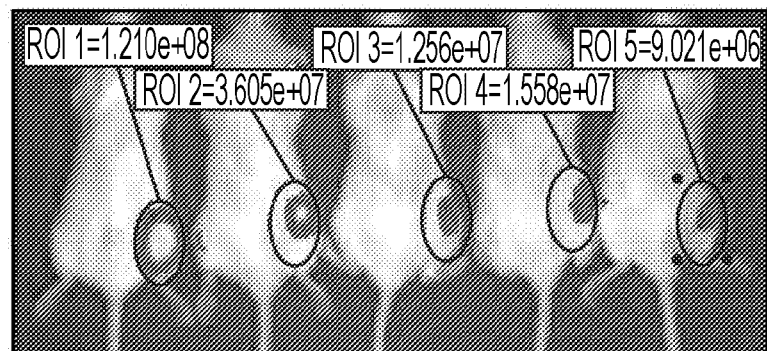
ФИГ. 16С



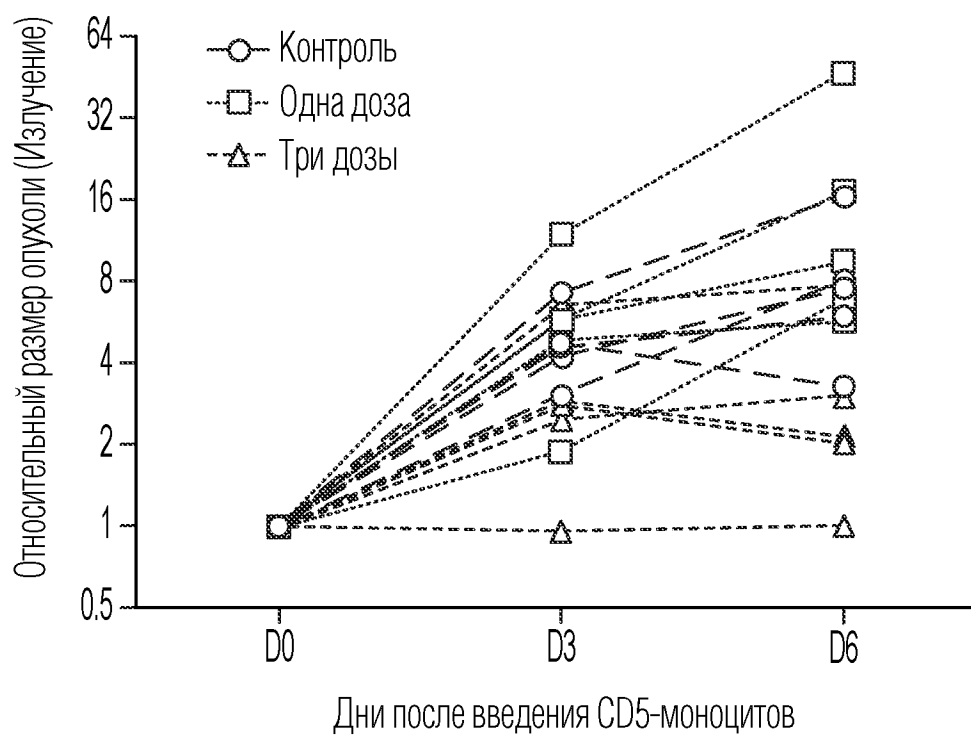
ФИГ. 17А



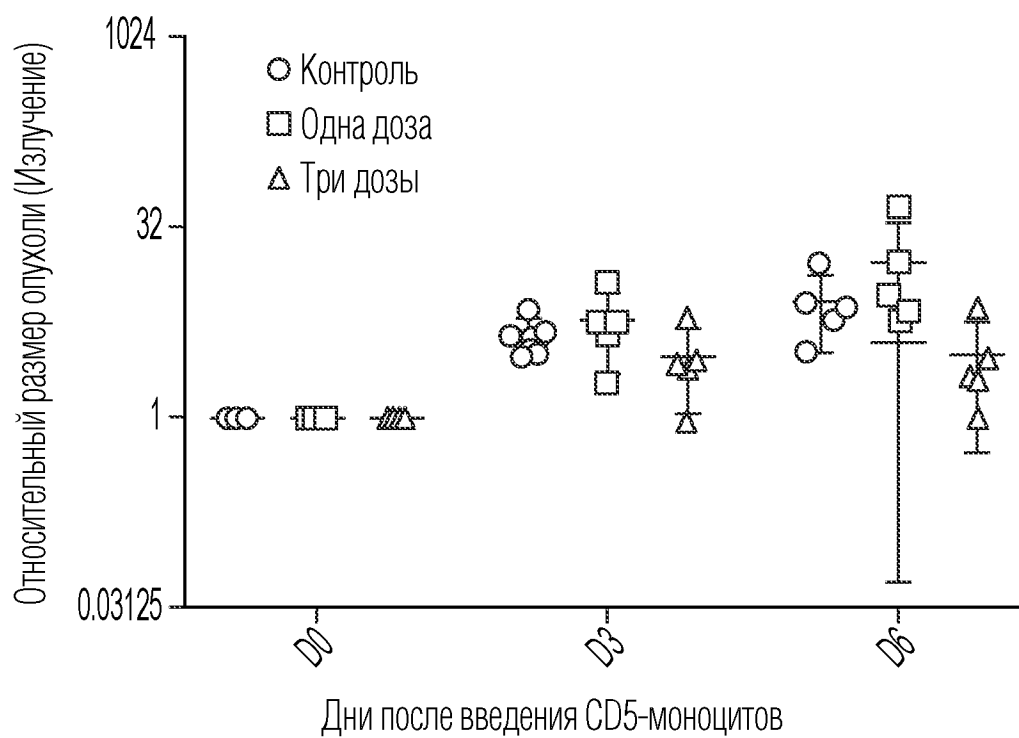
ФИГ. 17В



ФИГ. 17В ПРОДОЛЖЕНИЕ

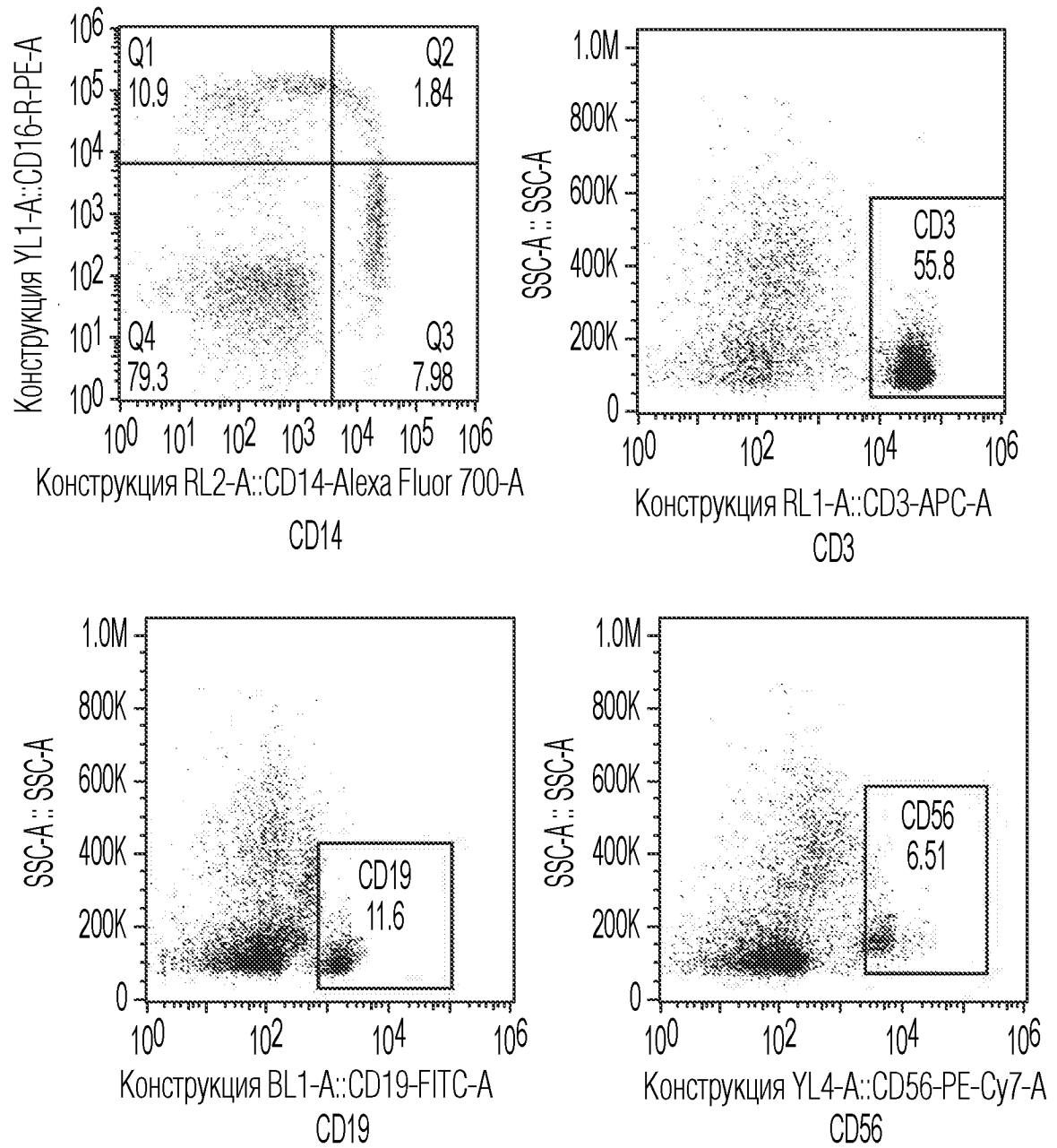


ФИГ. 17С



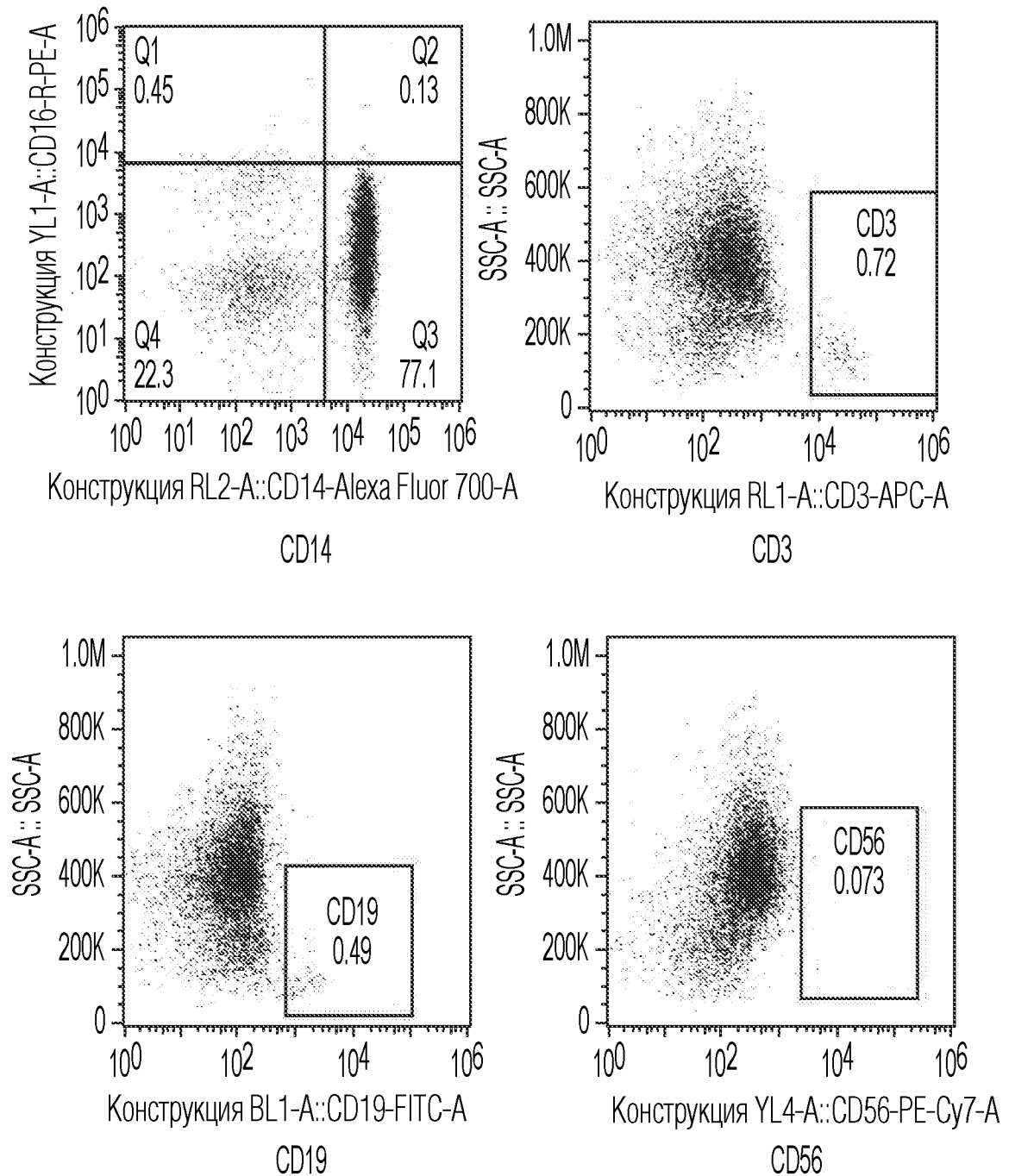
ФИГ. 17D

PBMC

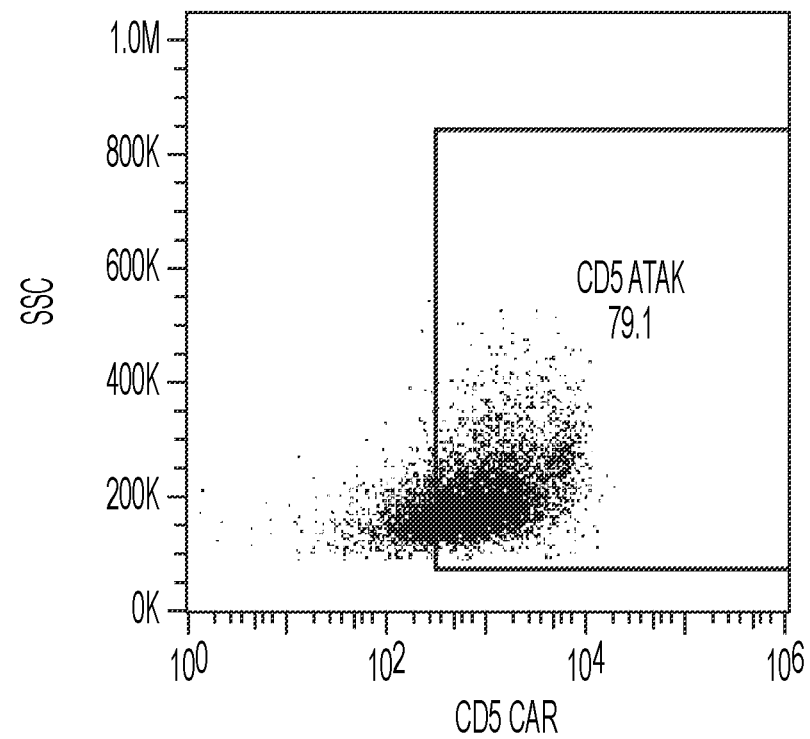
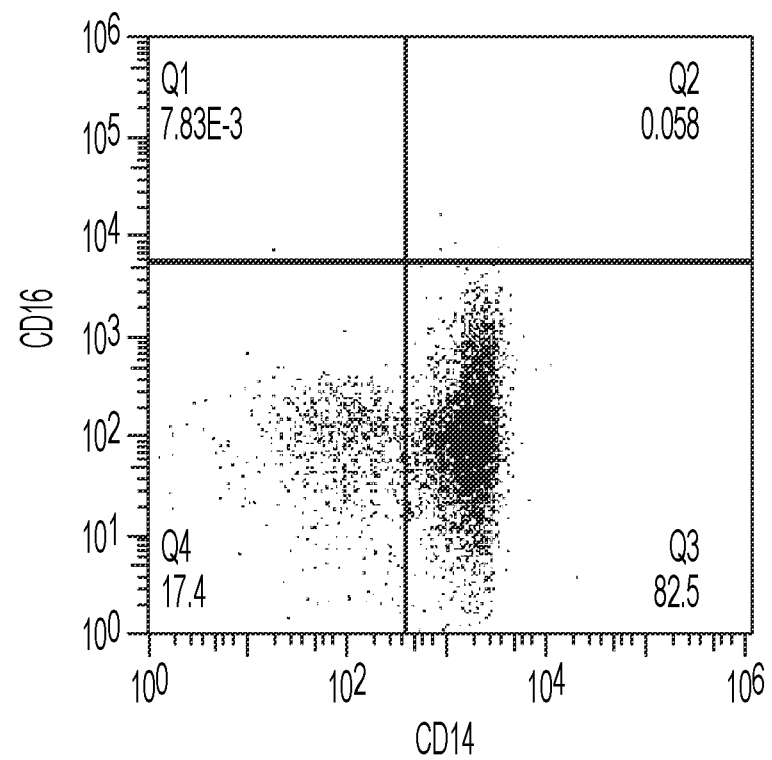


