

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293517 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.22

(22) Дата подачи заявки
2021.06.04

(51) Int. Cl. *A61K 35/15* (2015.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

(54) НОВЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

(31) 63/034,873; 63/044,934; 63/082,584

(32) 2020.06.04; 2020.06.26; 2020.09.24

(33) US

(86) PCT/US2021/035991

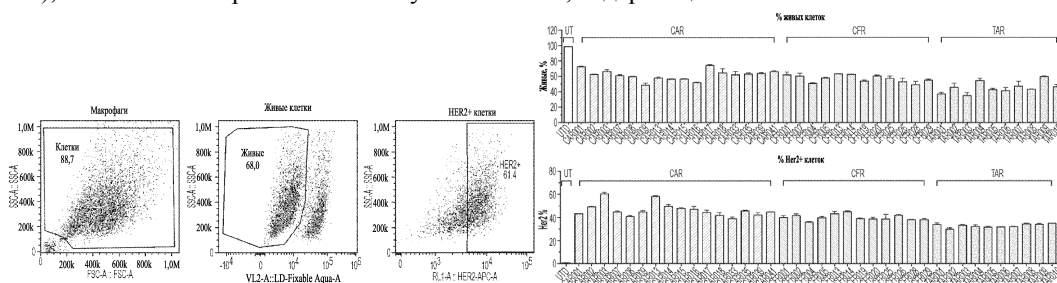
(87) WO 2021/248061 2021.12.09

(71) Заявитель:
КАРИСМА ТЕРАПЬЮТИКС ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Кличински Майкл, Минутоло
Николас, Андерсон Николас (US)

(74) Представитель:
Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф. (RU)

(57) Изобретение относится к иммунным клеткам, содержащим химерные антигенные рецепторы (CAR), и к способам применения иммунных клеток, содержащих CAR.



A1

202293517

202293517

A1

НОВЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительным заявкам на патенты США № 63/034873, поданной 4 июня 2020 г.; 63/044934, поданной 26 июня 2020 г.; и 63/082584, поданной 24 сентября 2020 г.; содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Несмотря на то, что иммунотерапия была исследована для лечения многих заболеваний и расстройств, включая злокачественное новообразование, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз (БАС), системный амилоидоз, прионную болезнь, сердечно-сосудистые заболевания, атеросклероз, фиброз, функциональные ограничения, возникшие проблемы все еще требуют решения.

Поэтому существует необходимость в разработке новых терапевтических методов, оптимизированных для воздействия на специфические антигены.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящее изобретение относится к модифицированным иммунным клеткам, содержащим химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий: (a) внеклеточный домен, (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный домен, причем иммунная клетка включает макрофаг, моноцит или дендритную клетку. Несмотря на то, что различные CAR были разработаны для нескольких типов клеток и для лечения множества показаний, настоящее изобретение охватывает признание того, что максимизация CAR и/или эффекторной активности в моноцитах, макрофагах и/или дендритных клетках требует использования специализированных компонентов CAR. Соответственно, в настоящем изобретении представлено несколько примеров таких CAR и поддерживающих агентов, фрагментов и дополнительных композиций, которые особенно полезны при лечении любого из множества состояний, включая, например, различные злокачественные новообразования, заболевания или нарушения центральной нервной системы (например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и/или БАС), сердечно-сосудистые заболевания, фиброз и другие.

В еще одном аспекте в изобретении предложены способы модификации макрофага, моноцита или дендритной клетки, включающие: доставку в макрофаг, моноцит или дендритную клетку вирусного вектора, содержащего одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих: (a) внеклеточный домен, (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный домен, где вирусный вектор упакован по меньшей мере с одним белком Vprx, где модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка содержат химерный сконструированный рецептор (CAR), содержащий (a)-(c), и где модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка проявляют повышенную экспрессию CAR по сравнению с модифицированными макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой, содержащими CAR, который был доставлен вирусным вектором, кодирующим CAR, который не был упакован по меньшей мере с одним белком Vprx.

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или содержит его. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор доставляется с множественностью заражения (MOI) от около 1 до около 50. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор доставляется с множественностью заражения около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9 или около 10.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка проявляют повышенную экспрессию CAR на около 20%, около 30%, около 40%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90% или более относительно модифицированных макрофага, моноцита или дендритной клетки, содержащих CAR, который был доставлен вирусным вектором, кодирующим CAR, который не был упакован по меньшей мере с одним белком Vprx.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка проявляют экспрессию CAR в течение длительного периода времени по сравнению с немодифицированными макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой. В некоторых вариантах осуществления продленный период времени экспрессии CAR составляет по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 25 дней, по меньшей мере 30 дней или дольше. В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка проявляют повышенную эффекторную активность по сравнению с немодифицированными макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой. В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка

проявляют повышенную способность уничтожать опухоль или фагоцитоз по сравнению с немодифицированными макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка не проявляют повышенную поляризацию к фенотипу M1 по сравнению с макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой, содержащими CAR, в который был доставлен вирусный вектор, кодирующий CAR, который не был упакован по меньшей мере с одним белком V_{px} (например, вектор на основе аденоассоциированного вируса (например, вектор Ad5, например, Ad5f35)). В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка не проявляют повышенную экспрессию одного или более маркеров фенотипа M1 по сравнению с макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой, содержащими CAR, в который был доставлен вирусный вектор, кодирующий CAR, который не был упакован по меньшей мере с одним белком V_{px} (например, вектор на основе аденоассоциированного вируса (например, вектор Ad5, например, Ad5f35)). В некоторых вариантах осуществления один или более маркеров фенотипа M1 включают или представляют собой один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 из CD86, CD80, MHC II, IL-1R, TLR2, TLR4, iNOS, SOCS3, CD83, PD-L1, CD69, MHC I, CD64, CD32, CD16, IL1R, члена семейства IFIT или члена семейства ISG.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка проявляют повышенную продукцию одного или более воспалительных цитокинов по сравнению с немодифицированными макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой. В некоторых вариантах осуществления один или более воспалительных цитокинов включают или представляют собой один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11 или 12 из TNF α , IL-6, IL-1a, IL-1b, IL-12, IL-18, IL-8, IL-2, IL-23, IFN α , IFN β , IFN γ , IL-2, IL-8, IL33, CCL3, CXCL12, CCL22, CCL4, CXCL10, или CCL2.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка проявляют сниженную активность SIRP α по сравнению с немодифицированными макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой. В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка имеют делецию SIRP α с использованием одной или более эндонуклеаз. В некоторых вариантах осуществления одна или более эндонуклеаз включают или представляют собой одну или более систем CRISPR/Cas, нуклеазу с цинковыми пальцами (ZFN), нуклеазу на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В

некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas содержит Cas9, Cas12a или C2c2. В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритную клетку обрабатывали одним или более антителами к SIRP α . В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка содержат одно или более антител к SIRP α . В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка содержат одну или более кНПК, которые снижают количество SIRP α .

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CAR содержит один или более антигенсвязывающих доменов и внеклеточный домен FcR, и/или трансмембранный домен CAR включает трансмембранный домен FcR, и/или внутриклеточный домен CAR содержит внутриклеточный домен FcR. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит от N-конца к С-концу один или более внеклеточных связывающих доменов, внеклеточный домен FcR, трансмембранный домен FcR и внутриклеточный домен FcR. В некоторых вариантах осуществления один или более из внеклеточного домена FcR, трансмембранного домена FcR и внутриклеточного домена FcR представляют собой или включают домен FcR человека. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен FcR, трансмембранный домен FcR и внутриклеточный домен FcR вместе составляют полноразмерный FcR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен FcR содержит домен CD64 (Fc γ RI), CD32a (Fc γ RIIa), CD32b (Fc γ RIIb), CD32c, CD16a (Fc γ RIIIa), CD16b (Fc γ RIIIb), Fc ϵ RI, Fc ϵ RII, или Fc α RI (CD89). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен FcR содержит домен CD64 (Fc γ RI), CD32a (Fc γ RIIa), CD32b (Fc γ RIIb), CD32c, CD16a (Fc γ RIIIa), CD16b (Fc γ RIIIb), Fc ϵ RI, Fc ϵ RII, или Fc α RI (CD89). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен FcR содержит домен CD64 (Fc γ RI), CD32a (Fc γ RIIa), CD32b (Fc γ RIIb), CD32c, CD16a (Fc γ RIIIa), CD16b (Fc γ RIIIb), Fc ϵ RI, Fc ϵ RII, или Fc α RI (CD89).

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CAR содержит один или более антигенсвязывающих доменов и внеклеточный домен Toll-подобного рецептора (TLR), и/или трансмембранный домен CAR включает трансмембранный домен TLR и/или внутриклеточный домен CAR включает внутриклеточный домен TLR. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит от N-конца к С-концу один или более внеклеточных связывающих доменов, внеклеточный домен TLR, трансмембранный домен TLR и внутриклеточный домен TLR. В некоторых вариантах осуществления один или более из внеклеточного домена TLR, трансмембранного домена TLR и внутриклеточного домена TLR представляют собой или включают домен TLR человека. В некоторых

вариантах осуществления внеклеточный домен TLR, трансмембранный домен TLR и внутриклеточный домен TLR вместе составляют полноразмерный TLR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TLR включает домен TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 или TLR9. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен TLR включает домен TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, или TLR9. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен TLR включает домен TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 или TLR9.

В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор дополнительно содержит один или более из: (d) одного или более внеклеточных лидерных доменов, (e) одного или более внеклеточных шарнирных доменов и (f) одного или более внутриклеточных костимулирующих доменов. В некоторых вариантах осуществления один или более внеклеточных лидерных доменов содержат внеклеточный лидерный домен CD8.

В некоторых вариантах осуществления один или более внеклеточных антигенсвязывающих доменов включают scFv, центирин или дарпин.

В некоторых вариантах осуществления один или более внеклеточных шарнирных доменов включают внеклеточный шарнирный домен CD28, внеклеточный шарнирный домен CD8a или внеклеточный шарнирный домен IgG4.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD28, CD8a, CD64, CD32a, CD32c, CD16a, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, или TLR9.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит один или более внутриклеточных сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления один или более внутриклеточных сигнальных доменов включают внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета, FcR γ , CD64, CD32a, CD32c, CD16a, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, ALK, AXL, DDR2, EGFR, EphA1, INSR, cMET, MUSK, PDGFR, PTK7, RET, ROR1, ROS1, RYK, TIE2, TRK, VEGFR, CD40, CD19, CD20, 41BB, CD28, OX40, GITR, TREM-1, TREM-2, DAP12, MR, ICOS, MyD88, V/I/LxYxxL/V, SIRPa, CD45, Siglec-10, PD1, SHP-1, SHP-2, KIR-2DL, KIR-3DL, NKG2A, CD170, CD33, BTLA, CD32b, SIRPb, CD22, PIR-B, LILRB1, 41BBL (TNFSF9), CD27, OX40L, CD32b, CD11b, ITGAM, SLAMF7, CD206, CD163, CD209, дектин-2, IL1R, IL2R, IL3R, IL4R, IL5R, IL6R, IL7R, IL8R, IL9R, IL10R, IL11R, IL12R, IL13R, IL14R, IL15R, IL17R, IFN α R, IFN γ R, TNFR, CSF1R, CSF2R, Dap10, CD36, дектин-1, ICOSL и/или Syk. В некоторых вариантах осуществления

один или более внутриклеточных сигнальных доменов содержат по меньшей мере один внутриклеточный костимулирующий домен.

В еще одном аспекте в изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие иммунную клетку в соответствии с любым аспектом или вариантом осуществления, описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В еще одном аспекте в изобретении предложены конструкции нуклеиновых кислот (например, вирусные векторы), содержащие одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих: (a) внеклеточный домен, (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный домен, где конструкция нуклеиновой кислоты кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий (a)-(c). В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих: (e) один или более внеклеточных лидерных доменов, (f) один или более внеклеточных шарнирных доменов, (g) один или более внутриклеточных костимулирующих доменов, (h) расщепляемый пептид и (i) один или более пептидных средств. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид представляет собой или включает пептид P2A, F2A, E2A или T2A.

В еще одном аспекте в изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты в соответствии с любым аспектом или вариантом осуществления, описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В еще одном аспекте в изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие макрофаг, моноцит или дендритную клетку, модифицированную способом согласно любому аспекту или варианту осуществления, описанному в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В еще одном аспекте в изобретении предложены способы лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающие: доставку субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции в соответствии с любым аспектом или вариантом осуществления, описанным в данном документе.

В еще одном аспекте в изобретении предложены способы модификации иммунной клетки, причем способ включает: доставку в иммунную клетку конструкции нуклеиновой кислоты,

содержащей одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих: (а) внеклеточный домен, (b) трансмембранный домен, и (с) внутриклеточный домен, где модифицированная иммунная клетка содержит химерный сконструированный рецептор, содержащий (а)-(с), и где модифицированная иммунная клетка включает макрофаг, моноцит или дендритную клетку.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка проявляют сниженную активность $SIRP\alpha$ по сравнению с немодифицированными макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой. В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка содержат или экспрессируют по меньшей мере один CAR, содержащий один, два, три или четыре scFv к HER2, шарнир CD8, трансмембранный домен CD8 или внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CAR содержит сигнальный пептид CD8a. В некоторых вариантах осуществления доставка конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей (а)-(с), в модифицированные макрофаг, моноцит или дендритную клетку включают трансдукцию вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор включает или представляет собой аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса или ретровирусный вектор (например, лентивирусный вектор или гаммаретровирусный вектор). В некоторых вариантах осуществления вектор на основе аденоассоциированного вируса включает или представляет собой вектор Ad5 (например, вирусный вектор Ad5f35).

В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка имеют делецию $SIRP\alpha$ с использованием одной или более эндонуклеаз. В некоторых вариантах осуществления одна или более эндонуклеаз включают или представляют собой одну или более систем CRISPR/Cas, нуклеазу с цинковыми пальцами (ZFN), нуклеазу на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas содержит один или более из Cas9, Cas12a или C2c2. В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритную клетку обрабатывали одним или более антителами к $SIRP\alpha$. В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка содержат одно или более антител к $SIRP\alpha$. В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка содержат одну или более кпНК, которые снижают количество $SIRP\alpha$.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Графические материалы предназначены только для иллюстрации, а не для ограничения.

На Фиг. 1A-1B представлены графики, демонстрирующие экспрессию HER2 макрофагами, трансфицированными описанными в данном документе конструкциями (см. Фиг. 8-44). Процент живых клеток и экспрессия CAR:HER2 показаны на точечных диаграммах для выбранных образцов (Фиг. 1A) и для всех образцов (Фиг. 1B).

На Фиг. 2A-2B представлены графики, демонстрирующие экспрессию HER2 моноцитами, трансфицированными описанными в данном документе конструкциями (см. Фиг. 8-44). Процент живых клеток и экспрессия CAR: HER2 показаны на точечных диаграммах для выбранных образцов (Фиг. 2A) и для всех образцов (Фиг. 2B).