ФИГ. 18А

Моноциты (Протокол 1)

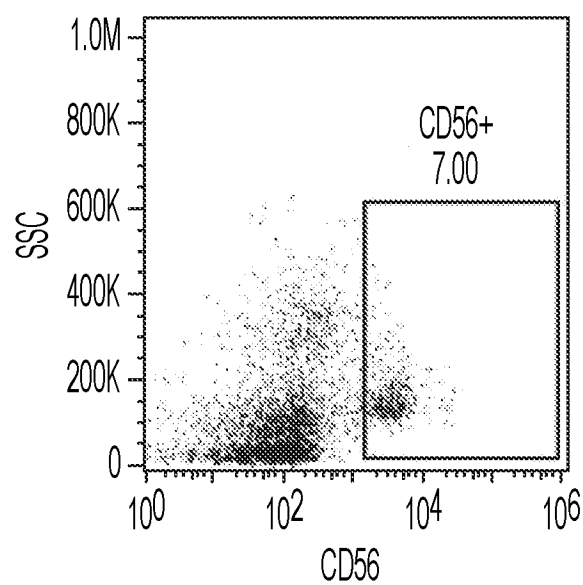
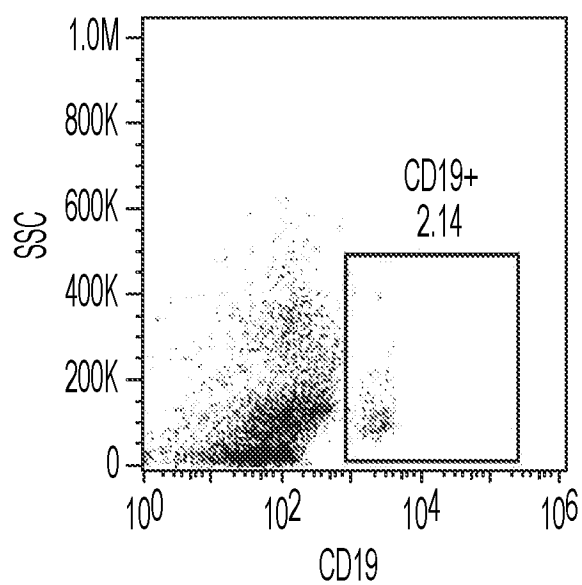
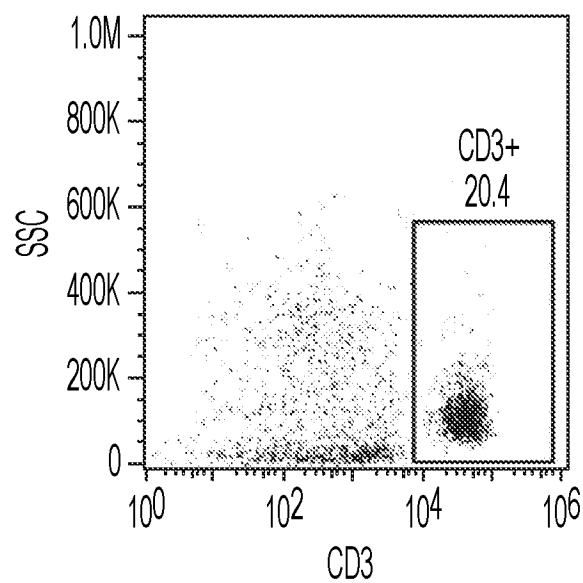
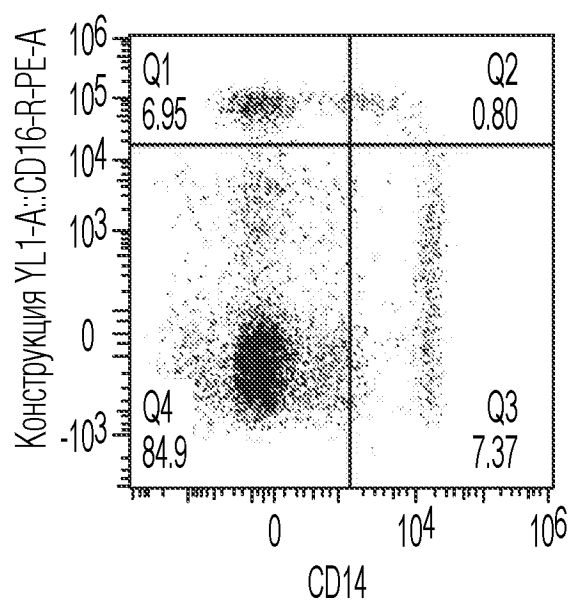


ФИГ. 18А ПРОДОЛЖЕНИЕ



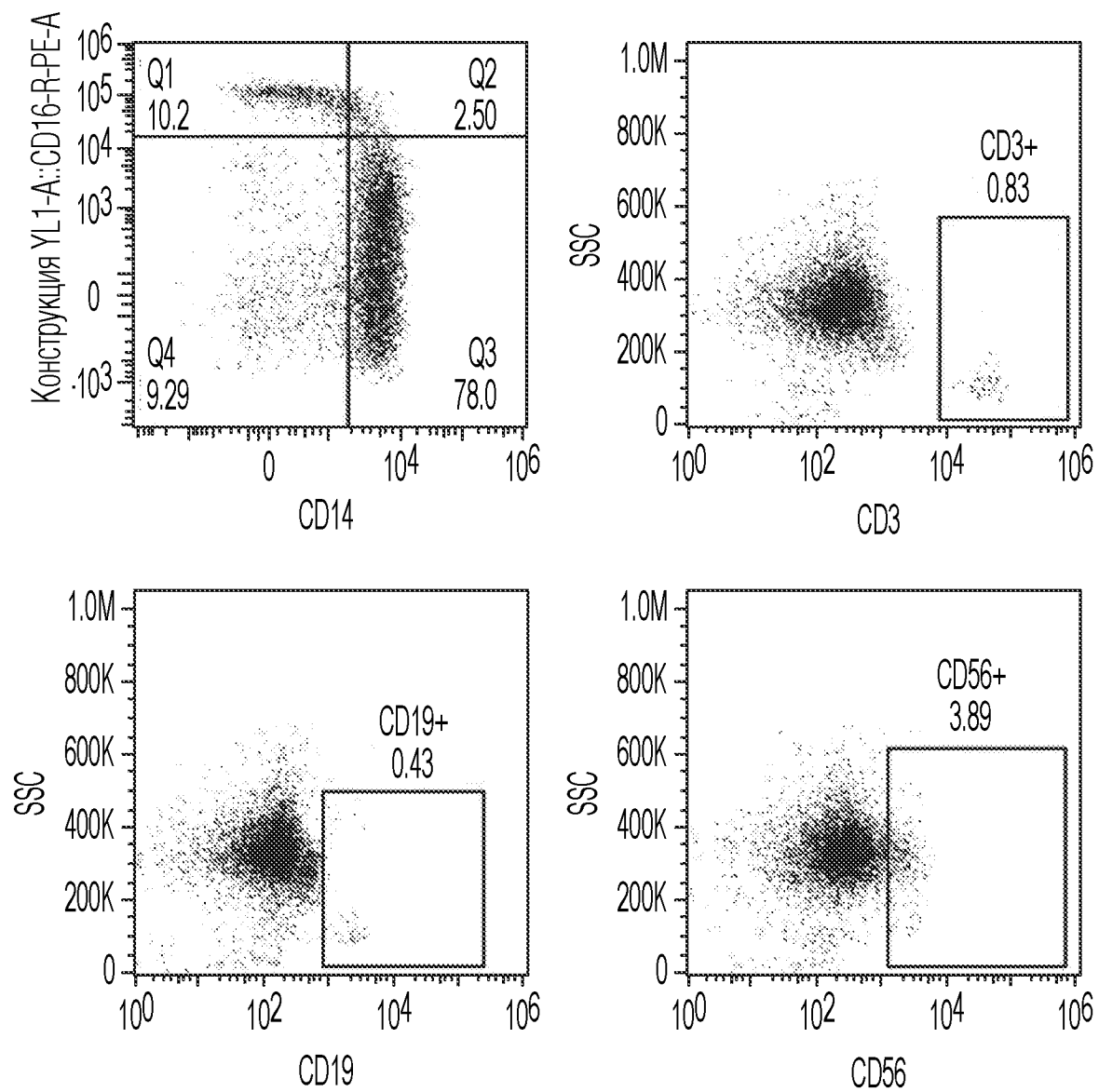
ФИГ. 18В

PBMC

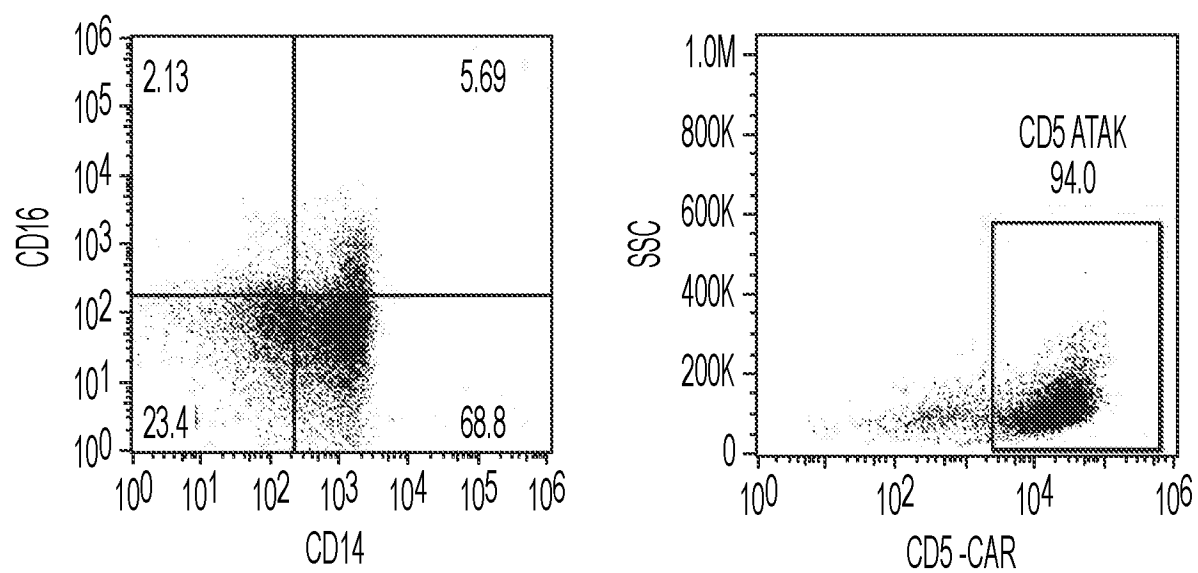


ФИГ. 19А

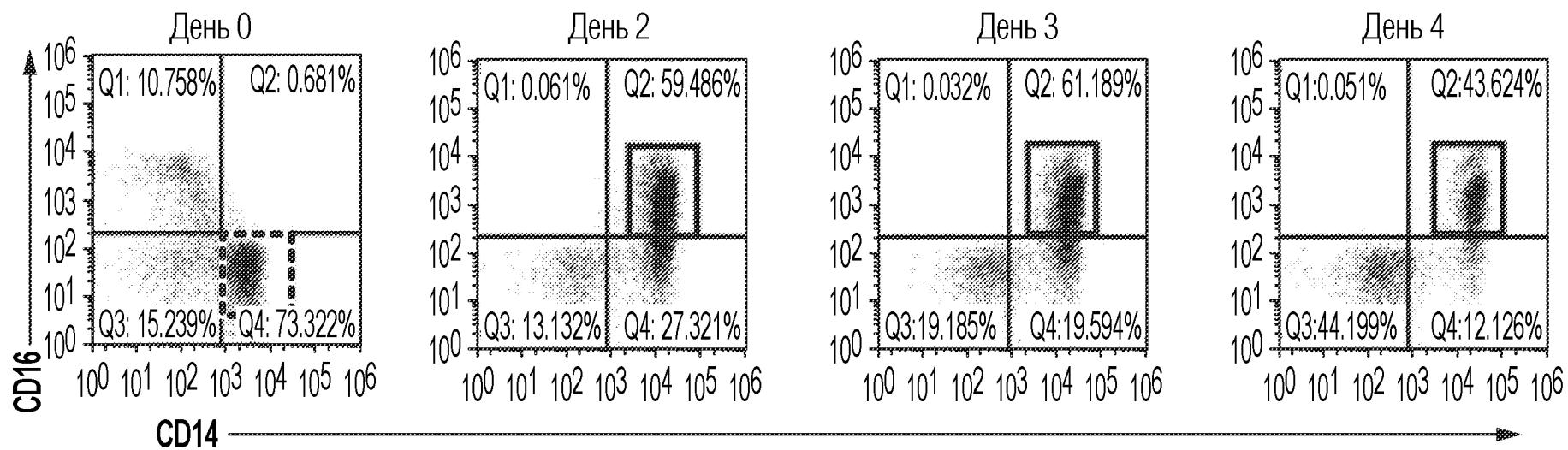
Моноциты (Протокол 2)



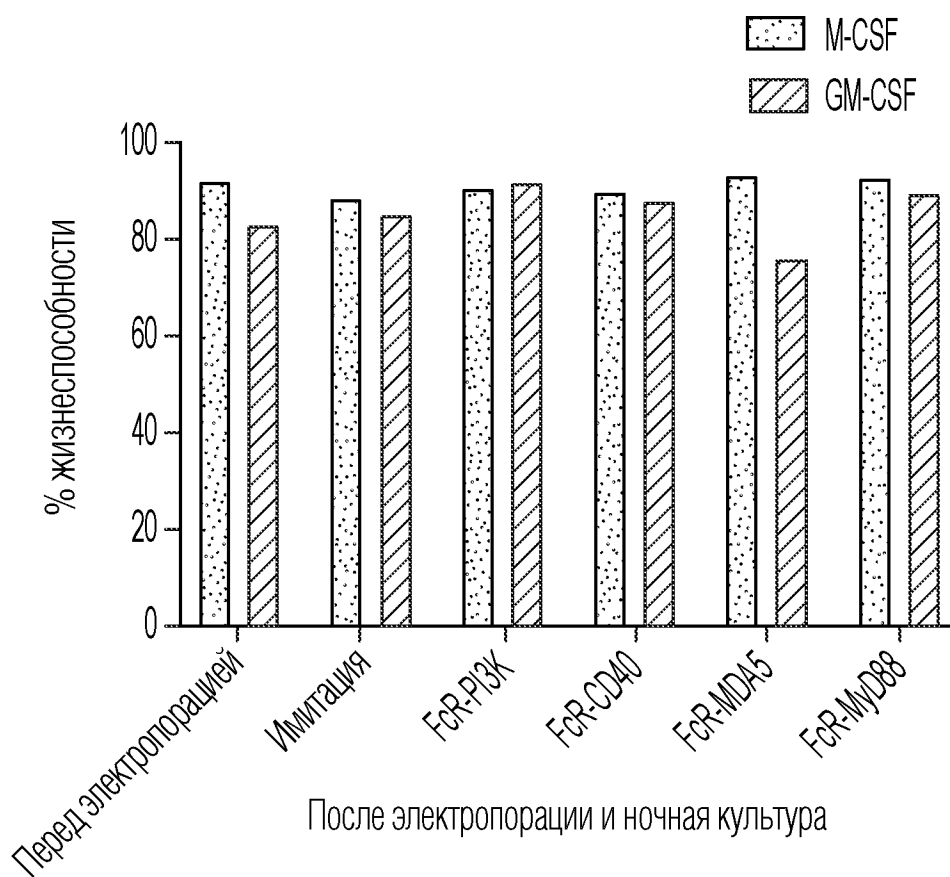
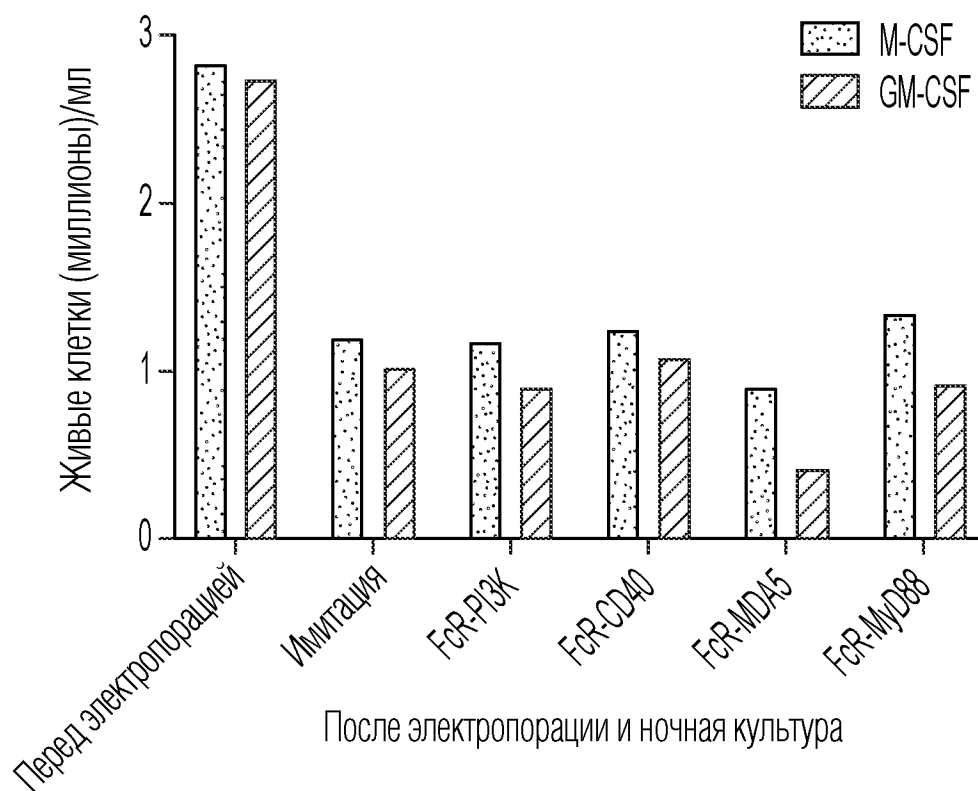
ФИГ. 19А ПРОДОЛЖЕНИЕ



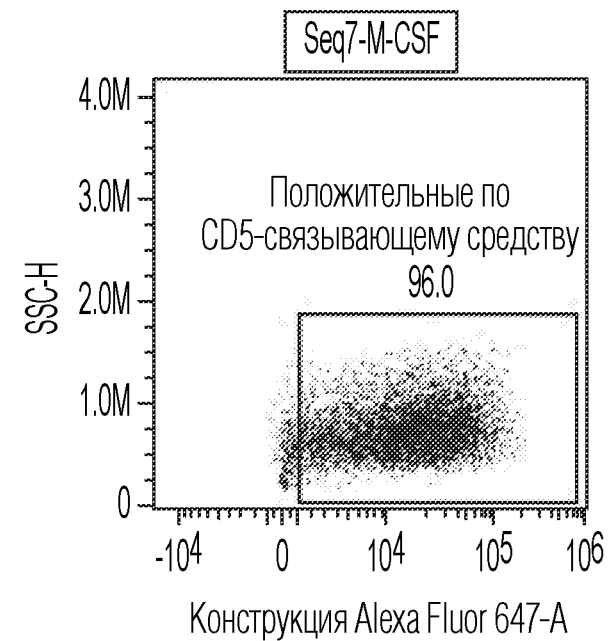
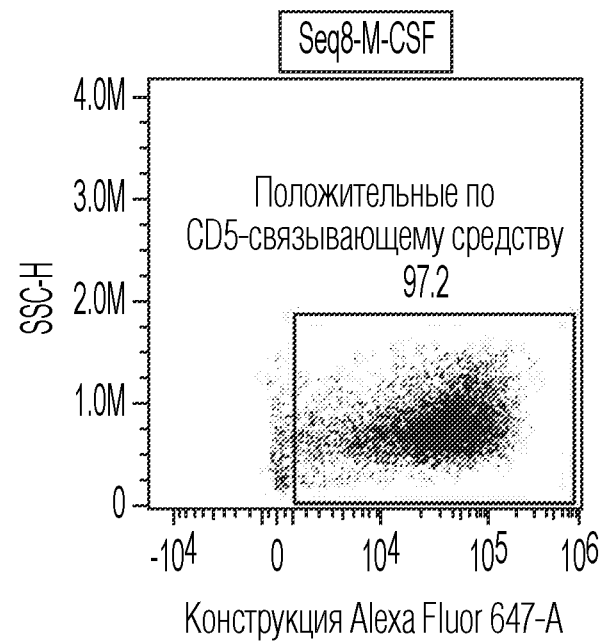
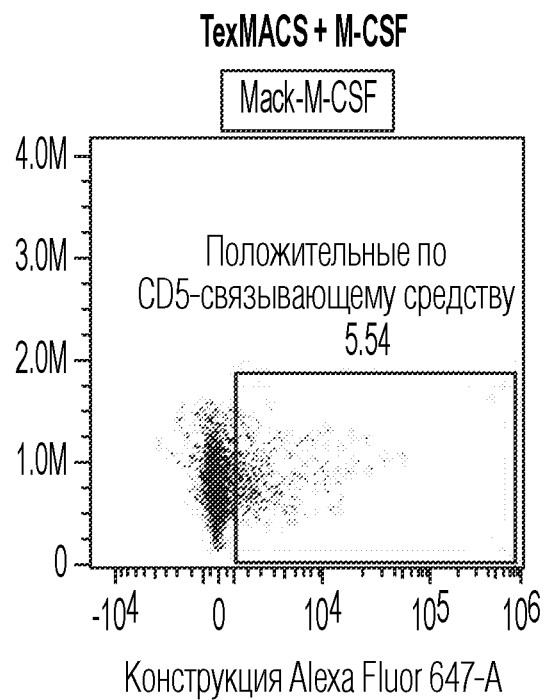
ФИГ. 19В



ФИГ. 20

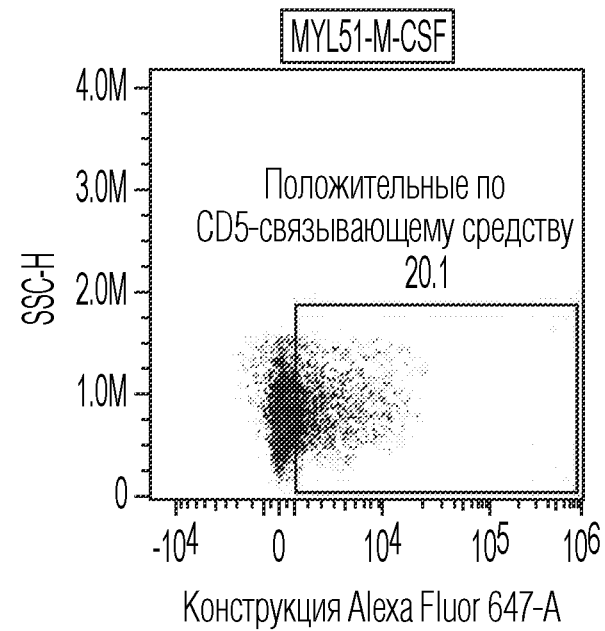
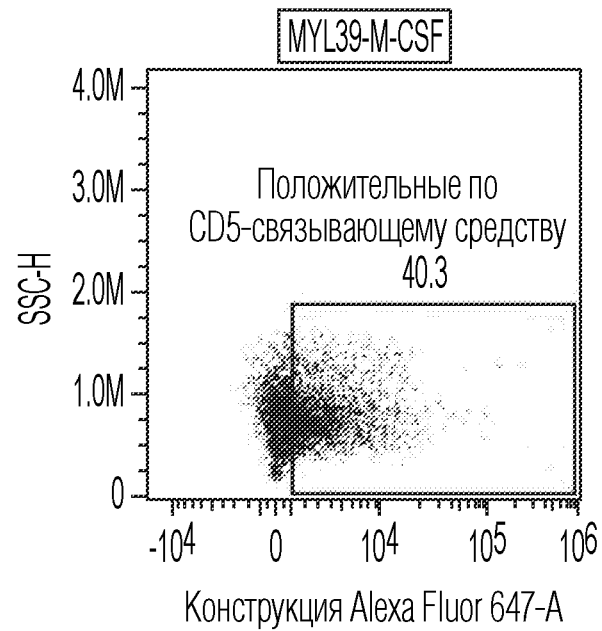


ФИГ. 21А



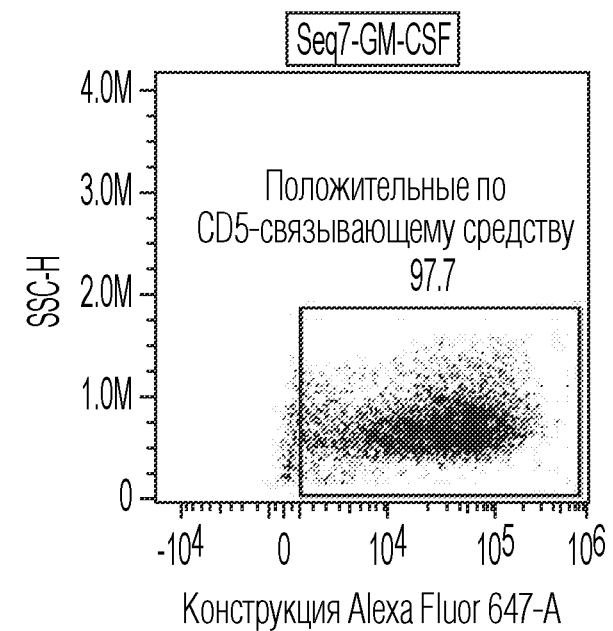
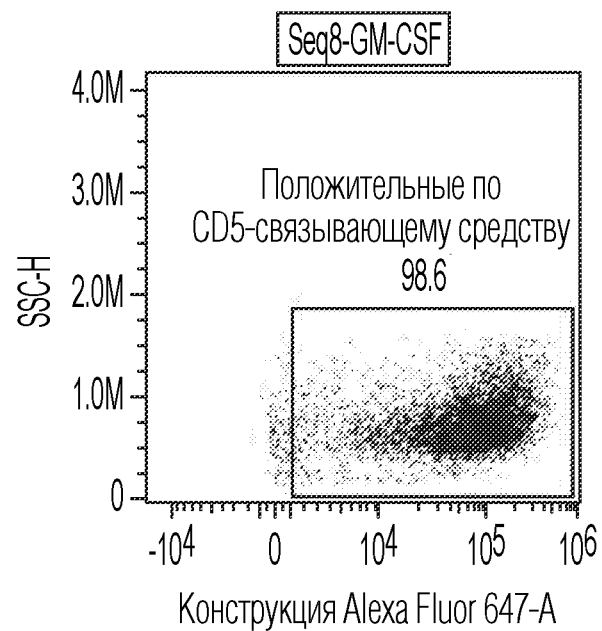
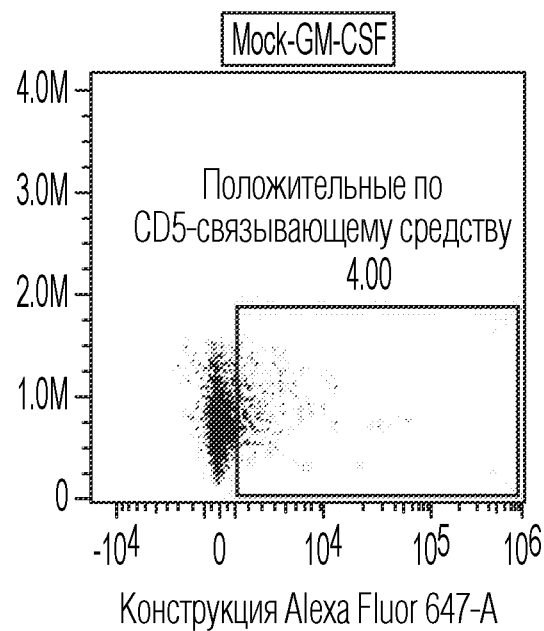
ФИГ. 21В

TexMACS + M-CSF



ФИГ. 21В ПРОДОЛЖЕНИЕ

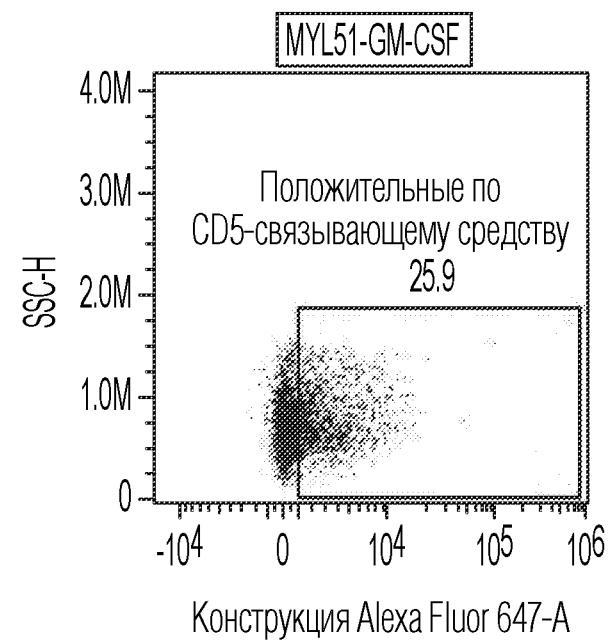
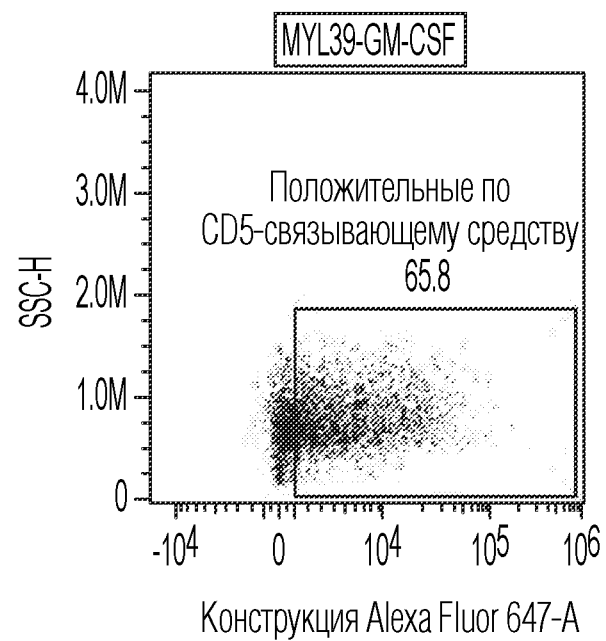
TexMACS + GM-CSF