На Фиг. 3A-3D представлены графики, демонстрирующие экспрессию CAR, процент CAR⁺, процент живых клеток и способность CAR-макрофагов уничтожать опухоли.

На Фиг. 4A-4C представлены графики, демонстрирующие экспрессию химерного FcR (CFR) и Toll-подобного антигенного рецептора (TAR), процент CFR⁺ и TAR⁺ и процент живых CFR⁻ и TAR-макрофагов.

На Фиг. 5A-5B представлены графики, демонстрирующие способность уничтожать опухоль (Фиг. 5A) и индукцию экспрессии маркеров M1 и M2 (Фиг. 5B) после инкубации макрофагов и CAR-макрофагов с лигандом CD40 (CD40L).

На Фиг. 6A-6B представлены графики, демонстрирующие способность уничтожать опухоли (Фиг. 6A) и индукцию экспрессии маркеров M1 и M2 (Фиг. 6B) после инкубации макрофагов и CAR-макрофагов с 4-1BB.

На Фиг. 7A-7B представлены графики, демонстрирующие способность к уничтожению (Фиг. 7A) и индукцию экспрессии маркеров M1 и M2 (Фиг. 7B) после инкубации макрофагов и CAR-макрофагов с лигандом 4-1BB (4-1BBL).

На Фиг. 8-117 представлены схемы иллюстративных конструкций химерного антигенного рецептора (CAR), включая конструкции, показанные на приведенных выше фигурах.

На Фиг. 118 представлен график, демонстрирующий процент живых CAR-макрофагов, экспрессирующих CAR029, CAR061, CAR062, CAR063, CAR064, CAR071, CAR072, CAR074, CAR074, CAR077, CAR078, CAR079, CAR080, и CAR081.

На Фиг. 119 представлены график, демонстрирующий процент экспрессии CAR для макрофагов, трансфицированных CAR029, CAR061, CAR062, CAR063, CAR064, CAR071, CAR072, CAR074, CAR074, CAR077, CAR078, CAR079, CAR080, и CAR081.

На Фиг. 120 представлен график, показывающий интенсивность (СИФ) экспрессии CAR для макрофагов, трансфицированных CAR029, CAR061, CAR062, CAR063, CAR064, CAR071, CAR072, CAR074, CAR074, CAR077, CAR078, CAR079, CAR080, и CAR081.

На Фиг. 121A-121F показаны иллюстративные графики, иллюстрирующие жизнеспособность CAR-макрофагов (**Фиг. 121A** и **Фиг. 121C**), среднюю интенсивность флуоресценции указанного поверхностного маркера (**Фиг. 121B**, **Фиг. 121D**, **Фиг. 121E** и **Фиг. 121F**) после обработки цитокинами.

На Фиг. 122 показан иллюстративный график, иллюстрирующий постоянство экспрессии CAR в макрофагах, обработанных цитокином интерфероном.

На Фиг. 123A и **123B** показаны иллюстративные графики, иллюстрирующие жизнеспособность CAR-макрофагов, экспрессию CAR и среднюю интенсивность флуоресценции (**Фиг. 123A**) и индукцию маркеров M1 (**Фиг. 123B**) после трансфекции мРНК CAR и обработки различными концентрациями IFN- β .

На Фиг. 124A и **124B** показаны иллюстративные графики, иллюстрирующие среднюю интенсивность флуоресценции маркера CAR-макрофагов M2 и M1 через два дня (**Фиг. 124A**) или семь дней (**Фиг. 124B**) после электропорации мРНК CAR и обработки IFN- β .

На Фиг. 125A-125C показаны иллюстративные графики, иллюстрирующие противоопухолевую функцию CAR-макрофагов. **На Фиг. 125A** показаны результаты для макрофагов, трансфицированных мРНК CAR, с праймированием или без праймирования различными концентрациями IFN- β . **На Фиг. 125B** показаны результаты для макрофагов, трансфицированных мРНК CAR, включающей множество модификаций, и обработанных IFN- β . **На Фиг. 125C** показаны результаты для макрофагов, трансфицированных мРНК CAR и обработанных цитокинами интерферонами.

На Фиг. 126 показан иллюстративный график, иллюстрирующий влияние обработки CAR-макрофагов интерферонами на секрецию цитокинов.

На Фиг. 127A-127C показаны иллюстративные графики, иллюстрирующие влияние обработки интерферонами на устойчивость мРНК CAR в макрофагах и продолжительность функциональности CAR-макрофагов. **На Фиг. 127A** показаны результаты тестов на жизнеспособность CAR-макрофагов, которые были обработаны цитокинами интерферонами, и экспрессию CAR в них. **На Фиг. 127B** и **Фиг. 127C** показаны результаты роста опухоли из раковых клеток, культивированных с макрофагами, которых подвергали электропорации мРНК CAR и обрабатывали цитокинами интерферонами.

На Фиг. 128А-128С показаны иллюстративные графики, иллюстрирующие влияние лечения интерферонами на жизнеспособность макрофагов, экспрессию CAR, экспрессию маркера M1 и функциональность CAR-макрофагов. **На Фиг. 128А** показана жизнеспособность, экспрессия CAR и экспрессия маркера M1 макрофагов, трансфицированных мРНК CAR и обработанных интерферонами. **На Фиг. 128В** и **Фиг. 128С** показаны результаты уничтожения опухоли из раковых клеток, культивированных с макрофагами, которых подвергали электропорации мРНК CAR и обрабатывали цитокинами интерферонами.

На Фиг. 129 показан иллюстративный график, иллюстрирующий влияние IFN- γ на трансфицированные макрофаги.

На Фиг. 130А-130С показаны иллюстративные графики, иллюстрирующие действие ингибиторов РНКазы L на макрофаги CAR. **На Фиг. 130А** показана экспрессия mCherry в трансфицированных макрофагах после обработки IFN- γ и ингибитором РНКазы L сунитинибом. **На Фиг. 130В** показана кривая роста опухоли для раковых клеток, культивируемых с CAR-макрофагами, обработанными сунитинибом. **На Фиг. 130С** показана активность уничтожения опухоли CAR-макрофагами, обработанными сунитинибом.

На Фиг. 131 показаны иллюстративные графики, иллюстрирующие жизнеспособность макрофагов, совместно трансфицированных мРНК, кодирующей mCherry, и мРНК, кодирующей ингибитор РНКазы L ABCE1, и экспрессия mCherry в них.

На Фиг. 132 представлена схема иллюстративной конструкции CAR, содержащей шарнирный домен CD28.

На Фиг. 133А-133Е представлены графики, демонстрирующие процентное содержание CAR+, экспрессию CAR, процентное содержание живых CAR-макрофагов и их способность уничтожать опухоль.

На Фиг. 134 показан график, демонстрирующий секрецию TNF α и IL6 CAR-макрофагами.

На Фиг. 135 представлена схема иллюстративной конструкции CAR.

На Фиг. 136 представлен график, демонстрирующий экспрессию конструкции CAR (CTX_001, содержащей scFv к HER2, шарнир CD8, трансмембранный домен CD8 и сигнальный домен CD3-дзета; **Фиг. 8**) в макрофагах, трансдуцированных VPH-лентивирусом и без него при MOI 0-50. В качестве контроля использовали нетрансдуцированные (UTD) макрофаги.

На Фиг. 137 представлена серия графиков, демонстрирующих жизнеспособность (живые %) и экспрессию CAR (CAR %) CTX_001 в макрофагах, трансдуцированных VPX-лентивирусом в течение 30 дней при MOI 1, MOI 5 и MOI 10. UTD макрофаги использовали в качестве контроля.

На Фиг. 138 представлена серия графиков, демонстрирующих экспрессию поверхностного белка CTX_001 с использованием α -трастузумаб-AF647 в макрофагах, трансдуцированных VPX-лентивирусом, при MOI 1, MOI 5 и MOI 10 на 4, 7, 15, 22 и 29 дни после трансдукции. UTD макрофаги использовали в качестве контроля.

На Фиг. 139 представлена серия графиков, демонстрирующих среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) жизнеспособности (живые клетки) и экспрессию CAR (CAR+) CTX_001 в макрофагах, трансдуцированных VPX-лентивирусом в течение 30 дней, при MOI 1, MOI 5 и MOI 10. UTD макрофаги использовали в качестве контроля.

На Фиг. 140 представлена серия графиков, демонстрирующих функцию уничтожения CTX_001 на макрофагах, трансдуцированных VPX-лентивирусом при MOI 1, MOI 5 и MOI 10 через 4 и 7 дней. Различное соотношение эффекторных макрофагов к опухолевым клеткам-мишеням (Е:Т) составляло 4:1, 2:1, 1:1 и 1:2. Интегральная интенсивность свидетельствует об опухолевой массе. Результаты после 72 часов совместного культивирования опухолевых клеток и макрофагов представлены в виде графика. Контролем были UTD макрофаги и HER2+ клетки рака молочной железы AU565 без макрофагов.

На Фиг. 141А-141В представлена серия графиков, демонстрирующих экспрессию поверхностных белков CTX_001 и CTX_003 (CAR, содержащий scFv к HER2, шарнир CD8 и трансмембранный домен CD8; **Фиг. 10**), по оценке с использованием α -трастузумаб-AF647 в макрофагах, трансдуцированных лентивирусом VPX при MOI 2 и MOI 5 (**Фиг. 141А**), демонстрирующие жизнеспособность (живые %) и экспрессию CAR (CAR %) CTX_001 и CTX_003 в макрофагах, трансдуцированных VPX-лентивирусом при MOI 2 и MOI 5 (**Фиг. 141В**). UTD макрофаги использовали в качестве контроля.

На Фиг. 142 представлена серия графиков СИФ, демонстрирующих жизнеспособность (живые клетки) и экспрессию CAR (CAR+) CTX_001 и CTX_003 в макрофагах, трансдуцированных VPX-лентивирусом при MOI 2 и MOI 5 при оценке с использованием α -трастузумаб-AF647. UTD макрофаги использовали в качестве контроля.

На Фиг. 143 представлена серия графиков MFI маркеров макрофагов M2 (CD163 и CD206) и маркеров макрофагов M1 (CD80 и CD86) макрофагов CTX_001 и CTX_003,

трансдуцированных VPX-лентивирусом при MOI 2 и MOI 5. UTD макрофаги использовали в качестве контроля.

На Фиг. 144 представлена серия графиков, демонстрирующих M1 поляризацию макрофагов CTX_001, трансдуцированных VPX-лентивирусом, по сравнению с трансдукцией Ad5f35, оцененную с использованием CD80 и CD86. UTD макрофаги использовали в качестве контроля.

На Фиг. 145 представлена серия графиков, демонстрирующих функцию уничтожения макрофагами CTX_001, трансдуцированными VPX-лентивирусом или Ad5f35, в отношении клеток карциномы яичника SKOV3 через 7 дней после трансдукции и через 21 день после трансдукции. Соотношение E:T было 4:1. UTD макрофаги и клетки SKOV3 без макрофагов использовали в качестве контроля.

На Фиг. 146 представлена серия графиков, демонстрирующих функцию уничтожения макрофагами CTX_001 и CTX_003, трансдуцированными VPX-лентивирусом при MOI 2 и MOI 5 для клеток AU565 в течение 72 часов. Различные соотношения E:T составляли 4:1 и 1:2. UTD макрофаги и клетки AU565 без макрофагов использовали в качестве контроля.

На Фиг. 147 представлена серия графиков, демонстрирующих функцию уничтожения макрофагами CTX_001 и CTX_003, трансдуцированными VPX-лентивирусом, при MOI 2 и MOI 5 для клеток карциномы яичника SKOV3. Соотношение E:T было 4:1. UTD макрофаги и клетки SKOV3 без макрофагов использовали в качестве контроля.

На Фиг. 148 представлена серия графиков, демонстрирующих выработку TNF α и IL-6 макрофагами CTX001 или CTX_003, трансдуцированными VPX-лентивирусом при MOI 2 и MOI 5 и культивируемых с HER2, связанным с планшетом, или без него в течение 24 часов. UTD макрофаги использовали в качестве контроля.

На Фиг. 149 представлена серия графиков, демонстрирующих жизнеспособность (% живых) и экспрессию CAR (CAR+%) CTX_001 и CTX_003 в макрофагах, трансдуцированных VPX-лентивирусом, при MOI 2 и MOI 5 в течение 21 дня. UTD макрофаги использовали в качестве контроля.

На Фиг. На 150 представлена серия графиков СИФ, демонстрирующих жизнеспособность (живые клетки) и экспрессию CAR (CAR+) CTX_001 и CTX_003 в макрофагах, трансдуцированных VPX-лентивирусом при MOI 2 и MOI 5 в течение 21 дня при оценке с использованием α -трастузумаб-AF647. UTD макрофаги использовали в качестве контроля.

На Фиг. 151 представлена серия графиков, демонстрирующих функцию уничтожения макрофагами CTX_001 и CTX_003, трансдуцированными VPX-лентивирусом при MOI 2 и

МОИ 5, в отношении клеток AU565, инициированных через 21 день после трансдукции и через 72 часа. Различные соотношения Е:Т составляли 4:1 и 1:2. UTD макрофаги использовали в качестве контроля.

На Фиг. 152 представлена серия графиков, демонстрирующих функцию уничтожения макрофагами CTX_001 и CTX_003, трансдуцированными VPX-лентивирусом при МОИ 2 и МОИ 5, в отношении клеток SKOV3, инициированных через 21 день после трансдукции и через 72 часа. Соотношение Е:Т было 4:1. UTD макрофаги использовали в качестве контроля.

На Фиг. 153A-D представлена серия графиков, демонстрирующих жизнеспособность (**Фиг. 153A**), экспрессию CAR в процентах (**Фиг. 153B**), СИФ для экспрессии CAR (**Фиг. 153C**) и гистограммы экспрессии CAR (**Фиг. 153D**) после трансдукции CD14⁺ моноцитов с помощью CTX_001 с использованием VPX-лентивируса при МОИ 2, 5 или 10. Трансдуцированные Ad5f35 CAR-моноциты и CAR-макрофаги показаны в качестве компаратора. UTD макрофаги также использовали в качестве контроля для гистограмм экспрессии CAR.

На Фиг. 154A-D представлена серия графиков, демонстрирующих нокаут SIRP α в макрофагах CTX_001 у двух доноров по оценке SIRP α -APC % POS (**Фиг. 154A**) и СИФ (**Фиг. 154B**), проточной цитометрии (**Фиг. 154C**), и жизнеспособности клеток (**Фиг. 154D**). Концентрации рибонуклеопротеина (РНП) составляли 165, 312, 625 и 1250 нМ, за исключением проточной цитометрии (312 и 1250 нМ). В качестве контроля использовали необработанные (NT) CAR-макрофаги или только Cas9.

На Фиг. 155A-D представлена серия графиков, демонстрирующих нокаут SIRP α в макрофагах CTX_001 с помощью Cas9 и нРНК, нацеленных на SIRP α , согласно проточной цитометрии (**Фиг. 155A**), экспрессии CTX_001 в макрофагах, нокаутированных по SIRP α , согласно проточной цитометрии (**Фиг. 155B**), фагоцитоз макрофагами CTX_001 с нокаутом SIRP α клеток карциномы яичника SKOV-3 в течение 12 часов (**Фиг. 155C**) и общий фагоцитоз, измеренный в течение 12 часов, количественно выраженный в виде площади под кривой (**Фиг. 155D**). В качестве контроля использовали необработанные (NT) CAR-макрофаги, только нРНК и UTD макрофаги.