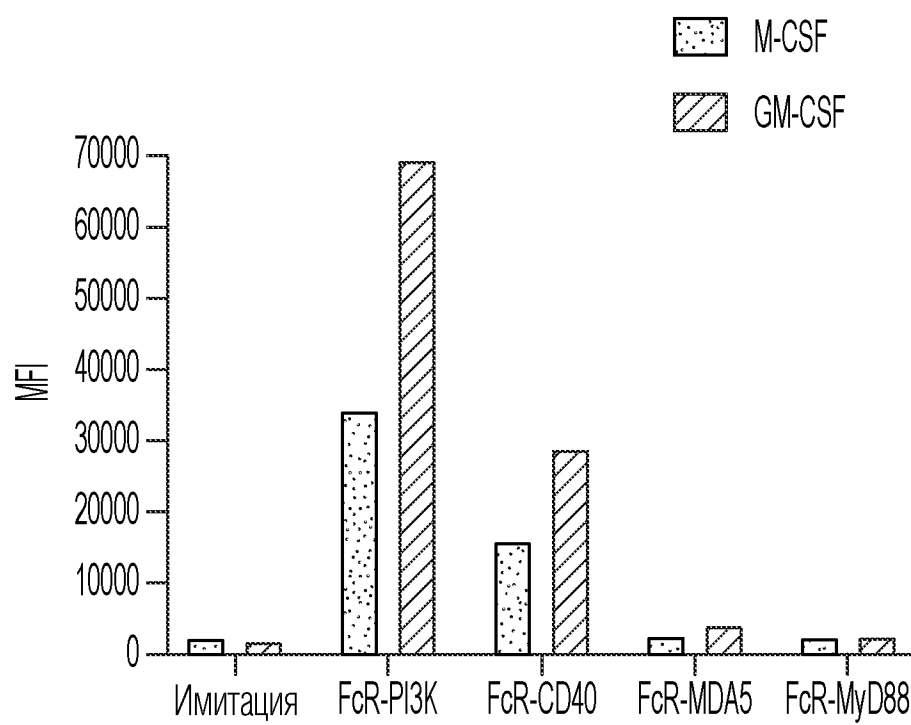
Уровень экспрессии CD5-CFP →

ФИГ. 21В ПРОДОЛЖЕНИЕ

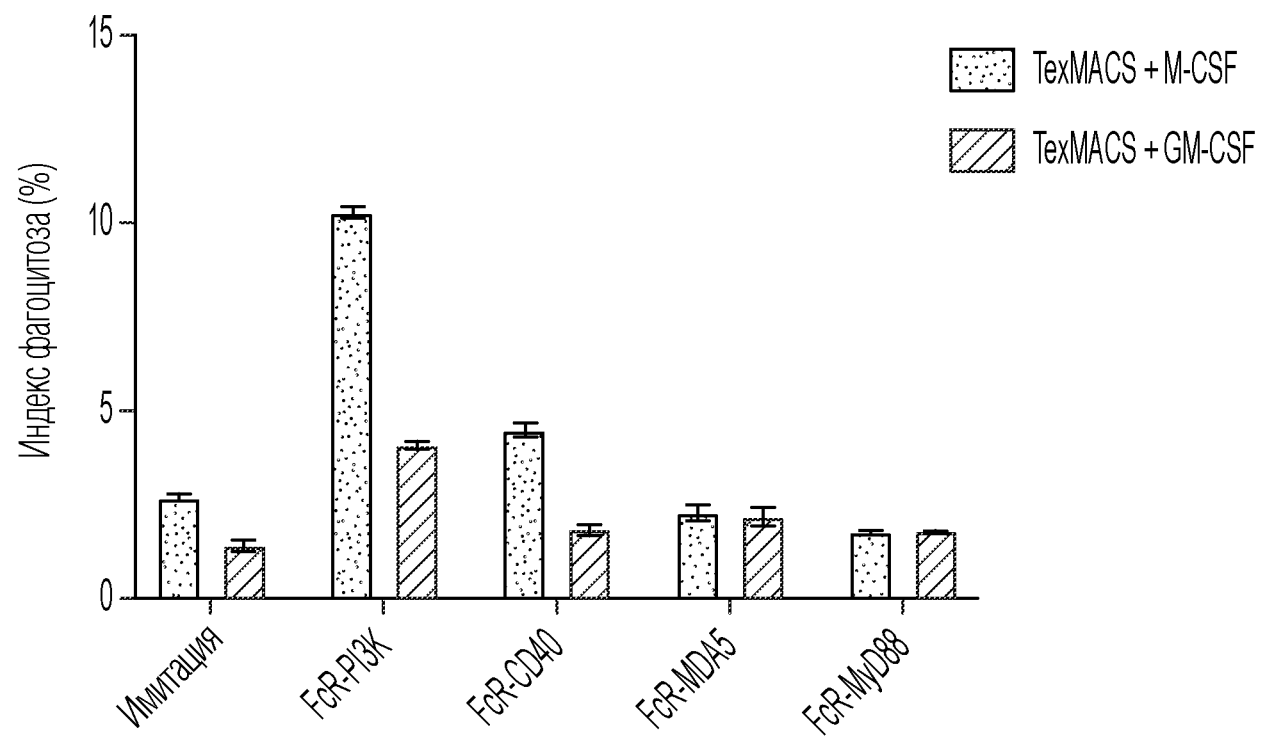
TexMACS + GM-CSF



ФИГ. 21В ПРОДОЛЖЕНИЕ

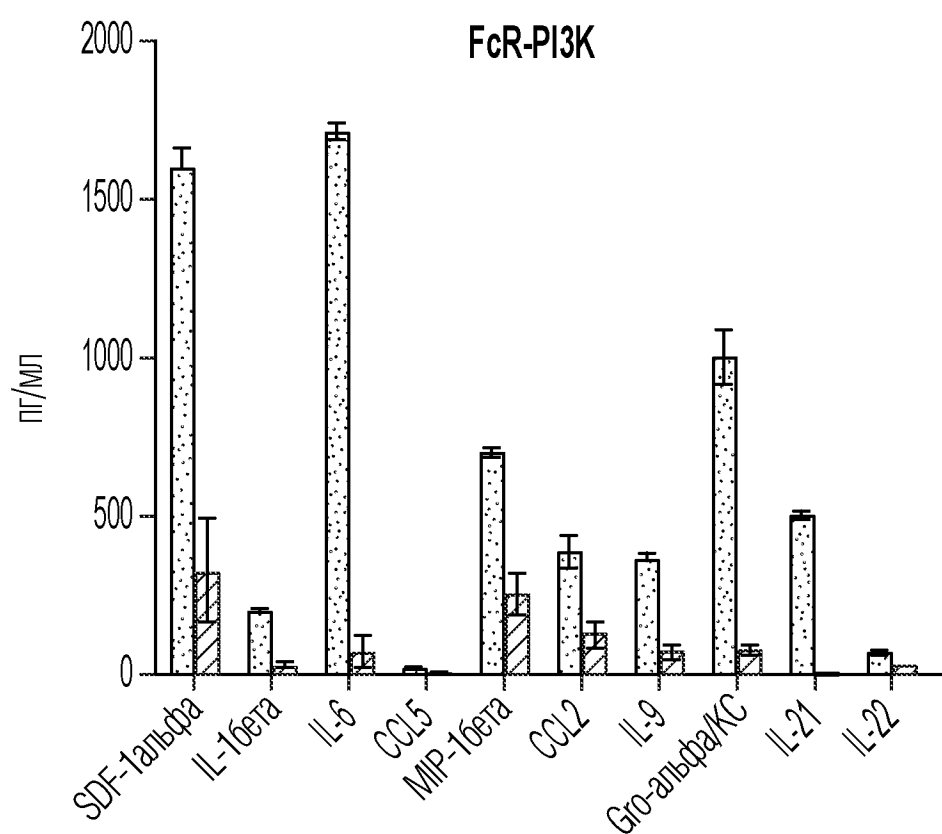
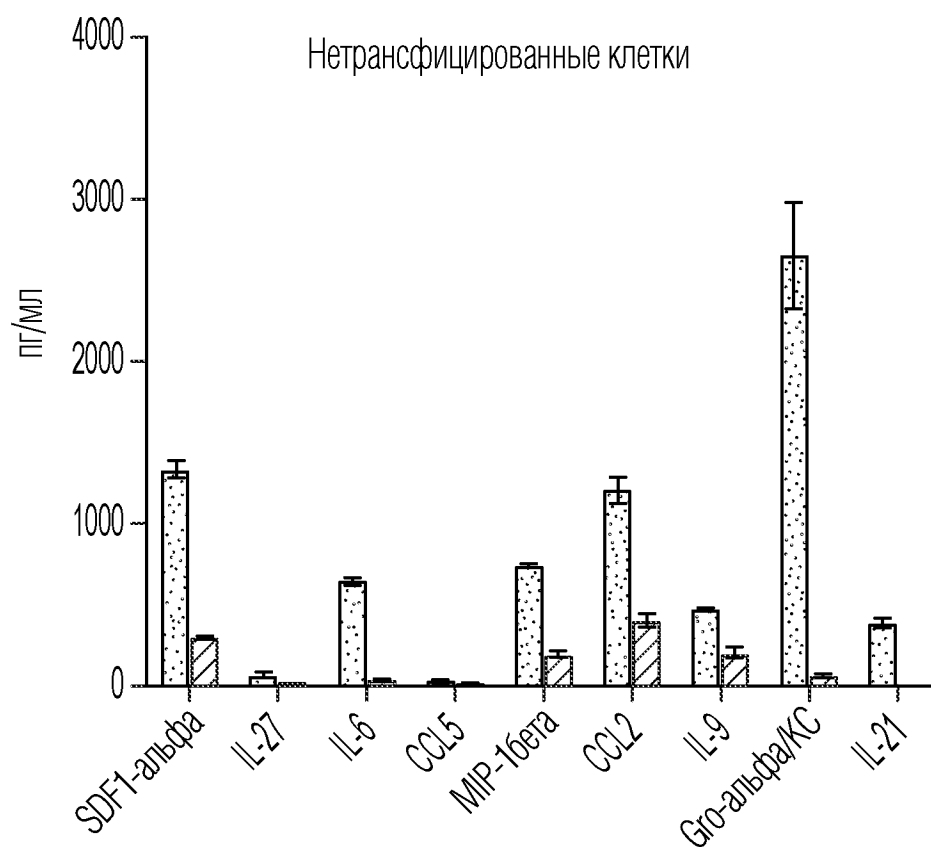