На Фиг. 156A-D представлена серия графиков, демонстрирующих нокаут SIRP α в макрофагах CTX_001 с помощью Cas9 и нРНК, нацеленных на SIRP α , согласно проточной цитометрии (**Фиг. 156A**), экспрессии CTX_001 в макрофагах с нокаутом SIRP α согласно проточной цитометрии (**Фиг. 156B**), фагоцитоз макрофагами CTX_001 с нокаутом SIRP α

клеток рака молочной железы человека HCC-1954 в течение 12 часов (**Фиг. 156C**), и общий фагоцитоз, измеренный в течение 12 часов, количественно выраженный в виде площади под кривой (**Фиг. 156D**). В качестве контроля использовали NT CAR-макрофаги, только нРНК и UTD макрофаги.

На **Фиг. 157A-E** представлена серия графиков, демонстрирующих нокаут SIRP α в макрофагах CTX_001 из разных донорских клеток с помощью Cas9 и нРНК, нацеленных на SIRP α , согласно проточной цитометрии (**Фиг. 157A**), экспрессию CTX_001 в макрофагах с нокаутом SIRP α согласно проточной цитометрии (**Фиг. 157B**), уничтожение макрофагами CTX_001 с нокаутом SIRP α клеток SKOV-3, экспрессирующих флуоресцентный белок nuclight green, в течение 24 часов, как показано по нормализованной опухолевой массе (**Фиг. 157C**), кинетику уничтожения опухоли, определяемую по часам, необходимым для уничтожения 50% опухолевых клеток-мишеней (**Фиг. 157D**), и общий фагоцитоз, измеряемый в течение 12 часов (**Фиг. 157E**). В качестве контроля использовали NT CAR-макрофаги, только нРНК и UTD макрофаги.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Для того, чтобы настоящее изобретение было более понятным, ниже представлены определения некоторых терминов. Дополнительные определения для следующих терминов и других терминов изложены в описании. Публикации и другие справочные материалы, на которые в данном документе делаются ссылки для описания уровня техники и предоставления дополнительных подробностей относительно практического применения изобретения, тем самым включены в данный документ посредством ссылки.

В контексте данного документа форма единственного числа используется для обозначения одного или более чем одного (т. е. по меньшей мере одного) грамматического объекта. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

Приблизительно или около: в контексте данного документа термин «приблизительно» или «около» применительно к одному или большему количеству представляющих интерес значений относится к значению, которое аналогично установленному эталонному значению. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, которые попадают в пределы 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любую сторону (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не

указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100% от возможного значения).

Активация: в контексте данного документа термин «активация» относится к состоянию клетки, например, моноцита, макрофага или дендритной клетки, которая была достаточно стимулирована для индукции обнаруживаемой клеточной пролиферации или была стимулирована для проявления своей эффекторной функции. Активация также может быть связана с индуцированной продукцией цитокинов, секрецией цитокинов, фагоцитозом, сигналингом клеток (например, изменением экспрессии генов), уничтожением клеток-мишеней, метаболическими изменениями, продукцией медиаторов воспаления, пролиферацией, эпигенетическим перепрограммированием, фенотипическим переключением макрофагов (например, M1 поляризацией), подавлением проопухолевых макрофагов или M2 макрофагов, фенотипическое переключение проопухолевых макрофагов или M2 макрофагов и/или процессинг и презентацию антигена .

Активированные моноциты/макрофаги/дендритные клетки: в контексте данного документа термин «активированные моноциты/макрофаги/дендритные клетки» относится, среди прочего, к моноцитам/макрофагам/дендритным клеткам, которые подвергаются клеточному делению или проявляют эффекторную функцию. *Термин «активированные моноциты/макрофаги/дендритные клетки» относится, среди прочего, к клеткам, которые выполняют эффекторную функцию или проявляют какую-либо активность, не наблюдаемую в состоянии покоя, включая фагоцитоз, секрецию цитокинов, пролиферацию, изменения экспрессии генов, метаболические изменения, продукцию медиаторов воспаления, пролиферацию, эпигенетическое перепрограммирование, фенотипическое переключение макрофагов (например, M1 поляризацию), подавление проопухолевых макрофагов или M2 макрофагов, фенотипическое переключение проопухолевых макрофагов или M2 макрофагов и другие функции.*

Агент: в контексте данного документа термин «агент» (или «биологический агент» или «терапевтический агент») относится к молекуле, которая может экспрессироваться, высвобождаться, секретироваться или доставляться к мишени описанной в данном документе модифицированной клеткой. Агент включает, но не ограничивается ими, нуклеиновую кислоту, антибиотик, противовоспалительное средство, антитело или его фрагменты, антитело или его фрагменты, фактор роста, цитокин, фермент, белок, пептид, слитый белок, синтетическую молекулу, органическую молекулу (например, малую молекулу), углевод, липид, гормон, микросому, их производное или вариант, состав или композицию, содержащую один или более из них, и любые их комбинации. Агент может

связываться с любым фрагментом клетки, таким как рецептор, антигенная детерминанта или другой сайт связывания, присутствующий на мишени или клетке-мишени. Агент может диффундировать или транспортироваться в клетку, где он может действовать внутриклеточно.

Антитело: в контексте данного документа термин «антитело» относится к полипептиду, который включает элементы канонических последовательностей иммуноглобулина, достаточные для обеспечения специфического связывания с конкретным антигеном-мишенью. Как известно в данной области техники, интактные антитела, образуемые в природе, представляют собой тетрамерные агенты с молекулярной массой приблизительно 150 кДа, состоящие из двух идентичных полипептидов тяжелой цепи (около 50 кДа каждый) и двух идентичных полипептидов легкой цепи (около 25 кДа каждый), которые связываются друг с другом в то, что обычно называют «Y-образной» структурой. Каждая тяжелая цепь содержит по меньшей мере четыре домена (каждый длиной около 110 аминокислот) - N-концевой вариабельный (VH) домен (расположенный на концах структуры Y), за которым следуют три константных домена: CH1, CH2 и C-концевой CH3 (расположенный в основании ствола Y). Короткая область, известная как «переключатель», соединяет вариабельную и константную области тяжелой цепи. «Шарнир» соединяет домены CH2 и CH3 с остальной частью антитела. Две дисульфидные связи в этой шарнирной области соединяют два полипептида тяжелой цепи друг с другом в интактном антителе. Каждая легкая цепь содержит два домена - N-концевой вариабельный (VL) домен, за которым следует C-концевой константный (CL) домен, отделенных друг от друга другим «переключателем». Тетрамеры интактных антител содержат два димера тяжелая цепь-легкая цепь, в которых тяжелая и легкая цепи связаны друг с другом одной дисульфидной связью; две другие дисульфидные связи соединяют шарнирные области тяжелой цепи друг с другом, так что димеры соединяются друг с другом и образуется тетрамер. Антитела, продуцируемые естественным путем, также гликозилируются, как правило, по домену CH2. Каждый домен в природном антителе имеет структуру, характеризующуюся «иммуноглобулиновой складкой», образованной из двух бета-листов (например, 3-, 4- или 5-цепочечных листов), упакованных друг против друга в сжатом антипараллельном бета-цилиндре. Каждый вариабельный домен содержит три гипервариабельные петли, известные как «определяющие комплементарность области» (CDR1, CDR2 и CDR3), и четыре в некоторой степени инвариантные «каркасные» области (FR1, FR2, FR3 и FR4). Когда натуральные антитела складываются, области FR образуют бета-складки, которые обеспечивают структурную основу для доменов, а петлевые области CDR как тяжелой, так и легкой цепей объединяются в трехмерном пространстве, так что

они создают единый гипервариабельный антигенсвязывающий сайт, расположенный на вершине Y-структуры. Область Fc природных антител связывается с элементами системы комплемента, а также с рецепторами на эффекторных клетках, включая, например, эффекторные клетки, которые опосредуют цитотоксичность. Аффинность и/или другие свойства связывания областей Fc с рецепторами Fc можно модулировать посредством гликозилирования или другой модификации. В некоторых вариантах осуществления антитела, продуцируемые и/или используемые в соответствии с настоящим изобретением (например, как компонент CAR), включают гликозилированные домены Fc, включая домены Fc с модифицированным или сконструированным гликозилированием. В некоторых вариантах осуществления любой полипептид или комплекс полипептидов, который включает достаточное количество последовательностей домена иммуноглобулина, обнаруженных в природных антителах, может называться и/или применяться как «антитело», независимо от того, произведен ли такой полипептид естественным путем (например, сгенерированный организмом, реагирующим на антиген), или полученный с помощью рекомбинантной инженерии, химического синтеза или другой искусственной системы или методологии. В некоторых вариантах осуществления антитело является поликлональным. В некоторых вариантах осуществления антитело является моноклональным. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет последовательности константной области, которые характерны для антител мыши, кролика, приматов или человека. В некоторых вариантах осуществления элементы последовательности антитела являются гуманизированными, приматизированными, химерными и т.д., как известно в данной области техники. Более того, используемый в данном документе термин «антитело» может относиться в соответствующих вариантах (если не указано иное или ясно из контекста) к любой из известных или разработанных конструкций или форматов для использования структурных и функциональных особенностей антитела в альтернативном представлении. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело, используемое в соответствии с настоящим изобретением, находится в формате, выбранном, но не ограничиваясь этим, из интактных антител IgA, IgG, IgE или IgM; би- или полиспецифических антител (например, Zybodies® и т.д.); фрагментов антител, например, фрагментов Fab, фрагментов Fab', фрагментов F(ab')₂, фрагментов Fd', фрагментов Fd и выделенных CDR или их наборов; одноцепочечных Fv; гибридов полипептид-Fc; однодоменных антител (например, однодоменных антител акулы, такие как IgNAR или их фрагментов); верблюжьих антител; маскированных антител (например, Probody®); малых модульных иммунофармацевтических препаратов («SMIPTM»); одноцепочечных или tandemных диател

(TandAb®); VHH; Anticalin®; миниантител Nanobody®; BiTE®; белков с анкириновыми повторами или DARPIN®; Avimer®; DART; TCR-подобных антител; Adnectin®; Affilin®; Trans-body®; Affibody®; TrimerX®; микробелков; Fynomer®, Centyrin®, и KALBITOR®. В некоторых вариантах осуществления антитело может не иметь ковалентную модификацию (например, присоединение гликана), которую он имел бы, если бы был получен естественным образом. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать ковалентную модификацию (например, присоединение гликана, полезную нагрузку [например, обнаруживаемый фрагмент, терапевтический фрагмент, каталитический фрагмент и т. д.] или другую боковую группу [например, полиэтиленгликоль и т. д.]).

Агент в виде антитела: в контексте данного документа термин «агент в виде антитела» относится к агенту, который специфически связывается с конкретным антигеном. В некоторых вариантах осуществления термин охватывает любой полипептид или полипептидный комплекс, который включает структурные элементы иммуноглобулина, достаточные для обеспечения специфического связывания. Иллюстративные агенты в виде антител включают, но не ограничиваются ими, моноклональные антитела или поликлональные антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать одну или более последовательностей константной области, характерных для антител мыши, кролика, примата или человека. В некоторых вариантах осуществления агент в виде антитела может включать один или более элементов последовательности, являющихся гуманизированными, приматизированными, химерными и т.д., как известно в данной области техники. Во многих вариантах осуществления термин «агент в виде антитела» используется для обозначения одной или более известных в данной области техники или разработанных конструкций или форматов для использования структурных и функциональных особенностей антитела в альтернативной презентации. Например, в некоторых вариантах осуществления агент в виде антитела, используемый в соответствии с настоящим изобретением, находится в формате, выбранном, но не ограничиваясь этим, из интактных антител IgA, IgG, IgE или IgM; би- или полиспецифических антител (например, Zybodies® и т.д.); фрагментов антител, например, фрагментов Fab, фрагментов Fab', фрагментов F(ab')₂, фрагментов Fd', фрагментов Fd и выделенных CDR или их наборов; одноцепочечных Fv; гибридов полипептид-Fc; однодоменных антител (например, однодоменных антител акулы, такие как IgNAR или их фрагментов); верблужьих антител; маскированных антител (например, Probody®); малых модульных иммунофармацевтических препаратов («SMIPTM»); одноцепочечных или tandemных диател (TandAb®); VHH; Anticalin®; миниантител Nanobody®; BiTE®; белков с анкириновыми повторами или DARPIN®; Avimer®; DART; TCR-подобных антител;

Adnectin®; Affilin®; Trans-body®; Affibody®; TrimerX®; микробелков; Fynomer®, Centyrin®; и KALBITOR®s. В некоторых вариантах осуществления агент в виде антитела может не иметь ковалентную модификацию (например, присоединение гликана), которую он имел бы, если бы был получен естественным образом. В некоторых вариантах осуществления агент в виде антитела может содержать ковалентную модификацию (например, присоединение гликана, полезную нагрузку [например, обнаруживаемый фрагмент, терапевтический фрагмент, каталитический фрагмент и т. д.] или другую боковую группу [например, полиэтиленгликоль и т. д.]). Во многих вариантах осуществления агент в виде антитела представляет собой или содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого включает один или более структурных элементов, известных специалистам в данной области техники как определяющая комплементарность область (CDR); в некоторых вариантах осуществления агент в виде антитела представляет собой или содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого включает по меньшей мере одну CDR (например, по меньшей мере одну CDR тяжелой цепи и/или по меньшей мере одну CDR легкой цепи), которая по существу идентична CDR, обнаруженной в эталонном антителе. В некоторых вариантах осуществления включенная CDR по существу идентична эталонной CDR в том смысле, что она либо идентична по последовательности, либо содержит от 1 до 5 аминокислотных замен по сравнению с эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включенная CDR по существу идентична эталонной CDR в том, что она демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включенная CDR по существу идентична эталонной CDR в том, что она демонстрирует по меньшей мере 96%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включенная CDR по существу идентична эталонной CDR в том, что по меньшей мере одна аминокислота во включенной CDR удалена, добавлена или заменена по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в остальном идентична эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включенная CDR по существу идентична эталонной CDR в том, что 1-5 аминокислот во включенной CDR удалены, добавлены или заменены по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в остальном идентична эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включенная CDR по существу идентична эталонной CDR в том, что по меньшей мере одна аминокислота во включенной CDR заменена по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет

аминокислотную последовательность, которая в остальном идентична эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включенная CDR по существу идентична эталонной CDR в том, что 1-5 аминокислот во включенной CDR удалены, добавлены или заменены по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в остальном идентична эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой или содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого включает структурные элементы, известные специалистам в данной области техники как переменный домен иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полипептидный белок, имеющий связывающий домен, гомологичный или в значительной степени гомологичный связывающему домену иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления антитело не представляет собой и/или не содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого включает структурные элементы, известные специалистам в данной области техники как переменный домен иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления агент в виде антитела может представлять собой или содержать молекулу или композицию, которая не включает структурные элементы иммуноглобулина (например, рецептор или другую природную молекулу, которая включает по меньшей мере один антигенсвязывающий домен).

Фрагмент антитела: в контексте данного документа термин «фрагмент антитела» относится к части интактного антитела и относится к определяющим антигенность переменным областям интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, линейные антитела, антитела scFv и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител и их человеческих или гуманизированных версий.

Тяжелая цепь антитела: в контексте данного документа термин «тяжелая цепь антитела» относится к большей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их естественных конформациях.

Легкая цепь антитела: В контексте данного документа термин «легкая цепь антитела» относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их естественных конформациях.

Синтетическое антитело: в контексте данного документа термин «синтетическое антитело» относится к антителу, полученному с использованием технологии рекомбинантной ДНК, такому как, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом, как описано в данном документе. Термин также следует толковать как обозначение

антитела, которое было образовано путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, и какая молекула ДНК экспрессирует белок антитела, или аминокислотную последовательность, определяющую антитело, где ДНК или аминокислотная последовательность были получены с использованием технологии синтетической ДНК или аминокислотных последовательностей, которая доступна и хорошо известна в данной области техники.

Антиген: в контексте данного документа термин «антиген» или «Аг» относится к молекуле, которая способна провоцировать иммунный ответ. Такой иммунный ответ может предполагать или выработку антител, активацию специфичных иммунокомпетентных клеток, или и то, и другое. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Более того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность или часть нуклеотидной последовательности, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, кодирует «антиген» в том значении, в котором этот термин используется в данном документе. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген не обязательно должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Очевидно, что настоящее изобретение включает, помимо прочего, использование частей нуклеотидных последовательностей более одного гена, и что эти нуклеотидные последовательности располагаются в различных комбинациях для того, чтобы вызвать желаемый иммунный ответ. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген совсем не обязательно должен кодироваться «геном». Совершенно очевидно, что антиген может быть получен, синтезирован или может быть получен из биологического образца. Такой биологический образец может включать, но не ограничивается этим, образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость.

«Противоопухолевый эффект»: в контексте данного документа, термин «противоопухолевый эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться в виде уменьшения объема опухоли, уменьшения количества опухолевых клеток, уменьшения количества метастаз, увеличения продолжительности жизни или облегчения различных физиологических симптомов, связанных с состоянием при онкологическом заболевании. «Противоопухолевый эффект» также может проявляться в

способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител по изобретению в первую очередь предотвращать появление опухоли.

Аутологичный: в контексте данного документа термин «аутологичный» относится к любому материалу, полученному от индивида, которому впоследствии он будет вводиться.

Аллогенный: в контексте данного документа термин «аллогенный» относится к трансплантату (например, популяции клеток), полученному от другого животного того же вида.

Ксеногенный: в контексте данного документа термин «ксеногенный» относится к трансплантату (например, популяции клеток), полученному от животного другого вида.

Злокачественное новообразование: в контексте данного документа термин «злокачественное новообразования» относится к заболеванию, которое характеризуется быстрым и неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела. Примеры различных злокачественных новообразований включают, помимо прочего, рак молочных желез, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почки, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легкого и т. п. В определенных вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой медуллярную карциному щитовидной железы.

Модификации консервативной последовательности: в контексте данного документа термин «модификации консервативной последовательности» относится к модификациям аминокислот, которые существенно не влияют или не изменяют характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, вставки и делеции. Модификации могут быть введены в антитело, совместимое с различными вариантами осуществления, стандартными методами, известными в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез и мутагенез, опосредованный ПЦР. Консервативные аминокислотные замены представляют собой такие замены, в которых аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными

полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или более аминокислотных остатков в областях CDR антитела могут быть заменены другими аминокислотными остатками из того же семейства боковых цепей, а измененное антитело можно протестировать на способность связывать антигены с использованием описанных в данном документе функциональных анализов.

Костимулирующий лиганд: в контексте данного документа термин «костимулирующий лиганд» относится к молекуле на антигенпрезентирующей клетке (например, APC, дендритной клетке, В-клетке и т.п.), которая специфически связывается с родственной костимулирующей молекулой на моноците/макрофаге/дендритной клетке, тем самым обеспечивая сигнал, который опосредует ответ моноцита/макрофага/дендритной клетки, включая, но не ограничиваясь этим, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. Костимулирующий лиганд может включать, но не ограничивается ими, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, индуцибельный костимулирующий лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, бета-рецептор лимфотоксина, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, агонист или антитело, которое связывает Toll-подобный рецептор, и лиганд, который специфически связывается с B7-H3. Костимулирующий лиганд также включает, среди прочего, антитело, которое специфически связывается с костимулирующей молекулой, присутствующей на моноците/макрофаге/дендритной клетке, такой как, но не ограничиваясь ими, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83.

Цитотоксичность: в контексте данного документа термин «цитотоксичный» или «цитотоксичность» относится к уничтожению или повреждению клеток. В одном варианте осуществления улучшается цитотоксичность метаболически усиленных клеток, например, повышается цитолитическая активность макрофагов.

Эффективное количество: в контексте данного документа термины «эффективное количество» и «терапевтически эффективное количество» являются взаимозаменяемыми и относятся к количеству соединения, состава, материала или композиции, как описано в данном документе, эффективному для достижения определенного биологического

результата или обеспечивающего терапевтический эффект или профилактический эффект. Такие результаты могут включать, но не ограничиваться этим, противоопухолевую активность, определенную любым способом, пригодным для этой цели в данной области техники.

Эффекторная функция: в контексте данного документа термин «эффекторная функция» или «эффекторная активность» относится к специфической активности, осуществляемой иммунной клеткой в ответ на стимуляцию иммунной клетки. Например, эффекторная функция макрофагов по поглощению и расщеплению клеточного дебриса, инородных веществ, микробов, раковых клеток и других ненормальных клеток путем фагоцитоза.

Кодирование: в контексте данного документа термин «кодирование» относится к неотъемлемому свойству специфических последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, такого как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих определенную последовательность нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и мРНК) или определенную последовательность аминокислот и вытекающие из этого биологические свойства. Таким образом, ген кодирует белок, если транскрипция и трансляция мРНК, соответствующей этому гену, продуцируют белок в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно предоставлена в перечнях последовательностей, так и не кодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут рассматриваться как кодирующие белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Эндогенный: в контексте данного документа термин «эндогенный» относится к любому материалу, полученному от организма, клетки, ткани или системы или образованному внутри них.

Экзогенный: в контексте данного документа термин «экзогенный» относится к любому материалу, полученному из организма, клетки, ткани или системы либо произведенному за их пределами.

Размножать / подвергать экспансии: в контексте данного документа термин «экспансия/размножение» относится к увеличению количества, например, увеличению количества моноцитов/макрофагов. В одном варианте осуществления количество моноцитов, макрофагов или дендритных клеток, размноженных *ex vivo*, увеличивается по сравнению с количеством, первоначально присутствующим в культуре. В еще одном варианте осуществления количество моноцитов, макрофагов или дендритных клеток,

размноженных *ex vivo*, увеличивается по сравнению с другими типами клеток в культуре. Термин «*ex vivo*», используемый в данном документе, относится к клеткам, которые были удалены из живого организма (например, человека) и размножены вне организма (например, в чашке для культивирования, пробирке или биореакторе).

Экспрессия: в контексте данного документа термин «экспрессия» последовательности нуклеиновой кислоты относится к получению любого генного продукта из последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления продукт гена может представлять собой транскрипт. В некоторых вариантах осуществления продукт гена может представлять собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления экспрессия последовательности нуклеиновой кислоты включает одно или более из следующего: (1) получение матрицы РНК из последовательности ДНК (*например, путем транскрипции*); (2) *процессинг РНК-транскрипта (например, путем сплайсинга, редактирования, образования 5'-кэпа и/или образования 3'-конца)*; (3) *трансляция РНК в полипептид или белок; и/или (4) посттрансляционная модификация полипептида или белка.*

Вектор экспрессии: в контексте данного документа термин «вектор экспрессии» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательности регуляции экспрессии, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, которая подлежит экспрессии. Вектор экспрессии содержит достаточно действующих в *цис*-положении элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть обеспечены клеткой-хозяином или в *in vitro* системе экспрессии. Векторы экспрессии включают все известные в данной области техники, такие как космиды, плазмиды (например, голые или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы (например, вектор Ad5, например, Ad5f35) которые включают рекомбинантный полинуклеотид.

Гомология : в контексте данного документа термин «гомология» относится к общему сходству между полимерными молекулами, например, между молекулами нуклеиновых кислот (например, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. В некоторых вариантах осуществления полимерные молекулы считаются «гомологичными» друг другу, если их последовательности имеют по меньшей мере 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности. В некоторых вариантах осуществления полимерные молекулы считаются «гомологичными» друг другу, если их последовательности на по меньшей мере 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% сходны (например, содержащие остатки со связанными химическими свойствами в

соответствующих положениях). Как должно быть понятно специалистам в данной области техники, доступно множество алгоритмов, позволяющих сравнивать последовательности с целью определения степени их гомологии, в том числе путем допуска гэпов определенной длины в одной последовательности по отношению к другой при рассмотрении того, какие остатки «соответствуют друг к другу в разной последовательности. Вычисление процента гомологии между двумя последовательностями нуклеиновых кислот, например, может быть выполнено путем выравнивания двух последовательностей для целей оптимального сравнения (например, гэпы могут быть введены в одну или обе из первой и второй последовательностей нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания и несоответствующие последовательности можно пренебречь в целях сравнения). В некоторых вариантах осуществления длина последовательности, выровненной для целей сравнения, составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по существу 100% длины эталонной последовательности. Затем сравнивают нуклеотиды в соответствующих положениях нуклеотидов. Когда положение в первой последовательности занято тем же нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы в этом положении идентичны; когда положение в первой последовательности занято таким же нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы сходны в этом положении. Процент гомологии между двумя последовательностями является функцией от числа совпадающих или подобных положений в последовательностях с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо вносить для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Идентичность: в контексте данного документа термин «идентичность» относится к идентичности последовательностей субъединиц между двумя полимерными молекулами, в частности, между двумя аминокислотными молекулами, например, между двумя молекулами полипептида. Когда две аминокислотные последовательности имеют одинаковые остатки в одинаковых положениях; например, если положение в каждой из двух полипептидных молекул занято аргинином, то они идентичны в этом положении. Идентичность или степень, в которой две аминокислотные последовательности имеют одни и те же остатки в одних и тех же положениях в выравнивании, часто выражают в процентах. Идентичность между двумя аминокислотными последовательностями является прямой функцией количества совпадающих или идентичных положений; например, если половина (например, пять положений в полимере длиной десять аминокислот) положений в двух последовательностях идентичны, две последовательности идентичны на 50%; если 90%

положений (например, 9 из 10) совпадают или идентичны, две аминокислотные последовательности идентичны на 90%.

Существенная идентичность: в контексте данного документа термин «существенная идентичность» относится к сравнению последовательностей аминокислот или нуклеиновых кислот. Как будет понятно специалистам в данной области техники, две последовательности, как правило, считаются «по существу идентичными», если они содержат идентичные остатки в соответствующих положениях. Как хорошо известно в данной области техники, последовательности аминокислот или нуклеиновых кислот можно сравнивать с использованием любого из множества алгоритмов, в том числе доступных в коммерческих компьютерных программах, таких как BLASTN для нуклеотидных последовательностей и BLASTP, gapped BLAST и PSI-BLAST для аминокислотных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления две последовательности считаются по существу идентичными, если по меньшей мере, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более их соответствующих остатков идентичны на соответствующем участке остатков. В некоторых вариантах осуществления соответствующий участок представляет собой полную последовательность. В некоторых вариантах осуществления соответствующий участок составляет по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или более остатков. В контексте CDR ссылка на «существенную идентичность», как правило, относится к CDR, имеющему аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична эталонной CDR.

Иммуноглобулин: в контексте данного документа термин «иммуноглобулин» или «Ig» относится к классу белков, которые функционируют как антитела. Антитела, экспрессируемые В-клетками, иногда называют BCR (В-клеточный рецептор) или рецептор антигена. В этот класс белков входят пять членов: IgA, IgG, IgM, IgD и IgE. IgA является первичным антителом, которое присутствует в выделениях организма, таких как слюна, слезы, грудное молоко, секреты желудочно-кишечного тракта и секреты слизи дыхательных и мочеполовых путей. IgG является наиболее распространенным циркулирующим антителом. IgM является основным иммуноглобулином, вырабатываемым при первичном иммунном ответе у большинства субъектов. Это наиболее эффективный иммуноглобулин в агглютинации, фиксации комплемента и других ответах антител, и он важен для защиты от бактерий и вирусов. IgD представляет собой

иммуноглобулин, который не имеет известной функции антитела, но может служить рецептором антигена. IgE представляет собой иммуноглобулин, который опосредует гиперчувствительность немедленного типа, вызывая высвобождение медиаторов из тучных клеток и базофилов при воздействии аллергена.

Иммунный ответ: в контексте данного документа термин «иммунный ответ» относится к клеточному ответу на антиген, который возникает, когда лимфоциты идентифицируют антигенные молекулы как чужеродные и индуцируют образование антител и/или активируют лимфоциты для удаления антигена.

Выделенный: в контексте данного документа термин «выделенный» относится к чему-то измененному или удаленному из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие в живом существе, не являются выделенными, однако эта же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов в естественном состоянии, будут выделенными. Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в чужеродной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

Лентивирус: в контексте данного документа термин «лентивирус» относится к роду семейства Retroviridae. Лентивирусы являются уникальными среди ретровирусов благодаря способности инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, таким образом, они являются одним из наиболее эффективных вариантов вектора для доставки генов. ВИЧ, вирус иммунодефицита обезьян, вирус кошачьего иммунодефицита являются примерами лентивирусов. Векторы, полученные из лентивирусов, предлагают средства для достижения значительных уровней переноса генов *in vivo*.

Модифицированный: в контексте данного документа, термин «модифицированный» относится к измененному состоянию или структуре молекулы или клетки по изобретению. Молекулы могут быть изменены многими способами, в том числе химически, структурно и функционально. Клетки могут быть модифицированы посредством введения нуклеиновых кислот.

Модулирование: в контексте данного документа термин «модулирование» относится к обнаруживаемому увеличению или снижению уровня ответа у субъекта по сравнению с уровнем ответа у субъекта в отсутствие лечения или соединения, и/или по сравнению с уровнем ответа у идентичного, но не получавшего лечение. Термин включает нарушение

и/или воздействие на нативный сигнал или реакцию, тем самым опосредуя полезный терапевтический ответ у субъекта, предпочтительно у человека.

Функционально связанный: в контексте данного документа термин «функционально связанный» относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая приводит экспрессию последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты является функционально соединенной со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты попадает в функциональную взаимосвязь со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Как правило, функционально связанные последовательности ДНК являются смежными и, при необходимости, для соединения двух кодирующих белок областей в одной и той же рамке считывания.