ФИГ. 21В ПРОДОЛЖЕНИЕ

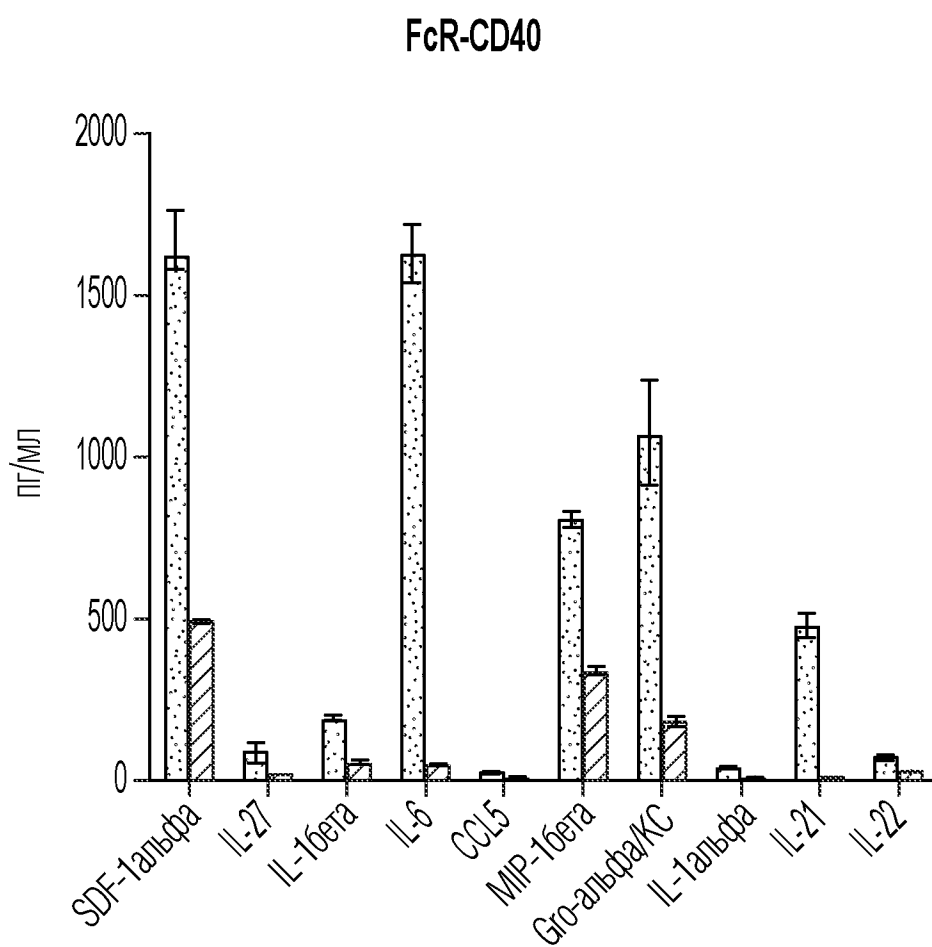


ФИГ. 21С

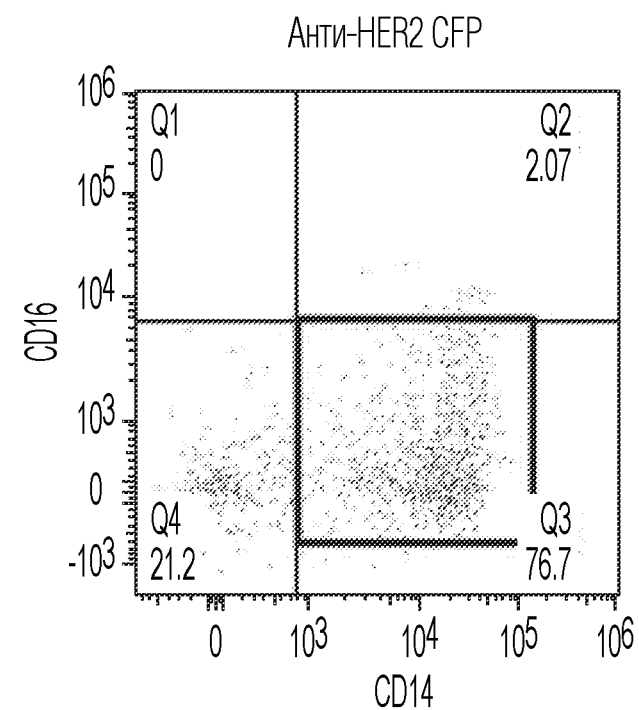
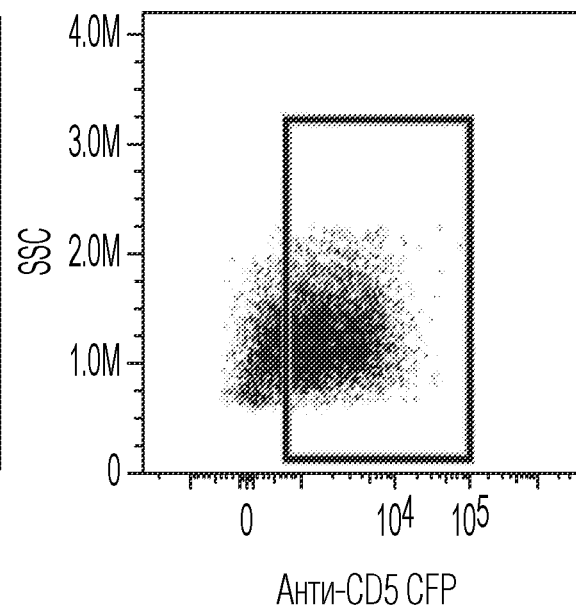
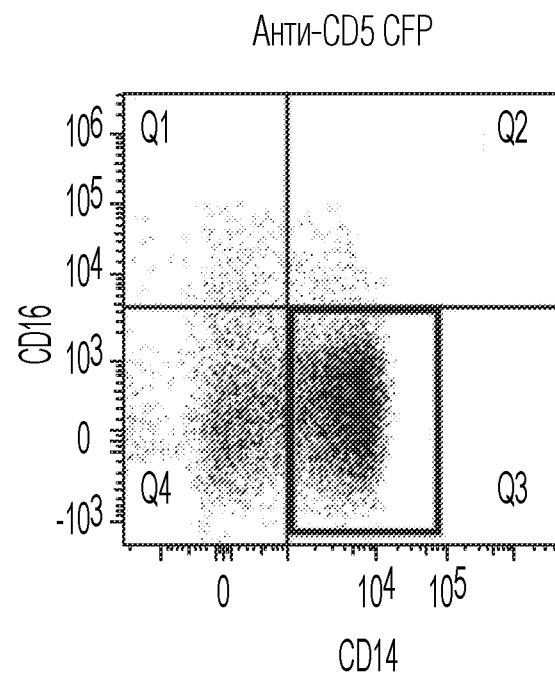
61/81



ФИГ. 21D

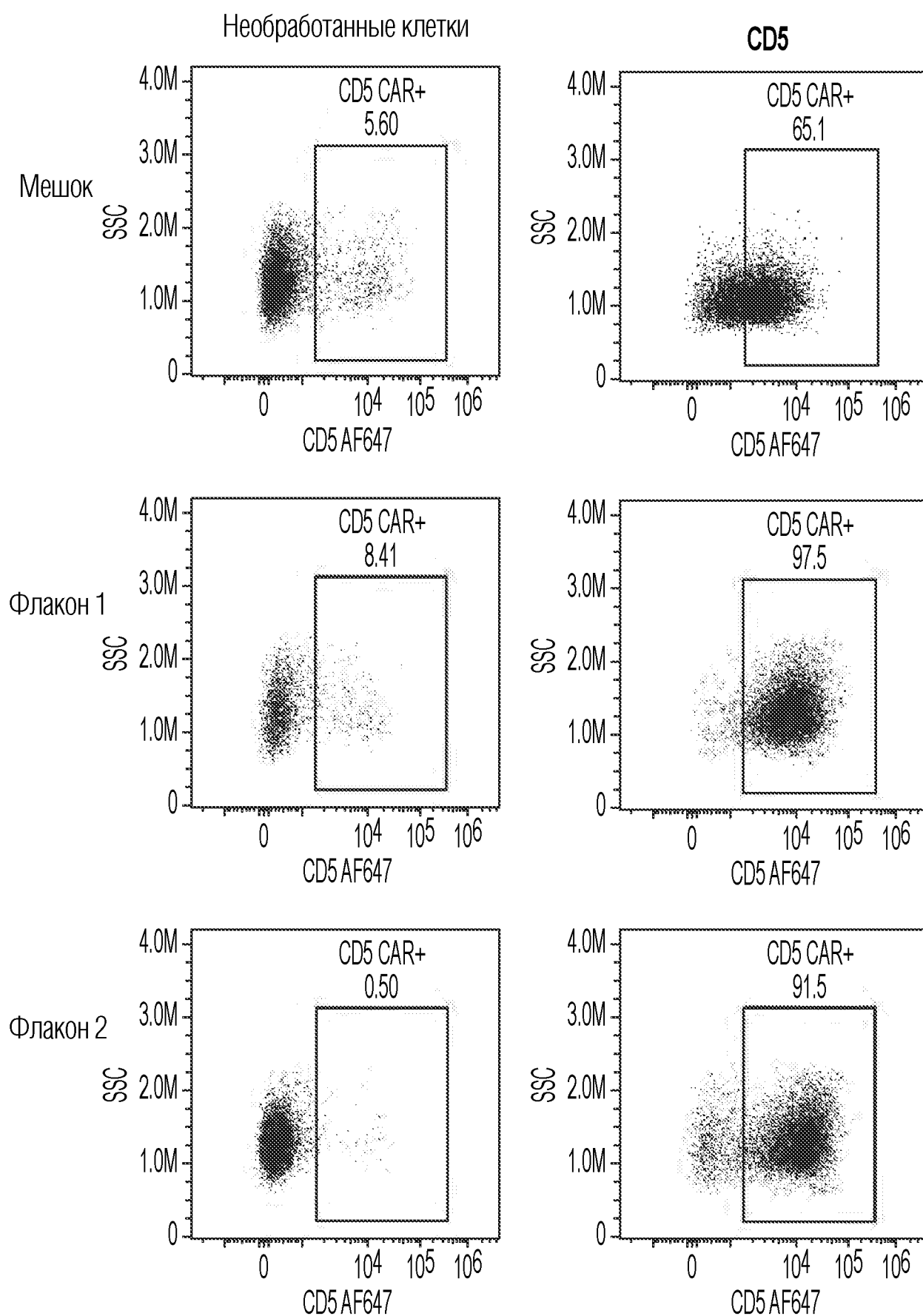


ФИГ. 21D ПРОДОЛЖЕНИЕ

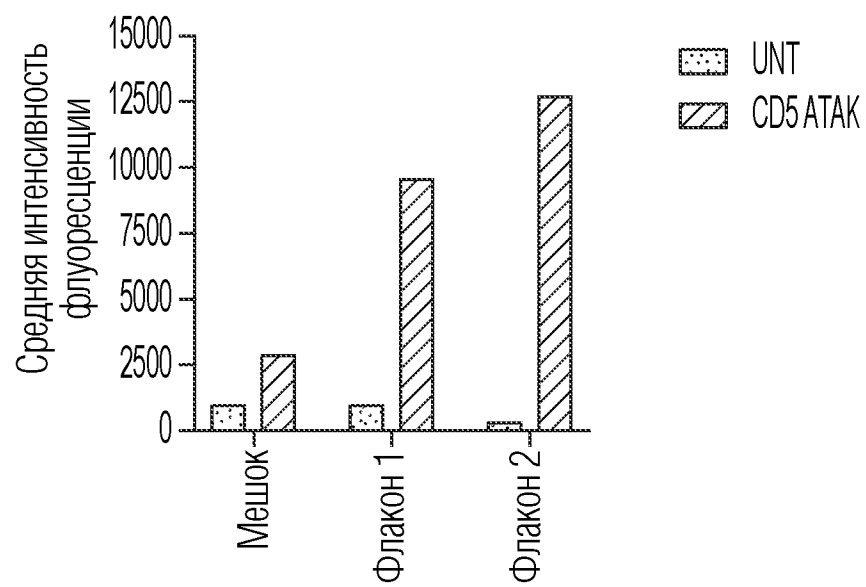


63/81

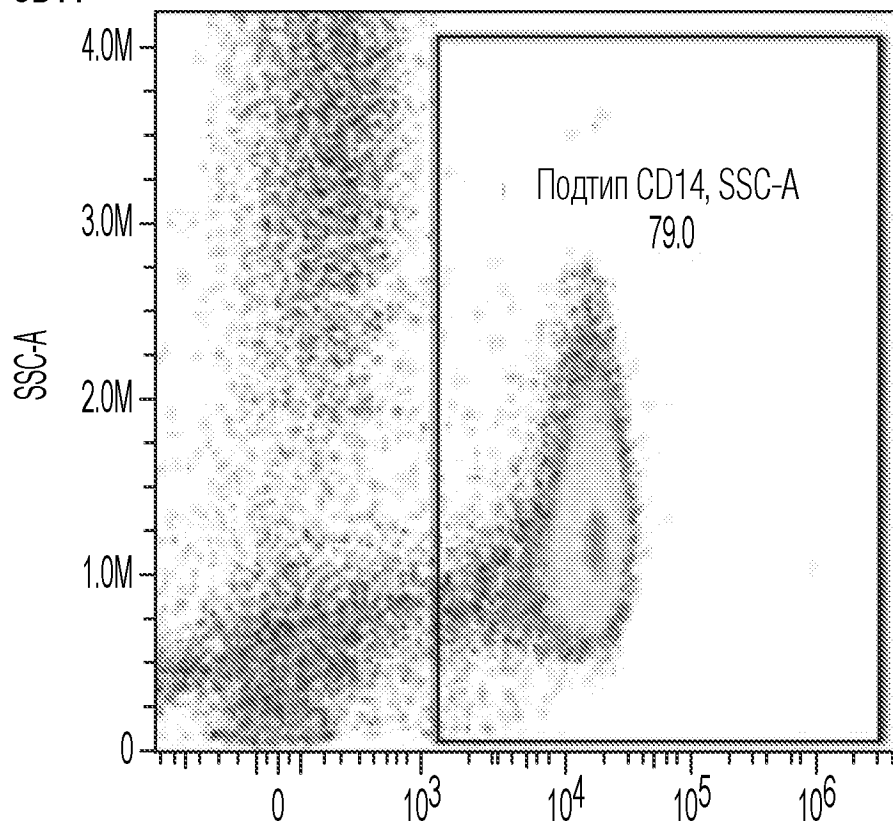
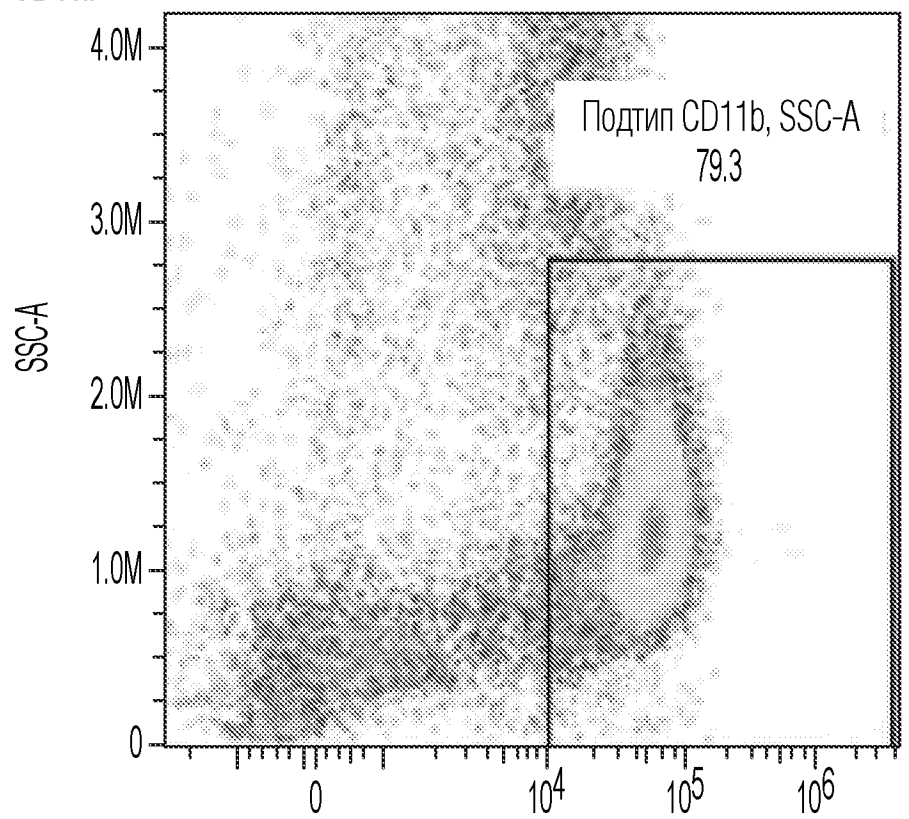
ФИГ. 22

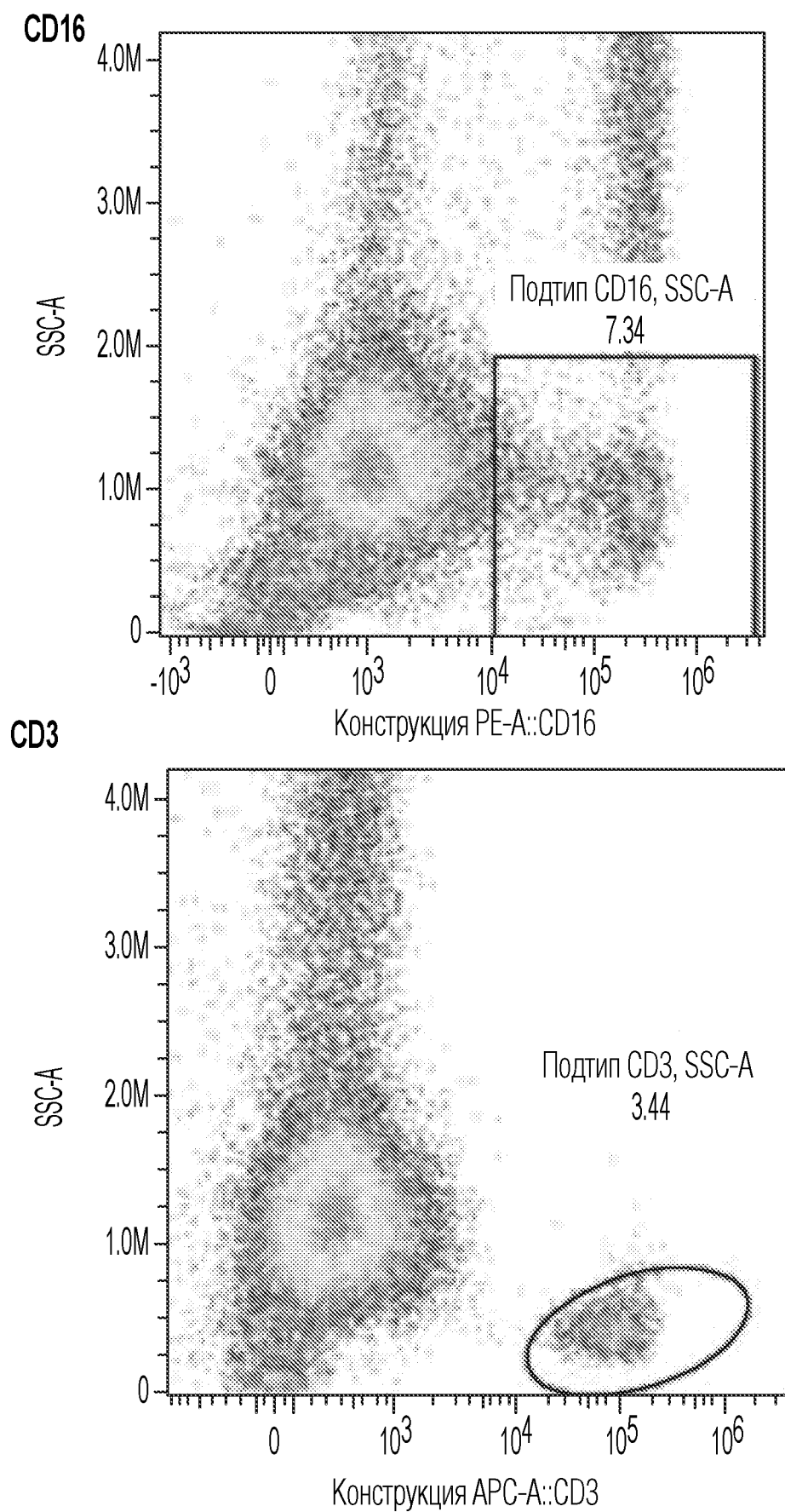


ФИГ. 23

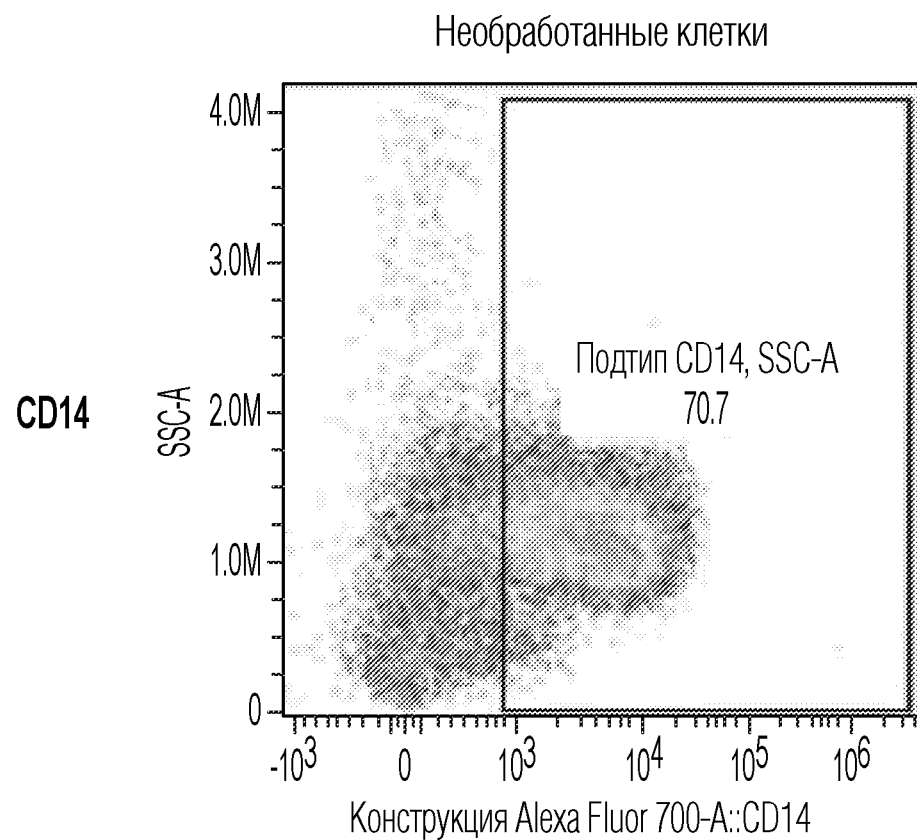


ФИГ. 23 ПРОДОЛЖЕНИЕ

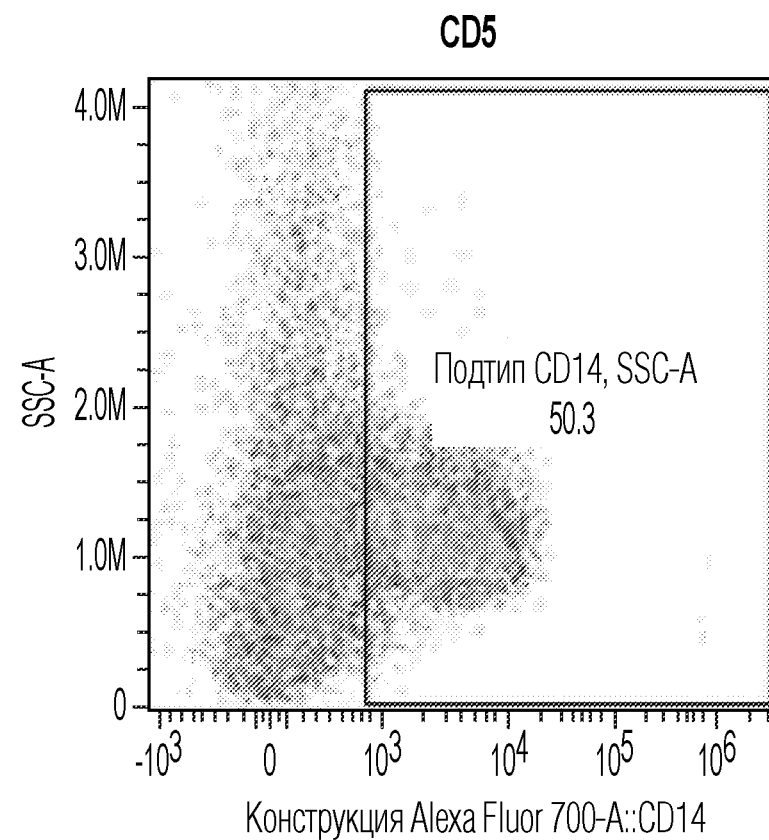
CD14**CD11b****ФИГ. 24**



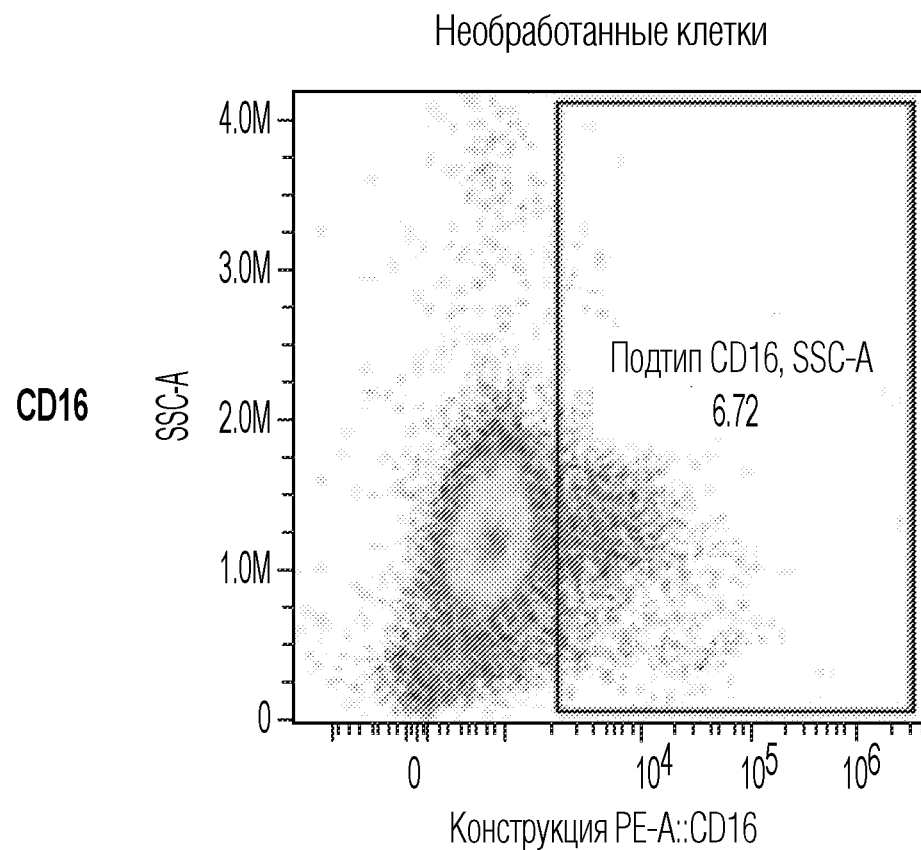
ФИГ. 24 ПРОДОЛЖЕНИЕ



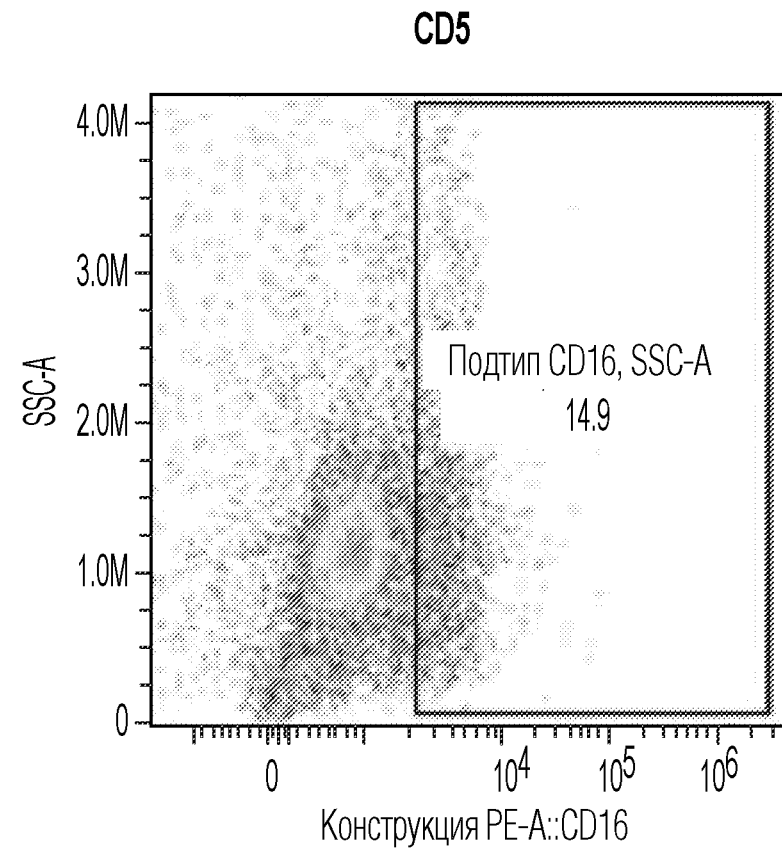
Необработанные A8 K81030, после размораживания, Ab.fcs
Живые, подтип SSC-A
25764



A9 K81030 CDS, после размораживания, Ab.fcs
Живые, подтип SSC-A
16824



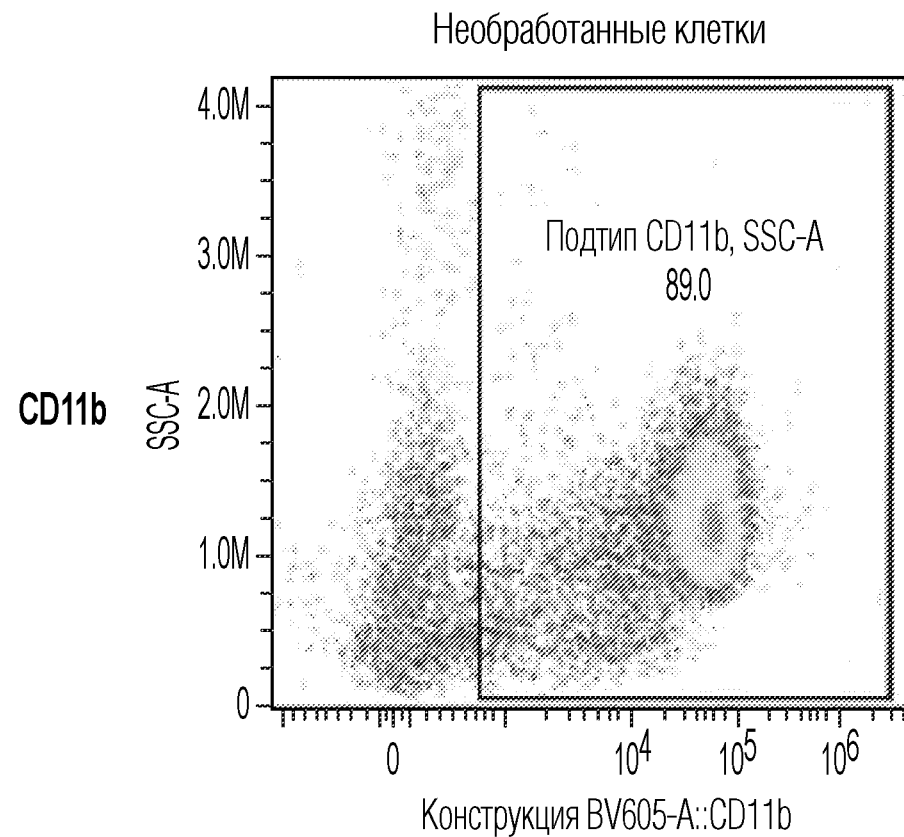
Необработанные A8 K81030, после размораживания, Ab.fcs
Живые, подтип SSC-A
25764



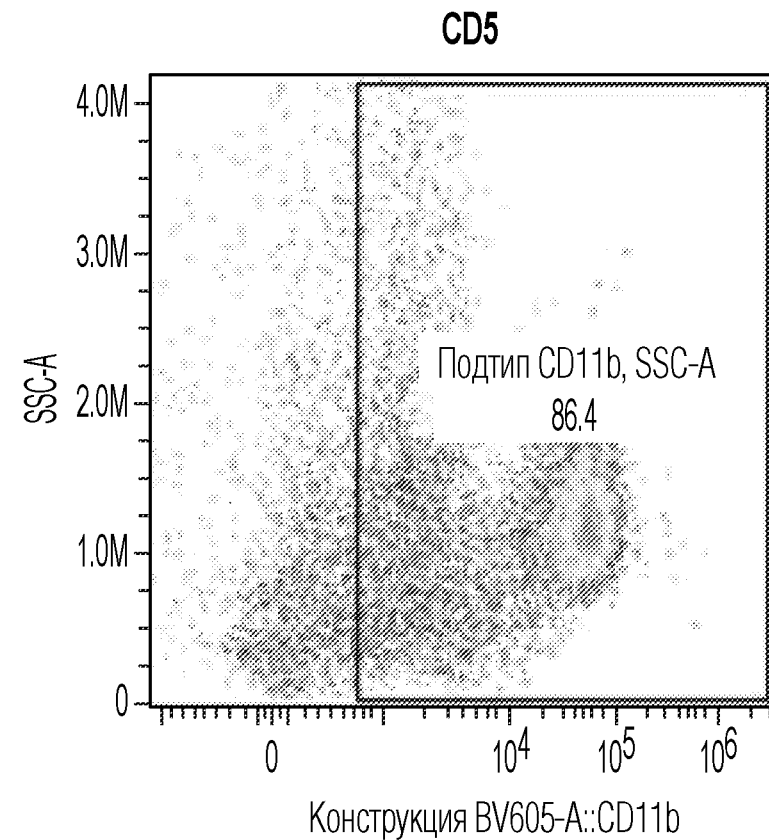
A9 K81030 CDS, после размораживания, Ab.fcs
Живые, подтип SSC-A
16824