Сверхэкспрессия опухолевого антигена: в контексте данного документа термин «сверхэкспрессия» опухолевого антигена или «сверхэкспрессия» опухолевого антигена относится к аномальному уровню экспрессии опухолевого антигена в клетке из нозологической формы, такой как солидная опухоль в определенной ткани или органе пациента, по отношению к уровню экспрессии в нормальной клетке из этой ткани или органа. Пациентов с солидными опухолями или гематологическими злокачественными новообразованиями, характеризующимися сверхэкспрессией опухолевого антигена, можно определить с помощью стандартных анализов, известных в данной области техники.

Полинуклеотид: в контексте данного документа термин «полинуклеотид» относится к цепи нуклеотидов. Кроме того, нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры нуклеотидов. Таким образом, используемые в данном документе нуклеиновые кислоты и полинуклеотиды являются взаимозаменяемыми. Специалисту в данной области техники известно, что нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды, которые могут гидролизаться в мономерные «нуклеотиды». Мономерные нуклеотиды могут гидролизаться до нуклеозидов. Используемые в данном документе полинуклеотиды включают, но не ограничиваются ими, все последовательности нуклеиновых кислот, которые получены любыми способами, доступными в данной области техники, включая, помимо прочего, рекомбинантные способы, т.е. клонирование последовательностей нуклеиновых кислот из рекомбинантной библиотеки или клеточной генома, с

использованием обычных технологий клонирования и ПЦР™ и т.п., а также синтетическими способами.

Полипептид: в контексте данного документа термин «полипептид» относится к любой полимерной цепи остатков (например, аминокислот), которые обычно связаны пептидными связями. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, которая встречается в природе. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, которая не встречается в природе. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, которая сконструирована таким образом, что она сконструирована и/или получена человеком. В некоторых вариантах осуществления полипептид может включать или состоять из природных аминокислот, неприродных аминокислот или и тех, и других. В некоторых вариантах осуществления полипептид может включать или состоять только из природных аминокислот или только из неприродных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать D-аминокислоты, L-аминокислоты или и то, и другое. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать только D-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать только L-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать одну или более боковых групп или другие модификации, например, модификацию или присоединение к одной или более боковым цепям аминокислот, на N-конце полипептида, на C-конце полипептида или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления такие боковые группы или модификации могут быть выбраны из группы, состоящей из ацетилирования, амидирования, липидирования, метилирования, пегилирования и т.д., включая их комбинации. В некоторых вариантах осуществления полипептид может быть циклическим и/или может включать циклическую часть. В некоторых вариантах осуществления полипептид не является циклическим и/или не включает никаких циклических частей. В некоторых вариантах осуществления полипептид является линейным. В некоторых вариантах осуществления полипептид может представлять собой сшитый полипептид или содержать его. В некоторых вариантах осуществления термин «полипептид» может быть добавлен к названию эталонного полипептида, активности или структуры; в таких случаях он используется в данном документе для обозначения полипептидов, которые обладают соответствующей активностью или структурой и, таким образом, могут рассматриваться как члены того же класса или семейства полипептидов. Для каждого такого класса в данном описании представлены и/или специалистам в данной области техники будут известны иллюстративные полипептиды в пределах класса, аминокислотные последовательности

и/или функции которых являются известными; в некоторых вариантах осуществления такие иллюстративные полипептиды являются эталонными полипептидами для класса или семейства полипептидов. В некоторых вариантах осуществления член класса или семейства полипептидов демонстрирует значительную гомологию последовательности или идентичность, имеет общий мотив последовательности (например, характерный элемент последовательности) и/или разделяет общую активность (в некоторых вариантах осуществления на сопоставимом уровне или в указанном диапазоне) с эталонным полипептидом этого класса; в некоторых вариантах осуществления со всеми полипептидами в пределах класса). Например, в некоторых вариантах осуществления полипептид-член демонстрирует общую степень гомологии последовательности или идентичности с эталонным полипептидом, которая составляет по меньшей мере около 30-40%, а часто превышает около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более и/или включает по меньшей мере одну область (например, консервативную область, которая в некоторых вариантах осуществления может представлять собой или включать характерный элемент последовательности), которая демонстрирует очень высокую идентичность последовательности, часто более 90% или даже 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Такая консервативная область обычно включает по меньшей мере 3-4, а часто до 20 или более аминокислот; в некоторых вариантах осуществления консервативная область включает по меньшей мере один участок из по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более смежных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления применимый полипептид может включать или состоять из фрагмента исходного полипептида. В некоторых вариантах осуществления применимый полипептид, который может включать или состоять из множества фрагментов, каждый из которых находится в одном и том же исходном полипептиде в другом пространственном расположении относительно друг друга, чем в представляющем интерес полипептиде (например, фрагменты, которые непосредственно связаны в исходном, могут быть пространственно разделены в представляющем интерес полипептиде или наоборот, и/или фрагменты могут присутствовать в представляющем интерес полипептиде в другом порядке, чем в исходном), таким образом представляющий интерес полипептид является производным его исходного полипептида.

Белок: в контексте данного документа термин «белок» относится к полипептиду (т. е. цепи по меньшей мере из двух аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями). Белки могут включать фрагменты, отличные от аминокислот (например, могут быть гликопротеины, протеогликаны и т. д.), и/или могут быть процессированы или модифицированы иным образом. Специалисты в данной области техники поймут, что

«белок» может быть полной полипептидной цепью, продуцируемой клеткой (с сигнальной последовательностью или без нее), или может быть ее характерной частью. Обычным специалистам будет понятно, что белок иногда может включать более одной полипептидной цепи, например, связанных одной или более дисульфидными связями или связанных другими способами. Полипептиды могут содержать L-аминокислоты, D-аминокислоты или и то, и другое и могут содержать любые из множества модификаций аминокислот или аналогов, известных в данной области техники. Полезные модификации включают, например, концевое ацетилирование, амидирование, метилирование и т.д. В некоторых вариантах осуществления белки могут содержать природные аминокислоты, неприродные аминокислоты, синтетические аминокислоты и их комбинации. Термин «пептид» обычно используется для обозначения полипептида, имеющего длину менее около 100 аминокислот, менее около 50 аминокислот, менее 20 аминокислот или менее 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления белки представляют собой антитела, фрагменты антител, их биологически активные части и/или их характерные части.

Путь сигнальной трансдукции: в контексте данного документа термин «путь сигнальной трансдукции» относится к биохимической взаимосвязи между различными молекулами передачи сигналов, которые играют роль в передаче сигнала от одной части клетки к другой части клетки. Фраза «рецептор клеточной поверхности» включает молекулы и комплексы молекул, способные принимать сигнал и передавать его через плазматическую мембрану клетки.

Одноцепочечные антитела: в контексте данного документа термин «одноцепочечные антитела» относится к антителам, полученным с помощью метода рекомбинантной ДНК, в которых фрагменты тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина связаны с областью Fv через сконструированный диапазон аминокислот. Известны различные способы получения одноцепочечных антител, в том числе описанные в патенте США № 4694778; Bird (1988) Science 242:423-442; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Ward et al. (1989) Nature 334:54454; Skerra et al. (1988) Science 242:1038-1041.

Специфически связывает: в контексте данного документа термин «специфически связывает» в отношении антигенсвязывающего домена, такого как антитело, относится к антигенсвязывающему домену или антителу, которое распознает специфический антиген, но по существу не распознает или не связывает другие молекулы в образце. Например, антигенсвязывающий домен или антитело, которое специфически связывается с антигеном одного вида, может также связываться с этим антигеном одного или более видов. Но такая межвидовая реактивность сама по себе не меняет классификации антигенсвязывающего

домена или антитела как специфического. В еще одном примере антигенсвязывающий домен или агент в виде антитела, который специфически связывается с антигеном, может также связываться с различными аллельными формами антигена. Однако такая перекрестная реактивность сама по себе не меняет классификации антигенсвязывающего домена или антитела как специфического. В некоторых случаях термины «специфическое связывание» или «специфически связывание» могут использоваться в отношении взаимодействия антигенсвязывающего домена или агента антитела, белка или пептида со вторым химическим соединением, что означает, что взаимодействие зависит от наличия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) у химического вещества; например, антигенсвязывающий домен или агент в виде антитела распознает и связывается с определенной белковой структурой, а не с белками в целом. Если антигенсвязывающий домен или агент в виде антитела специфичны для эпитопа «А», присутствие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободный, немеченый А), в реакционной смеси, содержащей меченый «А» и антигенсвязывающий домен или агент в виде антитела, будет уменьшить количество меченого «А», связанного с антителом.

Стимуляция: в контексте данного документа термин «стимуляция» относится к первичному ответу, индуцированному связыванием стимулирующей молекулы (например, комплекса FcR, комплекса TLR или комплекса TCR/CD3) с ее распознаваемым лигандом, тем самым опосредуя событие сигнальной трансдукции, такое как, но не ограничиваясь этим, сигнальная трансдукция через механизм рецептора Fc или через синтетический CAR. Стимуляция может опосредовать измененную экспрессию определенных молекул, такую как снижение экспрессии TGF-бета и/или реорганизацию цитоскелетных структур и т.п. В контексте данного документа термин «стимулирующая молекула» относится к молекуле моноцита, макрофага или дендритной клетки, которая специфически связывается с родственным стимулирующим лигандом, присутствующим на антигенпрезентирующей клетке. В некоторых вариантах осуществления стимулирующая молекула содержит внеклеточный домен FcR, включающий домен CD64 (FcγRI), CD32a (FcγRIIa), CD32b (FcγRIIb), CD32c, CD16a (FcγRIIIa), CD16b (FcγRIIIb), FcεRI, FcεRII, или FcαRI (CD89). В некоторых вариантах осуществления стимулирующая молекула содержит внеклеточный домен TLR, включающий домен TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 или TLR9. В контексте данного документа термин «стимулирующий лиганд» относится к лиганду, который при наличии на антигенпрезентирующей клетке (например, аAPC, макрофаге, дендритной клетке, В-клетке и т.п.) или опухолевой клетке может специфически связываться с родственным партнером по связыванию (называемым в данном документе «стимулирующей молекулой») на моноците, макрофаге или дендритной

клетке, тем самым опосредуя ответ иммунной клетки, включая, помимо прочего, активацию, инициацию иммунного ответа, пролиферацию и тому подобное. Стимулирующие лиганды хорошо известны в данной области техники и включают, среди прочего, лиганд Toll-подобного рецептора (TLR), антитело к Toll-подобного рецептора, агонист и антитело к моноцитарному/макрофагальному рецептору. Кроме того, цитокины, такие как гамма-интерферон, являются мощными стимуляторами макрофагов.

Субъект: в контексте данного документа термин «субъект» относится к организму, например, млекопитающему (например, человеку, отличному от человека млекопитающему, отличному от человека примату, примату, лабораторному животному, мыши, крысе, хомяку, песчанке, кошке, собаке). В некоторых вариантах осуществления субъект-человек является взрослым, подростком или ребенком. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет заболевание, нарушение или состояние, например, заболевание, нарушение или состояние, которое можно лечить, как предусмотрено в данном документе, например, злокачественное новообразование или опухоль, перечисленные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект подвержен заболеванию, нарушению или состоянию; в некоторых вариантах осуществления восприимчивый субъект предрасположен и/или демонстрирует повышенный риск (по сравнению со средним риском, наблюдаемым у контрольного субъекта или популяции) развития заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления у субъекта проявляется один или более симптомов заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъект не проявляет конкретных симптомов (например, клинической манифестации заболевания) или характеристик заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъект не проявляет никаких симптомов или характеристик заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента. В некоторых вариантах осуществления субъектом является индивид, которому поставлен диагноз и/или назначена терапия.

По существу очищенный: в контексте данного документа термин «по существу очищенный», например, применительно к клетке, относится к клетке, которая практически не содержит других типов клеток. По существу очищенная клетка также относится к клетке, которая была отделена от других типов клеток, с которыми она обычно связана в своем естественном состоянии. В некоторых случаях популяция по существу очищенных клеток относится к гомогенной популяции клеток. В других случаях этот термин относится просто к клеткам, которые были отделены от клеток, с которыми они естественным образом

связаны в своем естественном состоянии. В некоторых вариантах осуществления эти клетки культивируют в условиях *in vitro*. В других вариантах осуществления эти клетки не культивируют в условиях *in vitro*.

Мишень: в контексте данного документа термин «мишень» относится к клетке, ткани, органу или участку в организме, которые нуждаются в лечении или предпочтительно связаны, например, с антителом (или его фрагментом) или CAR.

Сайт-мишень: в контексте данного документа термин «сайт-мишень» или «последовательность-мишень» относится к последовательности геномной нуклеиновой кислоты, которая определяет часть нуклеиновой кислоты, с которой связывающая молекула может специфически связываться в условиях, достаточных для возникновения связывания.

T-клеточный рецептор: в контексте данного документа термин «T-клеточный рецептор» или «TCR» относится к комплексу мембранных белков, которые участвуют в активации T-клеток в ответ на презентацию антигена. TCR отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости. TCR содержит гетеродимер альфа-(α) и бета-(β) цепи, хотя в некоторых клетках TCR содержит гамма- и дельта-(γ/δ) цепи. TCR могут существовать в альфа/бета и гамма/дельта формах, которые структурно сходны, но имеют различные анатомические локализации и функции. Каждая цепь содержит два внеклеточных домена, переменный и константный домен. В некоторых вариантах осуществления TCR может быть модифицирован на любой клетке, содержащей TCR, включая, например, хелперную T-клетку, цитотоксическую T-клетку, T-клетку памяти, регуляторную T-клетку, естественную киллерную T-клетку и гамма-дельта T-клетку.

Терапевтический: в контексте данного документа термин «терапевтический» относится к лечению и/или профилактике. Терапевтический эффект достигается путем подавления, ремиссии или устранения болезненного состояния.

Трансфицированный: в контексте данного документа термин «трансфицированный», или «трансформированный», или «трансдуцированный» относится к процессу, посредством которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. «Трансфицированная», или «трансформированная», или «трансдуцированная» клетка представляет собой клетку, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована с помощью экзогенной нуклеиновой кислоты. Клетка включает первичную клетку субъекта и свое потомство.

Лечить: в контексте данного документа термин «лечить», «лечение» или «процесс лечения» относится к частичному или полному облегчению, уменьшению интенсивности, отсрочке манифестации, ингибированию, предотвращению, облегчению и/или снижению частоты и/или степени тяжести одного или более симптомов или признаков заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение может быть назначено субъекту, у которого нет признаков или симптомов заболевания, нарушения и/или состояния (например, может быть профилактическим). В некоторых вариантах осуществления лечение может быть назначено субъекту, у которого проявляются только ранние или легкие признаки или симптомы заболевания, нарушения и/или патологического состояния, например, с целью снижения риска развития патологии, ассоциированной с заболеванием, нарушением и/или состоянием. В некоторых вариантах осуществления лечение может быть назначено субъекту, у которого проявляются установленные, тяжелые и/или проявляющиеся на поздней стадии признаки заболевания, нарушения или состояния.

Опухоль: в контексте данного документа термин «опухоль» относится к аномальному росту клеток или ткани. В некоторых вариантах осуществления опухоль может содержать клетки, которые являются предраковыми (*например*, доброкачественными), злокачественными, предметастатическими, метастатическими и/или неметастатическими. В некоторых вариантах осуществления опухоль связана с злокачественным новообразованием или является его проявлением. В некоторых вариантах осуществления опухоль может быть рассеянной опухолью или гемобластозом. В некоторых вариантах осуществления опухоль может представлять собой солидную опухоль.

Вектор: в контексте данного документа термин «вектор» относится к композиции вещества, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которую можно использовать для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Многочисленные векторы известны в данной области техники, включая, помимо прочего, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин «вектор» включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Термин также следует воспринимать как такой, который включает неплазмидные и невирусные соединения, которые способствуют переносу нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, полилизиновые соединения, липосомы и т. п. К примерам вирусных векторов относятся, помимо прочего, аденовирусные векторы, векторы на основе адено-ассоциированного вируса, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т. п.

По всему тексту этого описания различные аспекты изобретения могут быть представлены в виде диапазонов. Следует понимать, что описание в виде диапазонов предоставляется исключительно для удобства и краткости, и его не следует воспринимать как негибкое ограничение объема данного изобретения. Соответствующим образом, описание диапазона следует считать таким, которое конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует рассматривать как конкретно раскрывающие поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также отдельные числа в этом диапазоне, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. Это применимо независимо от широты диапазона.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Иммунные клетки

Настоящее изобретение, среди прочего, обеспечивает модифицированные иммунные клетки (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), содержащие по меньшей мере один химерный антигенный рецептор (CAR), как описано в данном документе. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления иммунная клетка, содержащая по меньшей мере один CAR, содержит: (a) внеклеточный домен (например, внеклеточный домен, как описано в данном документе), (b) трансмембранный домен (например, трансмембранный домен, как описано в данном документе), и (c) внутриклеточный домен (например, внутриклеточный домен, как описано в данном документе).

в контексте данного документа термин «иммунная клетка» относится к клетке, которая участвует в иммунном ответе, например, в стимуляции иммунного ответа. Примеры иммунных клеток включают, но не ограничиваются ими, макрофаги, моноциты, дендритные клетки, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки, тромбоциты, крупные гранулярные лимфоциты, клетки Лангерганса, естественные киллеры (NK), Т-лимфоциты или В-лимфоциты. Источник иммунных клеток (например, макрофагов, моноцитов или дендритных клеток) может быть получен от субъекта. К примерам субъектов относятся люди, обезьяны, шимпанзе, собаки, кошки, мыши, крысы и их трансгенные виды.

В некоторых вариантах осуществления популяция иммунных клеток, как описано в данном документе, включает моноциты, макрофаги, дендритные клетки и/или их предшественники. В некоторых вариантах осуществления популяция иммунных клеток

включает очищенную популяцию моноцитов, макрофагов или дендритных клеток или клеточную линию.

В некоторых вариантах осуществления активируется иммунная клетка, например, иммунная клетка демонстрирует повышенную продукцию цитокинов, продукцию хемокинов, фагоцитоз, клеточный сигналинг, уничтожение клеток-мишеней и/или презентацию антигена, например, относительно неактивной клетки. В некоторых вариантах осуществления активированная иммунная клетка демонстрирует изменения в экспрессии генов, например, индукцию экспрессии провоспалительных генов (например, один, два, три, четыре, пять, шесть или семь из TNF, IL-12, IFN, GM-CSF, G-CSF, M-CSF или IL-1), например, относительно неактивной клетки. В определенных вариантах осуществления активированные иммунные клетки подвергаются клеточному делению. В некоторых вариантах осуществления целевая эффекторная активность гена иммунной клетки усиливается за счет ингибирования активности CD47 и/либо активности SIRP α . Активность CD47 и/или SIRP α можно ингибировать путем обработки иммунной клетки антителом к CD47 или к SIRP α или любым способом, известным специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки) получают (например, выделяют) от субъекта. Иммунные клетки могут быть аутологичными или получены от аллогенных или универсальных доноров. Клетки могут быть получены из ряда источников, включая моноклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, ткань селезенки, пуповину, опухоли и/или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, такие как эмбриональные стволовые клетки (ESC). В определенных вариантах осуществления клетки могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта, с использованием любого количества методов разделения, известных специалистам в данной области техники, таких как разделение с использованием фикола. В некоторых вариантах осуществления клетки из циркулирующей крови субъекта получают путем афереза или лейкоафереза. Клетки, собранные с помощью афереза, можно промыть для удаления фракции плазмы и ресуспендировать в различных буферах (например, фосфатно-солевом буфере (PBS)) или культуральных средах. В некоторых вариантах осуществления обогащение иммунными клетками (например, моноцитами) включает адгезию к пластику. В некоторых вариантах осуществления после обогащения дифференцировка иммунных клеток (например, моноцитов) включает стимуляцию GM-CSF. В некоторых вариантах осуществления для обогащения используют композицию, содержащую клетки крови (например, моноциты,

лимфоциты, тромбоциты, плазму и/или эритроциты), такую как композиция для лейкофереза (например, лейкопак). В некоторых вариантах осуществления композиция для лейкофереза (например, лейкопак) содержит образец здорового донора-человека. В определенных вариантах осуществления за аферезом иммунных клеток (например, моноцитов) следует активация с помощью GM-CSF. В определенных вариантах осуществления селекция иммунных клеток (например, моноцитов) включает CD14-положительную селекцию с использованием микрочастиц (например, MicroBead от MACS® на устройстве CliniMACS Prodigy). В некоторых вариантах осуществления предшественник иммунных клеток (например, предшественники макрофагов, моноцитов, или дендритных клеток) используется в композициях и способах, описанных в данном документе. Предшественники иммунных клеток могут дифференцироваться *in vivo* или *ex vivo* в иммунные клетки. Неограничивающие примеры иммунных клеток-предшественников включают гемопоэтические стволовые клетки, общие миелоидные клетки-предшественники, миелобласты, монобласты, промоноциты или их промежуточные продукты. Например, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки можно использовать для получения моноцитов, макрофагов и/или дендритных клеток. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) могут быть получены из нормальных тканей человека, таких как периферическая кровь, фибробласты, кожа, кератиноциты или почечные эпителиальные клетки. Аутологичные, аллогенные или универсальные донорские iPSC могут быть дифференцированы в направлении миелоидной линии дифференцировки (например, моноцитов, макрофагов, дендритных клеток или их предшественников).

Иммунные клетки (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), как описано в данном документе, могут быть выделены из периферической крови, например, путем лизиса эритроцитов и истощения лимфоцитов и эритроцитов, например, путем центрифугирования в градиенте PERCOLL™. В качестве альтернативы иммунные клетки могут быть выделены из ткани пуповины. Специфическая субпопуляция иммунных клеток может быть дополнительно выделена методами положительной или отрицательной селекции. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть лишены клеток, экспрессирующих определенные антигены, включая, но не ограничиваясь ими, CD34, CD3, CD4, CD8, CD56, CD66b, CD19 или CD20. В некоторых вариантах осуществления обогащение популяции иммунных клеток, например, посредством отрицательной селекции, может быть достигнуто с использованием комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно отобранных клеток. В качестве неограничивающего примера, селекция клеток может также включать

отрицательную магнитную иммуноадгезивность или проточную цитометрию, в которой используется коктейль моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на отрицательно отобранных клетках.

Во время выделения желаемой популяции иммунных клеток (например, макрофагов, моноцитов или дендритных клеток), как описано в данном документе, с помощью положительной или отрицательной селекции, можно варьировать концентрацию и поверхность иммунных клеток (например, частиц, таких как гранулы). Может оказаться желательным значительно уменьшить объем, в котором частицы и клетки смешиваются друг с другом, чтобы обеспечить максимальную площадь контакта клеток и частиц.

В некоторых вариантах осуществления перед введением иммунные клетки (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), как описано в данном документе (например, содержащие CAR, описанный в данном документе), обрабатывают провоспалительным агентом. В некоторых вариантах осуществления лечение провоспалительным агентом повышает противоопухолевую активность иммунных клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления лечение по меньшей мере одним провоспалительным агентом способствует формированию фенотипа M1 (например, переключению с фенотипа M2 на фенотип M1) в иммунных клетках, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один провоспалительный агент содержит или представляет собой агонист CD40 (например, CD40L). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один провоспалительный агент содержит или представляет собой агонист лиганда 41BB (например, 4-1BB). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один провоспалительный агент содержит или представляет собой агонист CD40 (например, CD40L) и агонист лиганда 41BB (например, 4-1BB).

В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка содержат CAR, описанный в данном документе (например, CAR, содержащий один или более внеклеточных доменов, один или более трансмембранных доменов и один или более внутриклеточных доменов). В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритную клетку обрабатывают одним или более провоспалительными агентами. В некоторых вариантах осуществления модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка проявляют повышенную противоопухолевую активность по сравнению с немодифицированной клеткой того же типа. В некоторых вариантах осуществления один или более провоспалительных агентов содержат или представляют собой агонист CD40 (например,

CD40L). В некоторых вариантах осуществления один или более провоспалительных агентов содержат или представляют собой агонист лиганда 41BB (например, 4-1BB). В некоторых вариантах осуществления один или более провоспалительных агентов содержат или представляют собой агонист CD40 (например, CD40L) и агонист лиганда 41BB (например, 4-1BB). В изобретении предложены способы лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающие: доставку субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей модифицированный макрофаг, моноцит или дендритную клетку, описанные в данном документе.

В описании также предложены способы модификации макрофага, моноцита или дендритной клетки, содержащих CAR, описанный в данном документе (например, CAR, содержащий один или более внеклеточных доменов, один или более трансмембранных доменов и один или более внутриклеточных доменов), где способ включает обработку макрофага, моноцита или дендритной клетки одним или несколькими провоспалительными агентами, в результате чего получают модифицированные макрофаг, моноцит или дендритную клетку, проявляющие повышенную противоопухолевую активность по сравнению с немодифицированной клеткой того же типа. В некоторых вариантах осуществления один или более провоспалительных агентов содержат или представляют собой агонист CD40 (например, CD40L). В некоторых вариантах осуществления один или более провоспалительных агентов содержат или представляют собой агонист лиганда 41BB (например, 4-1BB). В некоторых вариантах осуществления один или более провоспалительных агентов содержат или представляют собой агонист CD40 (например, CD40L) и агонист лиганда 41BB (например, 4-1BB). В изобретении предложены способы лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающие: доставку субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей макрофаг, моноцит или дендритную клетку, модифицированные способами, описанными в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), как описано в данном документе (например, содержащие CAR, описанный в данном документе), вводят субъекту в комбинации с провоспалительным агентом. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), как описано в данном документе (например, содержащие CAR, описанный в данном документе), вводят субъекту по существу одновременно, до или после введения провоспалительного агента. В некоторых вариантах осуществления введение провоспалительного агента повышает противоопухолевую

активность иммунных клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления введение провоспалительного агента способствует формированию фенотипа M1 (например, переключению с фенотипа M2 на фенотип M1) в иммунных клетках, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления провоспалительный агент содержит или представляет собой агонист CD40 (например, CD40L). В некоторых вариантах осуществления провоспалительный агент содержит или представляет собой агонисты лиганда 41BB (например, 4-1BB).

Макрофаги

Макрофаги представляют собой иммунные клетки, специализирующиеся на обнаружении, фагоцитозе и разрушении клеток-мишеней, таких как патогены или опухолевые клетки. Макрофаги являются мощными эффекторами врожденной иммунной системы и способны выполнять как минимум три различные противоопухолевые функции: фагоцитоз мертвых и умирающих клеток, микроорганизмов, раковых клеток, клеточного дебриса или других чужеродных веществ; цитотоксичность в отношении опухолевых клеток; и презентацию опухолевых антигенов для организации адаптивного противоопухолевого иммунного ответа.

Накопленные данные свидетельствуют о том, что макрофаги в значительном количестве присутствуют в микроокружении многих видов злокачественных новообразований и могут принимать ряд фенотипов, которые в совокупности называются опухолеассоциированными макрофагами (ТАМ). Иммуносупрессивная природа микроокружения опухоли обычно приводит к большому количеству M2-подобных ТАМ, которые дополнительно способствуют общему подавлению противоопухолевого иммунного ответа. Однако недавние исследования показали, что ТАМ могут быть «перепрограммированы» с помощью провоспалительных сигналов и что переключение с фенотипа M2 на более M1 фенотип связано с продуктивными противоопухолевыми иммунными ответами. Индуцирование эндогенных ТАМ для переключения на клетки типа M1 и конструирование макрофагов, которые не могут быть переключены на M2, значительно усилит противоопухолевую иммунотерапию и представляет собой значительный прогресс в этой области.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг содержит или представляет собой недифференцированный макрофаг или M0 макрофаг. В определенных вариантах осуществления макрофаг содержит или экспрессирует один, два, три, четыре, пять или

шесть из CD14, CD16, CD64, CD68, CD71 или CCR5. Воздействие различных стимулов может вызвать поляризацию M0 макрофагов на несколько различных популяций, которые можно идентифицировать по маркерам фенотипа макрофагов, продукции цитокинов и/или секреции хемокинов.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг содержит или представляет собой поляризованный макрофаг. В классических условиях активации M0 макрофаги могут подвергаться воздействию провоспалительных сигналов, таких как LPS, IFN γ и GM-CSF, и поляризоваться в M1 макрофаги. Как правило, M1 макрофаги связаны с провоспалительными иммунными ответами, такими как ответы Т-клеток Th1 и Th17. Воздействие других стимулов может поляризовать макрофаги в разнообразную группу «альтернативно активированных» или M2 макрофагов.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг содержит или представляет собой M1 макрофаг. В некоторых вариантах осуществления макрофаг экспрессирует один или более маркеров M1 макрофагов (например, один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 из CD86, CD80, MHC II, IL-1R, TLR2, TLR4, iNOS, SOCS3, CD83, PD-L1, CD69, MHC I, CD64, CD32, CD16, IL1R, члена семейства IFIT или члена семейства ISG).