69/81

ФИГ. 25А ПРОДОЛЖЕНИЕ



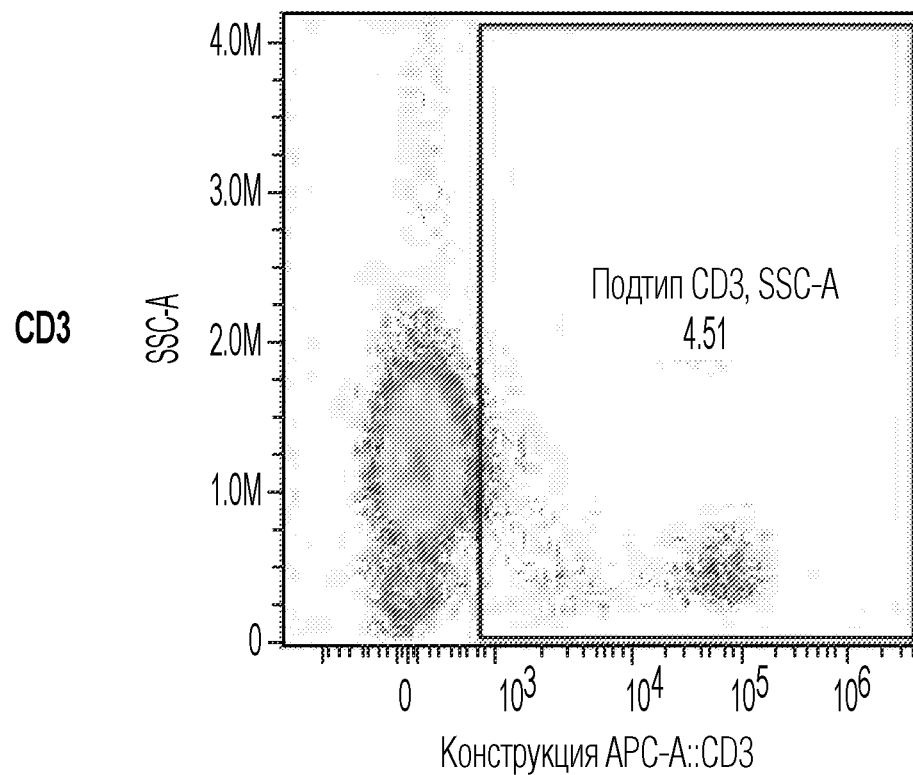
Необработанные A8 K81030, после размораживания, Ab.fcs
Живые, подтип SSC-A
25764



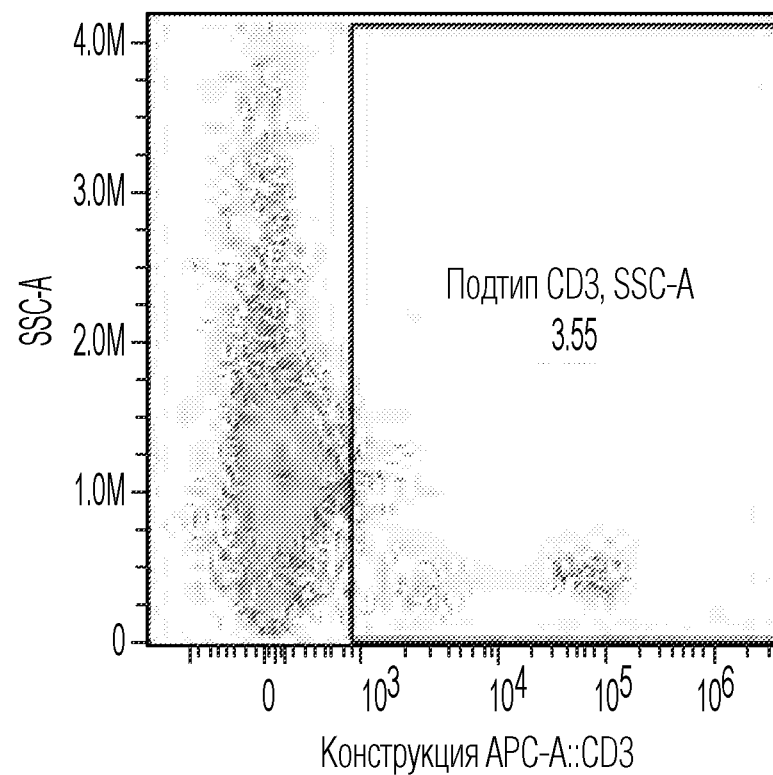
A9 K81030 CDS, после размораживания, Ab.fcs
Живые, подтип SSC-A
16824

70/81

ФИГ. 25В



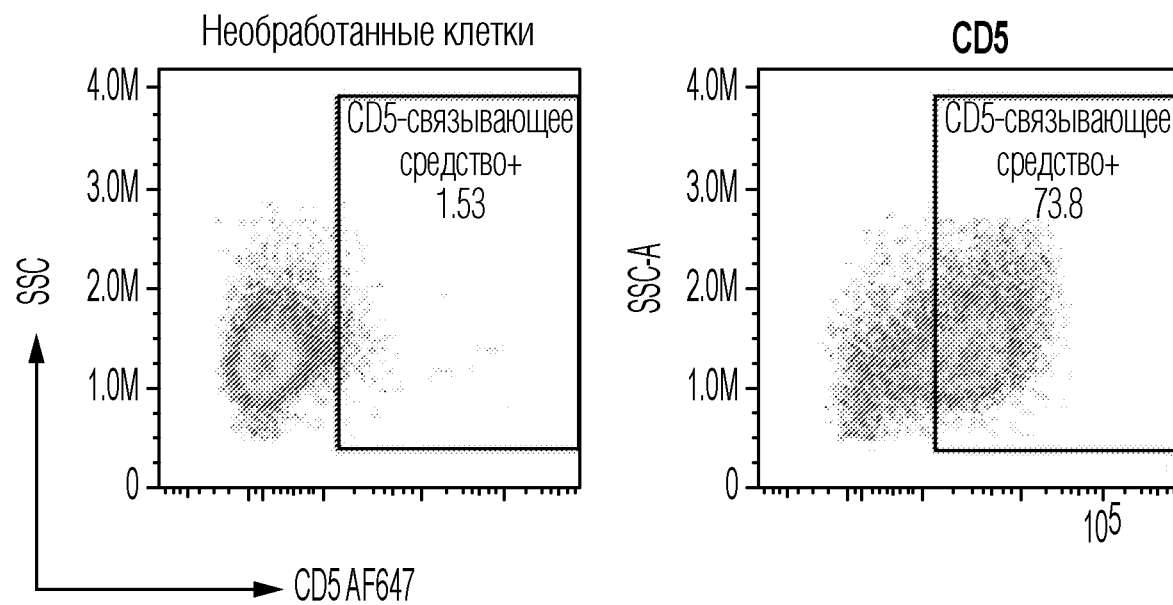
Необработанные A8 K81030, после размораживания, Ab.fcs
Живые, подтип SSC-A
25764



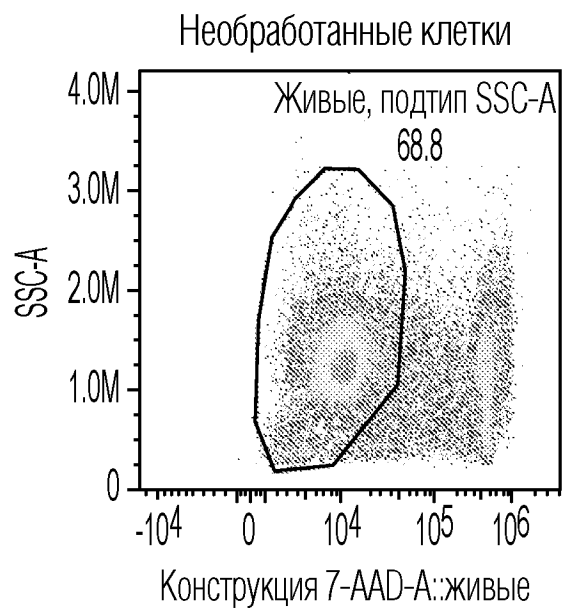
A9 K81030 CDS, после размораживания, Ab.fcs
Живые, подтип SSC-A
25764

71/81

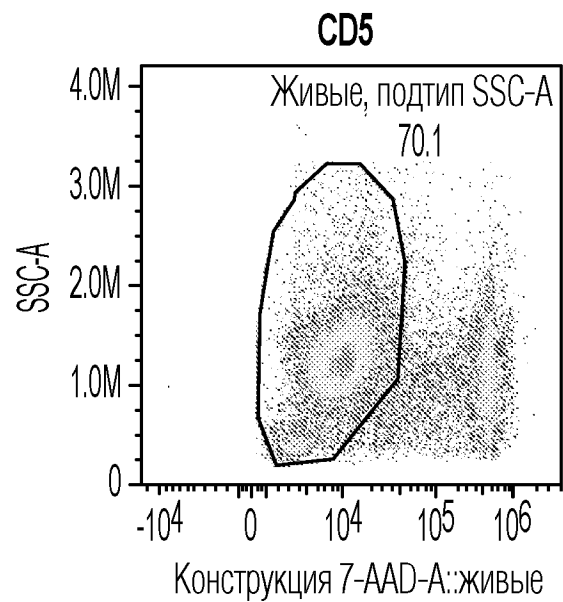
ФИГ. 25В ПРОДОЛЖЕНИЕ



ФИГ. 25С

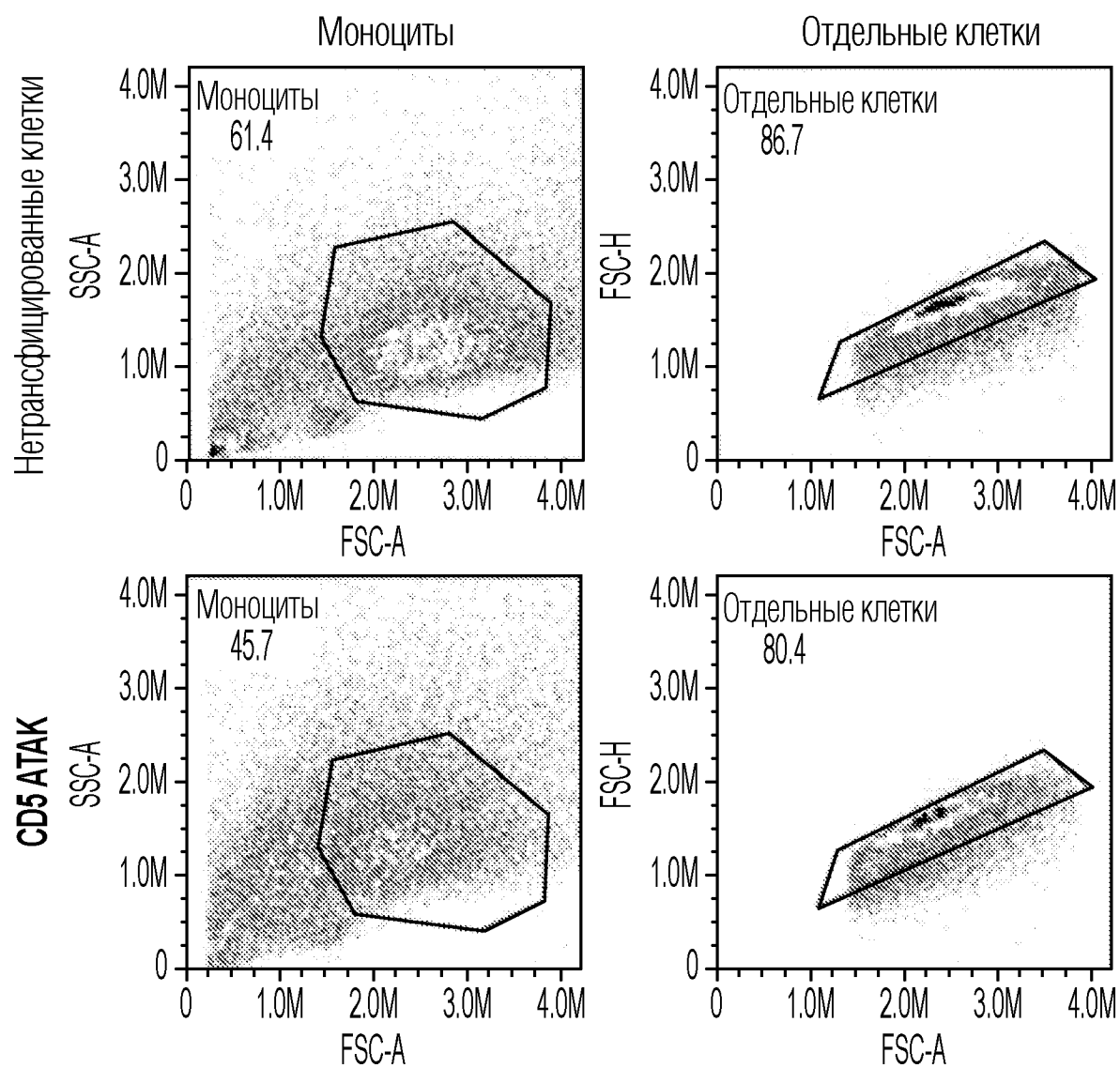


A1, необработанные, FL.fcs
Отдельные клетки
39850

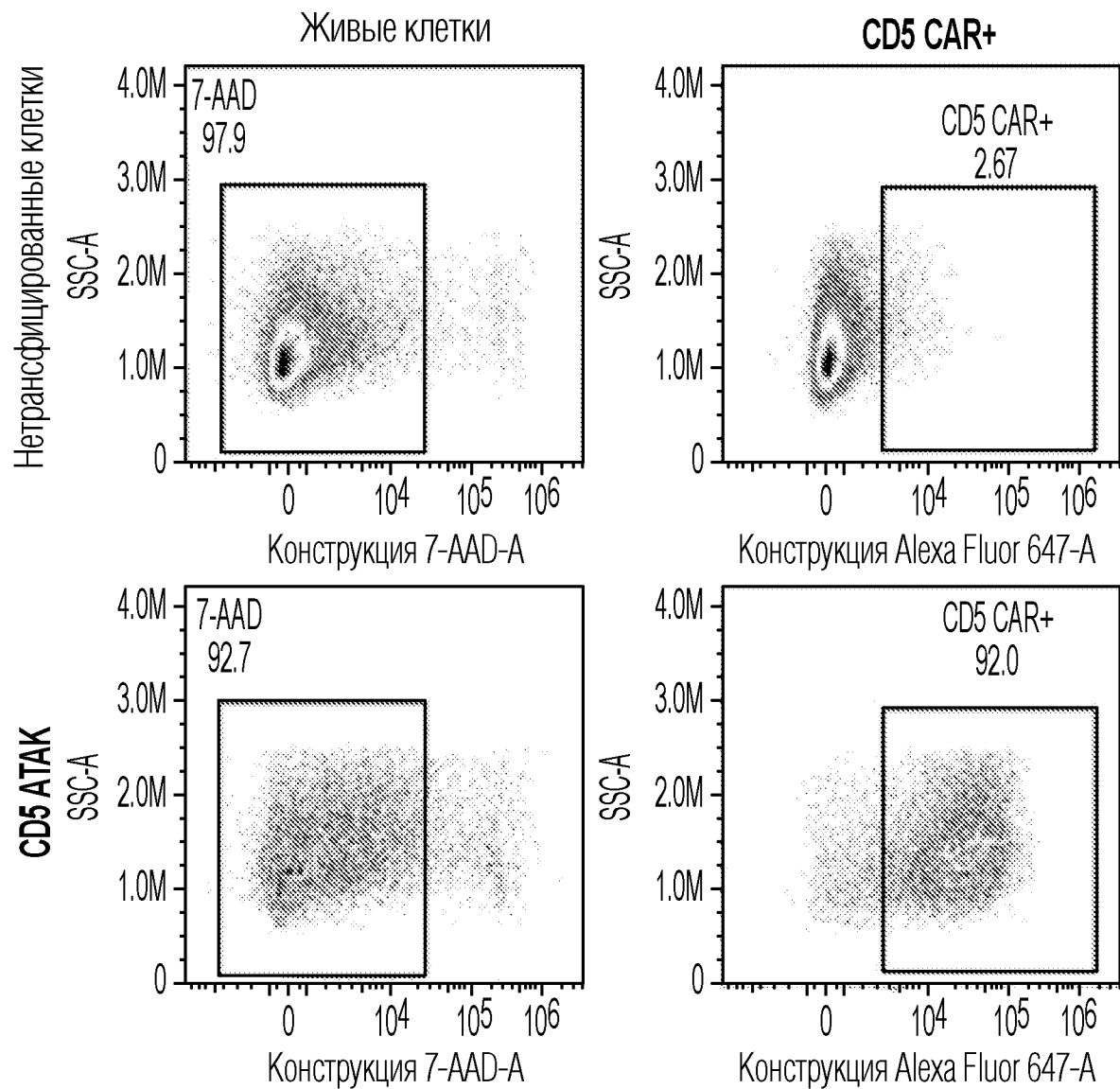


A2, CD5, FL.fcs
Отдельные клетки
33536

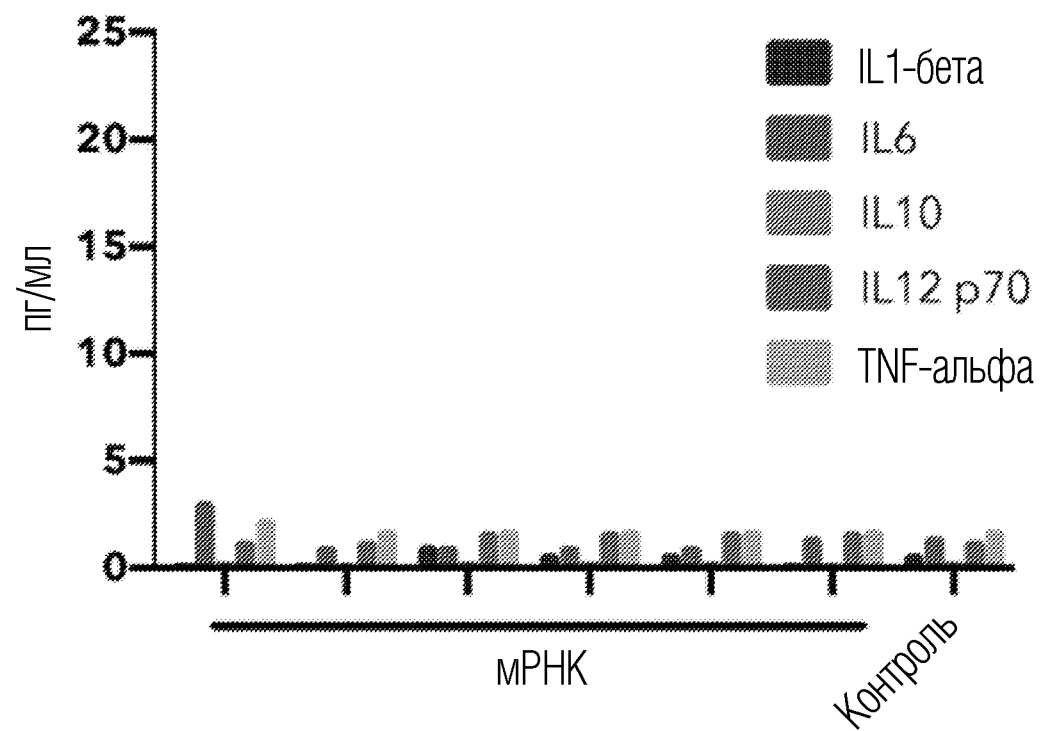
ФИГ. 25D



ФИГ. 26



ФИГ. 26 ПРОДОЛЖЕНИЕ

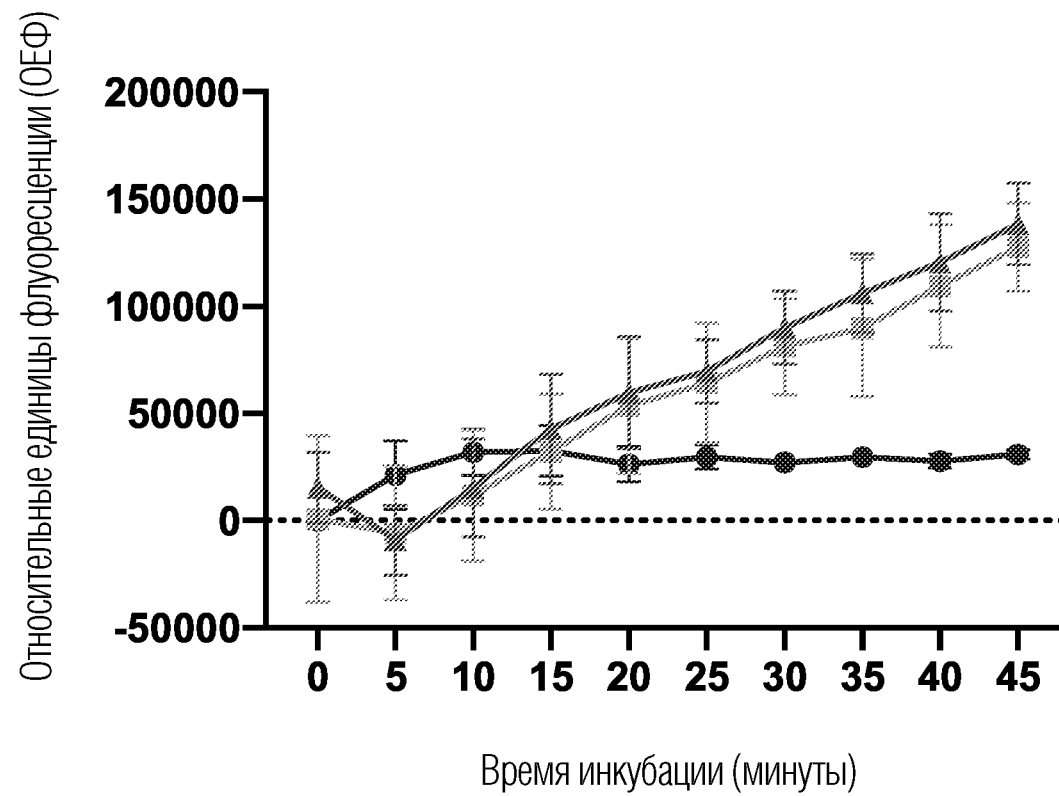


ФИГ. 27А



77/81

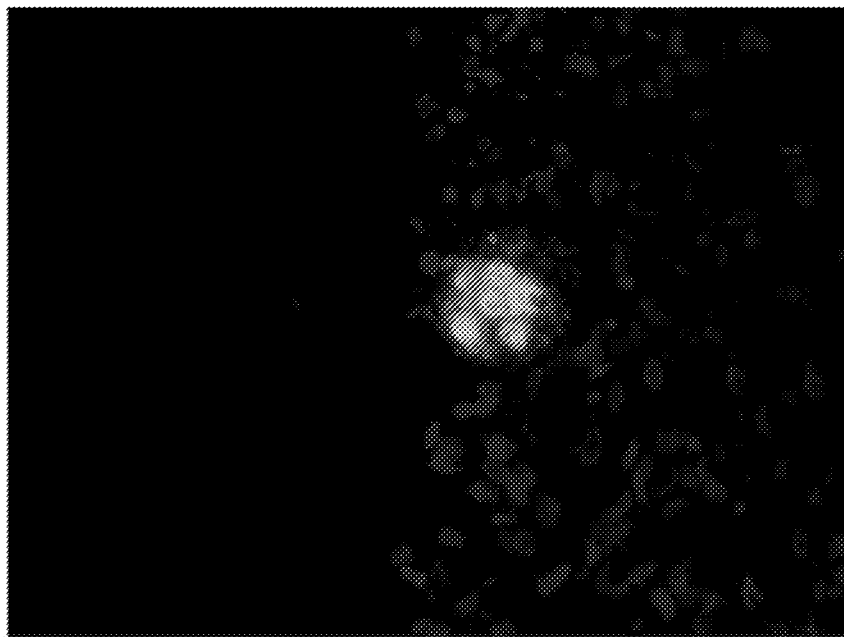
ФИГ. 27В



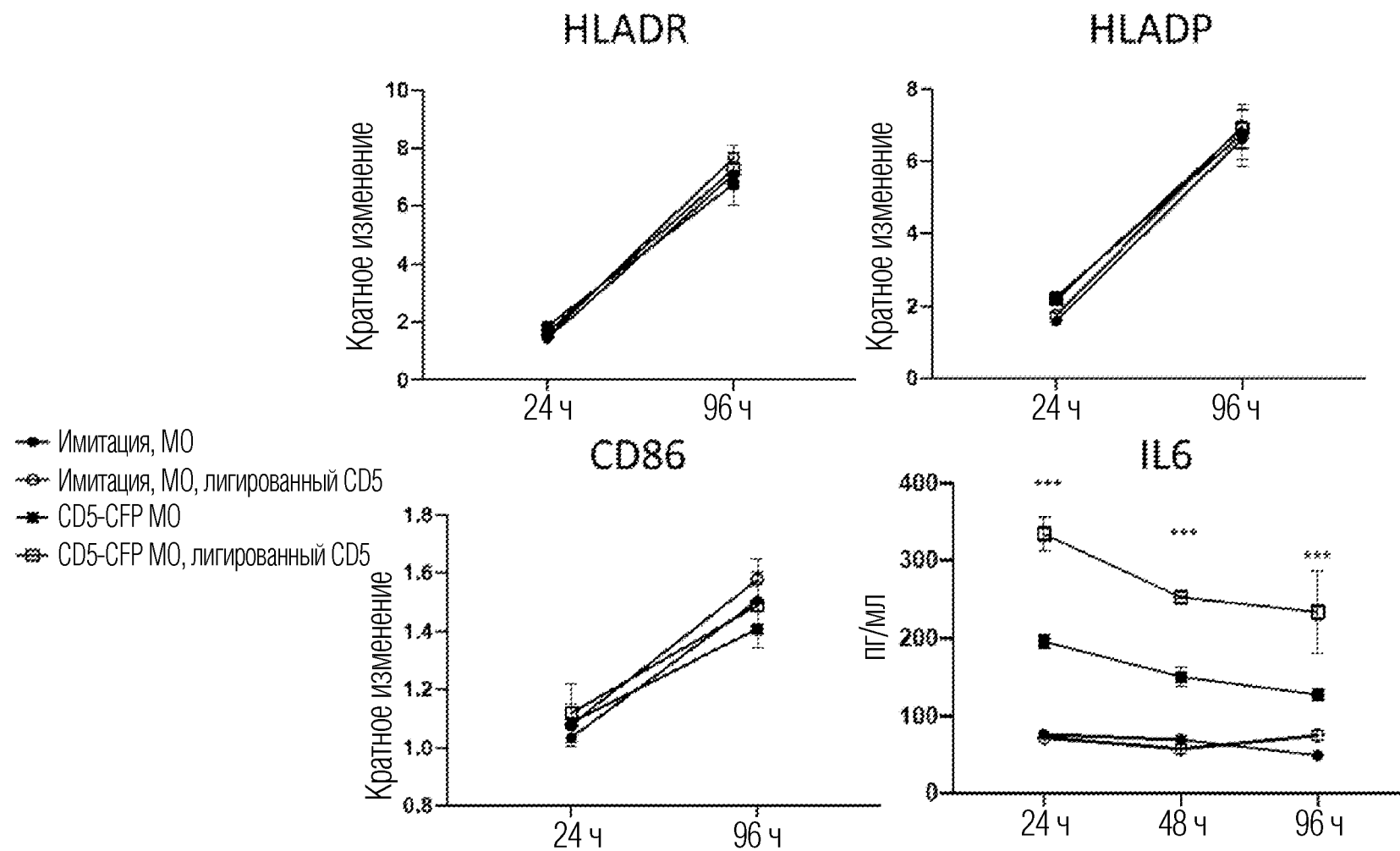
ФИГ. 28

Опухоль MSTO + АТАК-CFSE

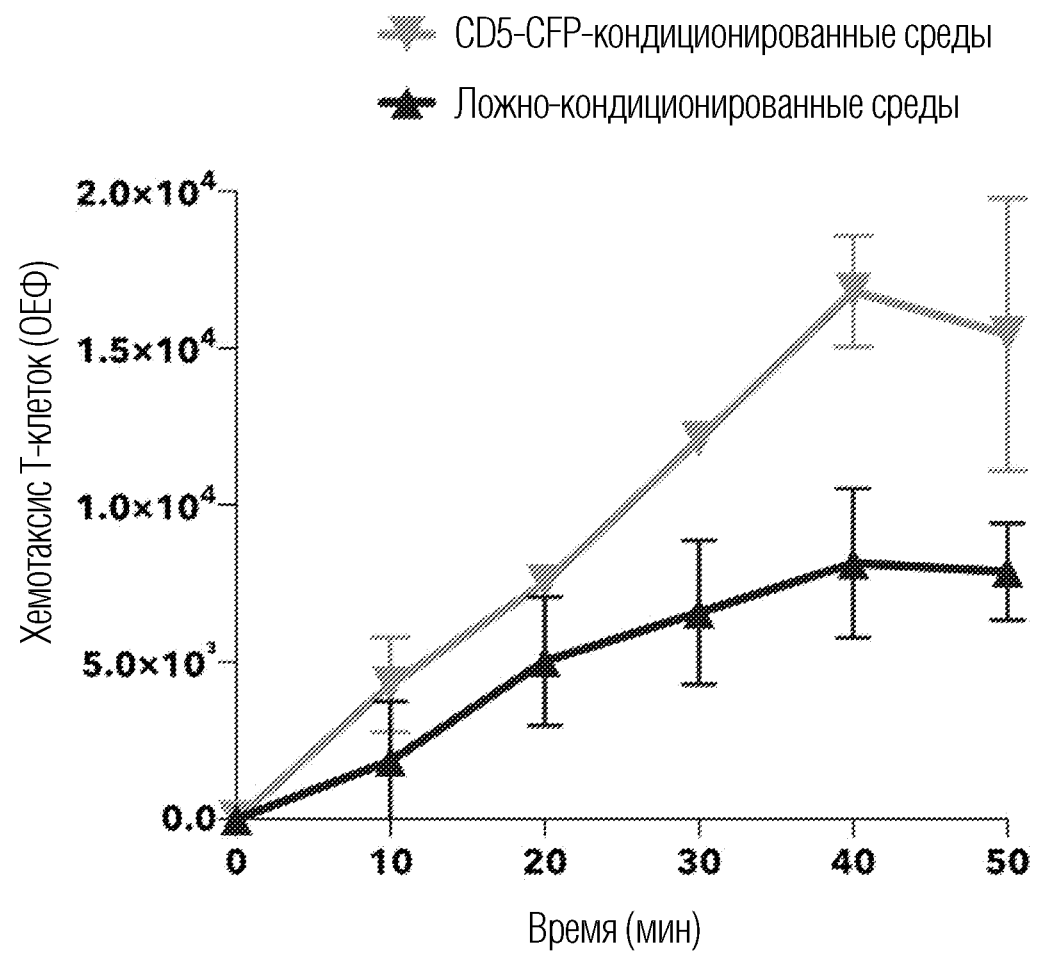
Опухоль (24 часа)



ФИГ. 29



ФИГ. 30



ФИГ. 31