В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, секретирует относительно высокие уровни одного или более воспалительных цитокинов (например, один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11, или 12 из IL-1, TNF, IL-12, IL-18, IL-23, IFN α , IFN β , IFN γ , IL-2, IL-6, IL-8 или IL33) или хемокинов (например, один или оба из CC-или CXC-хемокинов) (например, один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 CXC-хемокинов; например, один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 CC-хемокинов; например, один из CX3C-хемокинов, например, один или оба C-хемокина), например, относительно макрофага без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, стимулирует иммунный ответ и/или воспаление, например, по сравнению с макрофагом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг содержит или представляет собой M2 макрофаг (например, макрофаг M2a, M2b, M2c и M2d). Макрофаг M2a может быть индуцирован IL-4, IL-13 и/или инфекцией, вызванной грибом. Макрофаг M2b может быть индуцирован лигандами IL-1R, иммунным комплексом и/или LPS. Макрофаг M2c

может быть индуцирован IL-10 и/или TGF β . Макрофаг M2d может быть индуцирован IL-6 и/или аденозином. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, снижает иммунный ответ у субъекта, например, по сравнению с макрофагом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг экспрессирует один или более маркеров M2 макрофагов (например, один, два или три маркера CD206, CD163 или CD209). В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет повышенную секрецию одного или более противовоспалительных цитокинов (например, одного или обоих IL-10 или TGF β), например, по сравнению с макрофагом без CAR, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг содержит по меньшей мере один маркер M1 с повышенной экспрессией и/или по меньшей мере один маркер M2 с пониженной экспрессией. В некоторых вариантах осуществления экспрессия по меньшей мере одного маркера M1 (например, HLA DR, CD86, CD80, PD-L1, CD83, CD69, MHC I, CD64, CD32, CD16, IL1R, член семейства IFIT и/или член семейства ISG) повышается в макрофаге. В некоторых вариантах осуществления экспрессия по меньшей мере одного маркера M2 (например, CD206, CD163 и/или CD209) снижается в макрофаге.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет повышенный фагоцитоз, например, по сравнению с макрофагом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет повышенную цитотоксичность в отношении опухолевой клетки, например, по сравнению с макрофагом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, демонстрирует повышенную презентацию опухолевого антигена (например, презентацию после фагоцитоза) и/или повышенный процессинг антигена, например, по сравнению с макрофагом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет повышенное уничтожение опухоли (например, за счет фагоцитоза, лизиса, апоптоза или продукции цитокинов, убивающих опухоль (например, TNF α), например, по сравнению с макрофагом без CAR, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, демонстрирует одно или обе из повышенной экспрессии благоприятных генов (например, CD80, CD86, MHC-I, MHC-II, CD40, 41BBL, TNF, IFN α , IFN β , IFN γ , IL2, IL12, IL6, IL8, IL1 β и/или CXCL12) или сниженной экспрессии неблагоприятных генов (например, CD163, CD206, TGF β , IL10 и/или IL4), например, по сравнению с макрофагом без CAR, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, демонстрирует повышенную продукцию АФК, например, по сравнению с макрофагом без CAR, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, демонстрирует метаболическое перепрограммирование (например, пути сигналинга интерферона, пути TNF, сигналинг PTEN, сигналинг PI3K, сигналинг MTOR, сигналинг TLR, сигналинг CD40, сигналинг 41BB, сигналинг 41BBL, сигналинг созревания макрофагов, сигналинг созревания дендритных клеток, сигналинг CD3-дзета, сигналинг Fc γ , сигналинг CD64, сигналинг CD32a, сигналинг CD32c, сигналинг CD16a, сигналинг TLR1, сигналинг TLR2, сигналинг TLR3, сигналинг TLR4, сигналинг TLR5, сигналинг TLR6, сигналинг TLR7, сигналинг TLR8, сигналинг TLR9, сигналинг ALK, сигналинг AXL, сигналинг DDR2, сигналинг EGFR, сигналинг EphA1, сигналинг INSR, сигналинг cMET, сигналинг MUSK, сигналинг PDGFR, сигналинг PTK7, сигналинг RET, сигналинг ROR1, сигналинг ROS1, сигналинг RYK, сигналинг TIE2, сигналинг TRK, сигналинг VEGFR, сигналинг CD40, сигналинг CD19, сигналинг CD20, сигналинг 41BB, сигналинг CD28, сигналинг OX40, сигналинг GITR, сигналинг TREM-1, сигналинг TREM-2, сигналинг DAP12, сигналинг MR, сигналинг ICOS, сигналинг MyD88, сигналинг V/I/LxYxxL/V, сигналинг SIRPa, сигналинг CD45, сигналинг Siglec-10, сигналинг PD1, сигналинг SHP-1, сигналинг SHP-2, сигналинг KIR-2DL, сигналинг KIR-3DL, сигналинг NKG2A, сигналинг CD170, сигналинг CD33, сигналинг BTLA, сигналинг CD32b, сигналинг SIRPb, сигналинг CD22, сигналинг PIR-B, и/или сигналинг LILRB1), например, относительно макрофагов без CAR, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет индукцию механизмов выживания клеток, например, по сравнению с макрофагом без CAR, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет индукцию механизмов гибели клеток, например, по сравнению с макрофагом без CAR, как описано в данном документе.

В некоторых

вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет одну, две, три, четыре или пять точек повышенной устойчивости к фагоцитарным контрольным точкам, повышенную экспрессию рецепторов хемокинов для облегчения переноса, повышенную экспрессию хемокинов для рекрутирования других иммунных клеток, повышенную экспрессию ферментов, разрушающих ECM (например, MMP, разрушающих ECM опухоли и/или проявляющих антифиброзную активность), или повышенную пролиферацию, например, по сравнению с макрофагами без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет один, два, три или четыре из увеличенной продолжительности экспрессии CAR, улучшенной стабильности CAR на поверхности клетки, повышенного уровня экспрессии CAR или сниженной фоновой активности CAR, например, по сравнению с макрофагом без CAR, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, ослабляет инфекцию (например, инфекционный агент) у субъекта, например, по сравнению с макрофагом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления инфекционный агент содержит или представляет собой вирус, простейшие (например, трипаносомы, малярию или токсоплазму), бактерии (например, микобактерии, сальмонеллы или листерии), грибы (например, *Candida*) или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления вирус включает вирус гепатита (например, гепатита А, гепатита В, гепатита С или гепатита Е), ретровирус, вирус иммунодефицита человека (например, ВИЧ1 или ВИЧ2), вирус Т-клеточного лейкоза, лимфотропный вирус (например, HTLV1 или HTLV2), вирус простого герпеса (например, вирус простого герпеса типа 1 или типа 2), вирус Эпштейна-Барра, цитомегаловирус, вирус ветряной оспы, полиовирус, вирус кори, вирус краснухи, вирус японского энцефалита, вирус эпидемического паротита, вирус гриппа, аденовирус, энтеровирус, риновирус, коронавирус (например, вирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), вирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS) или коронавирусную болезнь 2019 (COVID-19)), вирус Эбола, вирус Западного Нила или вариант или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, снижает образование и/или разрушает существующие агрегаты посредством фагоцитоза по меньшей мере одного

белкового агрегата у субъекта (например, у субъекта, имеющего нейродегенеративное заболевание, воспалительное заболевание, сердечно-сосудистое заболевание, фиброзное заболевание, амилоидоз или их комбинацию), например, относительно макрофага без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание выбрано из группы, состоящей из таупатии, альфа-синуклеопатии, пресенильной деменции, сенильной деменции, болезни Альцгеймера, прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), болезни Пика, первичной прогрессирующей афазии, лобно-височной деменции, кортико-базальной деменции, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, синдрома Дауна, множественной системной атрофии, бокового амиотрофического склероза (БАС), болезни Галлервордена-Шпатца, полиглутаминовой болезни, болезни экспансии тринуклеотидных повторов и прионной болезни. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из системной красной волчанки, васкулита, ревматоидного артрита, пародонтита, язвенного колита, синусита, астмы, туберкулеза, болезни Крона, хронической инфекции, наследственной периодической лихорадки, злокачественного новообразования, системных васкулитов, муковисцидоза, бронхоэктазов, буллезного эпидермолиза, циклической нейтропении, иммунодефицита, синдрома Макла — Уэльса (MWS) и семейной средиземноморской лихорадки (FMF). В некоторых вариантах осуществления амилоидоз выбран из группы, состоящей из первичного амилоидоза (AL), вторичного амилоидоза (AA), семейного амилоидоза (ATTR), амилоидоза, вызванного агрегацией бета-2-микроглобулина, локализованного амилоидоза, амилоидоза тяжелых цепей (AH), амилоидоза легких цепей (AL), первичного системного амилоидоза, A α I-амилоидоза, A α II-амилоидоза, A α IV-амилоидоз, вызванного аполипротеином C2 амилоидоза, вызванного аполипротеином C3 амилоидоза, лактоферринового амилоидоза роговицы, транстиретинового амилоидоза, диализного амилоидоза, фибриногенового амилоидоза, LECT2-амилоидоза (ALECT2) и лизоцимного амилоидоза. В некоторых вариантах осуществления сердечно-сосудистое заболевание выбрано из группы, состоящей из атеросклероза, ишемической болезни сердца, заболевания периферических артерий, гипертонической болезни сердца, метаболического синдрома, гипертензии, цереброваскулярного заболевания и сердечной недостаточности. В некоторых вариантах осуществления фиброзное заболевание выбрано из группы, состоящей из легочного фиброза, идиопатического легочного фиброза, цирроза, кистозного фиброза, склеродермии, сердечного фиброза, лучевого поражения легких, стеатогепатита, гломерулосклероза, интерстициального заболевания легких, фиброза печени, медиастинального фиброза, забрюшинного фиброза, фиброза костного мозга и фиброза кожи.

Уровни моноцитов

Моноциты представляют собой мультипотентные клетки, циркулирующие в крови, костном мозге и селезенке и, как правило, не пролиферирующие в стационарной фазе. Моноциты могут значительно различаться по размеру в диапазоне около 10-30 мкм в диаметре. Отношение ядра к цитоплазме для моноцита может варьироваться от около 2:1 до около 1:1. Как правило, моноциты содержат рецепторы хемокинов и патоген-распознающие рецепторы, которые опосредуют миграцию из крови в ткани, например, во время инфекции. Моноциты могут продуцировать воспалительные цитокины, поглощать клетки и/или токсичные молекулы и дифференцироваться в дендритные клетки или макрофаги.

В некоторых вариантах осуществления моноцит содержит или экспрессирует один или более фенотипических маркеров. Примеры фенотипических маркеров для клеток моноцитов человека включают, но не ограничиваются ими, CD9, CD11b, CD11c, CDw12, CD13, CD15, CDw17, CD31, CD32, CD33, CD35, CD36, CD38, CD43, CD49b, CD49e, CD49f, CD63, CD64, CD65s, CD68, CD84, CD85, CD86, CD87, CD89, CD91, CDw92, CD93, CD98, CD101, CD102, CD111, CD112, CD115, CD116, CD119, CDw12lb, CDw123, CD127, CDw128, CDw131, CD147, CD155, CD156a, CD157, CD162, CD163, CD164, CD168, CD171, CD172a, CD180, CD206, CD131a1, CD213 2, CDw210, CD226, CD281, CD282, CD284, и CD286. Примеры фенотипических маркеров для клеток моноцитов мыши включают, но не ограничиваются ими, CD11a, CD11b, CD16, CD18, CD29, CD31, CD32, CD44, CD45, CD49d, CD115, CD116, Cdw131, CD281, CD282, CD284, CD286, F4/80, и CD49b. В определенных вариантах осуществления моноциты содержат один, два или три из CD11b, CD14 или CD16. В определенных вариантах осуществления моноциты включают CD14⁺, CD16⁻ моноциты, CD14⁺, CD16⁺ моноциты или CD14⁻ CD16⁺ моноциты.

В некоторых вариантах осуществления моноцит дифференцируется в макрофаг. В некоторых вариантах осуществления моноцит дифференцируется в дендритную клетку (DC). Моноциты можно дифференцировать в макрофаги или DC любым способом, известным в данной области техники. Например, дифференцировка моноцитов в макрофаги может быть индуцирована колониестимулирующим фактором макрофагов (M-CSF). Дифференцировку моноцитов в DC можно индуцировать гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF) в сочетании с IL-4.

В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет повышенную секрецию одного или более цитокинов (например, одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или семи из TNF, IL-12, IFN, GM-CSF, G-CSF, M-CSF или IL-1), например, относительно моноцита без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет повышенный фагоцитоз, например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, демонстрирует повышенную выживаемость, например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет усиленную дифференцировку в макрофаги (например, M1 или M2 макрофаги), например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет повышенную дифференцировку в DC (например, присущие ткани или мигрирующие DC и/или в лимфоидной и нелимфоидной ткани), например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет повышенную цитотоксичность в отношении опухолевой клетки, например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, демонстрирует повышенную презентацию опухолевого антигена (например, презентацию после фагоцитоза) и/или повышенный процессинг антигена, например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет повышенное уничтожение опухоли (например, за счет фагоцитоза, лизиса, апоптоза или продукции цитокинов, убивающих опухоль (например, TNF α), например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, демонстрирует одну или обе из повышенной экспрессии благоприятных генов или пониженной экспрессии

неблагоприятных генов, например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, демонстрирует повышенную продукцию АФК, например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, демонстрирует метаболическое перепрограммирование, например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет индукцию механизмов выживания клеток, например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет индукцию механизмов гибели клеток, например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет одну, две, три, четыре или пять точек повышенной устойчивости к фагоцитарным контрольным точкам, повышенную экспрессию рецепторов хемокинов для облегчения переноса, повышенную экспрессию хемокинов для рекрутирования других иммунных клеток, повышенную экспрессию ферментов, разрушающих ЕСМ (например, ММР, разрушающих ЕСМ опухоли и/или проявляющих антифиброзную активность), или повышенную пролиферацию, например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет один, два, три или четыре из увеличенной продолжительности экспрессии CAR, улучшенной стабильности CAR на поверхности клетки, повышенного уровня экспрессии CAR или сниженной фоновой активности CAR, например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в данном документе.

Дендритные клетки

Дендритные клетки (DC) представляют собой специализированные антигенпрезентирующие клетки костного мозга, которые участвуют в инициации иммунных ответов и поддержании толерантности иммунной системы к собственным антигенам. Дендритные клетки могут быть обнаружены как в лимфоидных, так и в

нелимфоидных органах, и, как правило, считается, что они происходят из лимфоидных или миелоидных клеток.

В некоторых вариантах осуществления DC содержит или экспрессирует один или более фенотипических маркеров. Примеры фенотипических маркеров DC включают, но не ограничиваются ими, CD11c, CD83, CD1a, CD1c, CD141, CD207, CLEC9a, CD123, CD85, CD180, CD187, CD205, CD281, CD282, CD284, CD286 и частично CD206, CD207, CD208 и CD209.

Незрелые DC могут характеризоваться высокой способностью к захвату антигена, но относительно низкой способностью стимулировать Т-клетки. Медиаторы воспаления способствуют созреванию DC. Как только DC достигают стадии зрелости, происходит резкое изменение свойств по сравнению с незрелыми DC, такое как снижение способности захватывать антиген и/или повышенная способность стимулировать Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления DC содержит или представляет собой незрелую DC. В других вариантах осуществления DC содержит или представляет собой зрелую DC.

Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что модификация клетки DC для включения или экспрессии по меньшей мере одного CAR, описанного в данном документе, может позволить зрелой DC одновременно проявлять повышенную способность к захвату антигена и стимуляцию Т-клеток, например, по сравнению с DC без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления DC, содержащая или экспрессирующая по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, опосредует презентацию опухолевого антигена, например, повышенную презентацию опухолевого антигена по сравнению с DC без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления DC, содержащая или экспрессирующая по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, опосредуют стимуляцию опухолевых Т-клеток, например, повышенную стимуляцию Т-клеток по сравнению с DC без CAR, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления DC, содержащая или экспрессирующая по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, демонстрируют повышенную секрецию одного или более цитокинов (например, одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или семи из TNF, IL-12, IFN, GM-CSF, G-CSF, M-CSF или IL-1), например, относительно DC без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления DC, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет повышенный фагоцитоз, например, по сравнению с DC без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления DC, содержащая или

экспрессирующая по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, демонстрируют повышенную презентацию опухолевого антигена (например, презентацию после фагоцитоза), повышенный процессинг антигена, повышенную перекрестную презентацию антигена, повышенное праймирование Т-клеток и/или стимуляцию Т-клеток, например, относительно DC без CAR, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления DC, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, демонстрирует одну или обе из повышенной экспрессии благоприятных генов или пониженной экспрессии неблагоприятных генов, например, по сравнению с DC без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления DC, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, демонстрирует повышенную продукцию АФК, например, по сравнению с DC без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления DC, содержащая или экспрессирующая по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, демонстрируют метаболическое перепрограммирование, например, по сравнению с DC без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления DC, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет индукцию механизмов выживания клеток, например, по сравнению с DC без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления DC, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет индукцию механизмов гибели клеток, например, по сравнению с DC без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления DC, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет одну, две, три, четыре или пять точек повышенной устойчивости к фагоцитарным контрольным точкам, повышенную экспрессию рецепторов хемокинов для облегчения переноса, повышенную экспрессию хемокинов для рекрутирования других иммунных клеток, повышенную экспрессию ферментов, разрушающих ECM (например, ММР, разрушающих ECM опухоли и/или проявляющих антифиброзную активность), или повышенную пролиферацию, например, по сравнению с DC без CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления DC, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, проявляет один, два, три или четыре из увеличенной продолжительности экспрессии CAR, улучшенной стабильности CAR на поверхности клетки, повышенного уровня экспрессии CAR или сниженной фоновой активности CAR, например, по сравнению с DC без CAR, как описано в данном документе.

Химерные антигенные рецепторы (CAR)

Термин «химерный антигенный рецептор» или «CAR», используемый в данном документе, относится к искусственному рецептору клеточной поверхности, который сконструирован для экспрессии на иммунной эффекторной клетке и специфически нацеливается на клетку и/или связывает антиген. CAR можно использовать, например, в качестве терапии с adoptивным переносом клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления моноциты, макрофаги и/или дендритные клетки удаляют у пациента (например, из крови, опухоли или асцитной жидкости) и модифицируют таким образом, чтобы они экспрессировали рецептор, специфичный для конкретной формы антигена. В некоторых вариантах осуществления CAR были экспрессированы со специфичностью к антигену, например, ассоциированному с опухолью антигену. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку, например, модифицированные макрофаг, моноцит или дендритную клетку, получают путем экспрессии в ней CAR. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка содержит CAR, содержащий внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, при этом иммунная клетка включает макрофаг, моноцит или дендритную клетку.

В некоторых вариантах осуществления CAR может дополнительно содержать один или более из: одного или более внеклеточных лидерных доменов, одного или более внеклеточных шарнирных доменов и одного или более внутриклеточных костимулирующих доменов.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит спейсерный домен или шарнир между внеклеточным доменом и трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит спейсерный домен или шарнир между внутриклеточным доменом и трансмембранным доменом. В контексте данного документа термин «спейсерный домен» или «шарнир» относится к любому олиго- или полипептиду, функция которого заключается в связывании трансмембранного домена либо с внеклеточным доменом, либо с внутриклеточным доменом в полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления спейсерный домен или шарнир может содержать до 300 аминокислот, предпочтительно от 10 до 100 аминокислот и наиболее предпочтительно от 25 до 50 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления короткий олиго- или полипептидный линкер, предпочтительно длиной от 2 до 10 аминокислот, может образовывать связь между

трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом CAR. Пример линкера включает дублет глицин-серин.

В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка, содержащая CAR, может содержать одну или более систем контроля, включая, но не ограничиваясь ими: переключатель безопасности (например, переключатель включения и выключения, переключатель самоуничтожения), логический вентиль, например, вентиль «И» (например, два или более CAR, в каждом из которых отсутствует один или более сигнальных доменов, так что активация обоих/всех CAR необходима для полной активации или функционирования иммунных клеток (например, макрофагов, моноцитов или дендритных клеток), вентиль «ИЛИ» (например, два или более CAR, каждый с внутриклеточным доменом, таким как CD3 ζ , и костимулирующим доменом) и/или вентиль «НЕТ» (например, два или более CAR, один из которых включает ингибирующий домен, который антагонизирует функцию другого CAR).

Настоящее изобретение также относится к иммунным клеткам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты (например, выделенную последовательность нуклеиновой кислоты), кодирующую CAR, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую внеклеточный домен, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую трансмембранный домен, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую внутриклеточный домен, при этом клетка представляет собой моноцит, макрофаг или дендритную клетку, экспрессирующие CAR.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный домен, функционально связанный с другим доменом CAR, таким как трансмембранный домен или внутриклеточный домен, для экспрессии в иммунной клетке. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный домен, функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей трансмембранный домен, а нуклеиновая кислота, кодирующая трансмембранный домен, функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей внутриклеточный домен.

В некоторых вариантах осуществления эффекторная активность иммунной клетки, содержащей CAR, направлена против клетки-мишени, содержащей антиген, который специфически связывается с антигенсвязывающим доменом CAR. В некоторых вариантах осуществления целевая эффекторная активность, направленная против клетки-мишени, представляет собой или включает фагоцитоз, целевую клеточную цитотоксичность, презентацию антигена или секрецию цитокинов.

В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в данном документе, содержит по меньшей мере один домен (например, внеклеточный домен, трансмембранный домен и/или внутриклеточный домен), который ингибирует антифагоцитарный сигналинг в иммунной клетке, описанной в данном документе (например, макрофаге, моноците или дендритной клетке). В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в данном документе, улучшает эффекторную активность иммунной клетки, описанной в данном документе, (например, макрофага, моноцита или дендритной клетки), например, путем усиления ингибирования активности CD47 и/или SIRP α по сравнению с клеткой того же типа без CAR. В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в данном документе, связывает CD47, например, и служит в качестве доминантно-негативного рецептора, ингибируя активность SIRP α (например, клиренс CD47). В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в данном документе, который связывает SIRP α , например, содержит активирующий рецептор (например, содержит внутриклеточный домен CD3z). В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в данном документе, ингибирует по меньшей мере одно взаимодействие CD47 и SIRP α . В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой фагоцитарный логический вентиль или содержит его.

В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка, описанная в данном документе, (например, содержащая или экспрессирующая CAR, описанный в данном документе), содержит или экспрессирует по меньшей мере один вариант или фрагмент: SIRP α (например, доминантно-негативный SIRP α или высокоаффинный сконструированный вариант SIRP α (например, CV1)), scFv 5F9, scFv B6H12 (например, гуманизированный scFv B6H12), PD1 (например, доминантно-негативный PD1 или HAC-I), scFv к PD1 (например, E27 или дурвалумаб), Siglec (например, Siglec-10, Siglec-9 и/или Siglec-11), и/или SHP-1. В некоторых вариантах осуществления вариант или фрагмент содержит мутированный внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления вариант или фрагмент не содержит или не экспрессирует по меньшей мере один внутриклеточный домен (например, иммунная клетка содержит или не экспрессирует scFv к CD47, шарнирный домен CD8 и трансмембранный домен CD8). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка, описанная в данном документе (например, содержащая или экспрессирующая CAR, описанный в данном документе), содержит доминантно-негативный рецептор, например, блокирующий ингибирующую контрольную точку.

В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в данном документе, дополнительно содержит расщепляемый пептид (например, пептид P2A, F2A, E2A и/или T2A) и по меньшей мере один второй CAR, содержащий по меньшей мере один

ингибирующий домен антифагоцитарного сигналинга. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один второй CAR содержит SIRP α (например, высокоаффинный сконструированный вариант SIRP α (например, CV1)), scFv 5F9, scFv B6H12 (например, гуманизированный scFv B6H12) или внеклеточный домен, связывающий CD47, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один второй CAR содержит трансмембранный домен SIRP α или его фрагмент. В определенных вариантах осуществления второй CAR дополнительно содержит шарнирный домен (например, шарнирный домен CD8). В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один второй CAR содержит: (i) лидерную последовательность (например, лидерную последовательность CD8); ii) внеклеточный домен (например, внеклеточный домен SIRP α , CV1, scFv 5F9 или scFv B6H12 (например, гуманизированный scFv B6H12)); и ii) трансмембранный домен (например, трансмембранный домен SIRP α). В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в данном документе, дополнительно содержит расщепляемый пептид (например, пептид P2A) и по меньшей мере один маркерный белок (например, CD20 или его фрагмент, CD19 или его фрагмент, NGFR или его фрагмент, синтетический пептид и/или флуоресцентный белок).

В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка, описанная в данном документе (например, содержащая или экспрессирующая CAR, описанный в данном документе), содержит или экспрессирует один или более «мертвых» доменов фосфатазы (например, домен «мертвой» фосфатазы Shp1, «мертвой» фосфатазы 72-5птазы (INPP5E), «мертвой» фосфатазы Shp2 и/или «мертвой» фосфатазы SHIP-1) и/или конститутивно активный киназный домен (например, конститутивно активный домен LYN). В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в данном документе, дополнительно содержит расщепляемый пептид (например, пептид P2A, F2A, E2A и/или T2A) и один или более «мертвых» доменов фосфатаз (например, домен «мертвой» фосфатазы Shp1, «мертвой» фосфатазы 72-5птазы (INPP5E), «мертвой» фосфатазы Shp2 и/или «мертвой» фосфатазы SHIP-1) и/или конститутивно активный киназный домен (например, конститутивно активный домен LYN).

Внеклеточные домены

Настоящее изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR), содержащим внеклеточные домены. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит внеклеточный домен Fc-рецептора (FcR). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит внеклеточный домен Toll-подобного

рецептора (TLR). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит лидерный домен. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит шарнирный домен. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит один или более из внеклеточного домена FcR, внеклеточного домена TLR, лидерного домена, антигенсвязывающего домена и шарнирного домена. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен может быть доменом, который является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен может быть доменом, который не является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе).

Внеклеточные домены FcR

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен FcR включает полноразмерный внеклеточный домен FcR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен FcR содержит часть полноразмерного внеклеточного домена FcR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен FcR (или его часть) представляет собой или включает внеклеточный домен FcR человека. В некоторых вариантах реализации внеклеточный домен FcR может быть доменом, который является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен FcR может быть доменом, который не является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен FcR содержит домен CD64 (FcγRI), CD32a (FcγRIIa), CD32b (FcγRIIb), CD32c, CD16a (FcγRIIIa), CD16b (FcγRIIIb), FcεRI, FcεRII, или FcαRI (CD89).

Внеклеточные домены TLR

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TLR включает полноразмерный внеклеточный домен TLR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TLR включает часть полноразмерного внеклеточного домена TLR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TLR (или его часть) представляет собой или включает внеклеточный домен TLR человека. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TLR может быть доменом, который является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например,

модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TLR может быть доменом, который не является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TLR включает домен TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 или TLR9.

Лидерные домены

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит один или более внеклеточных лидерных доменов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую внеклеточный лидерный домен, но внеклеточный лидерный домен отщепляется от CAR до того, как CAR экспрессируется в иммунной клетке. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный лидерный домен представляет собой или включает внеклеточный лидерный домен человека. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный лидерный домен может быть доменом, который является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный лидерный домен может быть доменом, который не является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный лидерный домен включает внеклеточный лидерный домен CD8. В некоторых вариантах реализации внеклеточный лидерный домен содержит лидерный домен из стимулирующего или костимулирующего домена (например, домена TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, ALK, AXL, DDR2, EGFR, EphA1, INSR, cMET, MUSK, PDGFR, PTK7, RET, ROR1, ROS1, RYK, TIE2, TRK, VEGFR, CD40, CD19, CD20, 41BB, CD28, OX40, GITR, TREM-1, TREM-2, DAP12, MR, ICOS, MyD88).

Антигенсвязывающие домены

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном, например, на клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном, связанным с вирусной инфекцией, бактериальной инфекцией, паразитарной

инфекцией, аутоиммунным заболеванием и/или раковыми клетками. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен распознает антиген, который действует как маркер клеточной поверхности на клетке-мишени, связанной с конкретным болезненным состоянием.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с опухолевым антигеном, таким как антиген, специфичный в отношении опухоли или злокачественного новообразования, которые представляют интерес. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген содержит один или более эпитопов антигена злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген содержит CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (также называемый подгруппой CD2 1, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24); молекула-1, подобная лектину С-типа, (CLL-1 или CLECL1); CD33; вариант III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII); ганглиозид G2 (GD2); ганглиозид GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer); В-клеточный антиген созревания семейства рецепторов TNF (BCMA); антиген Tn ((Ag Tn) или (GalNAc α -Ser/Thr)); простатспецифический мембранный антиген (PSMA); подобный рецепторной тирозинкиназе орфанный рецептор-1 (ROR1); Fms-подобную тирозинкиназу 3 (FLT3); опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG72); CD38; CD44v6; карциноэмбриональный антиген (CEA); молекулу адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); субъединицу альфа-2 рецептора интерлейкина-13 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелин; рецептор-альфа интерлейкина 11 (IL-11Ra); антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA); сериновую протеазу 21 (тестизин или PRSS21); рецептор 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2); антиген Льюиса(Y); CD24; бета-рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR-бета); специфический для стадии эмбриональный антиген-4 (SSEA-4); CD20; рецептор фолиевой кислоты альфа; рецепторную тирозин-протеинкиназу ERBB2 (Her2/neu); ассоциированный с клеточной поверхностью муцин 1 (MUC1); рецептор эпидермального фактора роста (EGFR); молекулу адгезии нервных клеток (NCAM); простазу; кислую фосфатазу предстательной железы (PAP); мутированный фактор элонгации 2 (ELF2M); эфрин B2; белок активации фибробластов альфа (FAP); рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептор IGF-I), карбоангидразу IX (CAIX); бета-субъединицу протеасомы типа 9 (просомы, макропаина) (LMP2); гликопротеин 100 (gp100); слитый белок онкогена, состоящий из кластерного региона точечных разрывов (BCR) и гомолога 1 вирусного онкогена мышиноного лейкоза Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназу; рецептор 2 эфрина типа A (EphA2); фукозил GM1; молекулу адгезии сиалил-Льюиса (sLe); ганглиозид GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer); трансглутаминазу 5 (TGS5); высокомолекулярный антиген,

ассоциированный с меланомой (HMWMAA); о-ацетил-GD2 ганглиозид (OAcGD2); бета-рецептор фолиевой кислоты; эндотелиальный маркер опухоли 1 (TEM1/CD248); белок, связанный с опухолевым эндотелиальным маркером 7, (TEM7R); клаудин 6 (CLDN6); рецептор тиреотропного гормона (TSHR); рецептор, связанный с G-белком, класс C, группа 5, член D (GPRC5D); белок-61 открытой рамки считывания хромосомы X (CXORF61); CD97; CD179a; киназу анапластической лимфомы (ALK); полисиаловую кислоту; плацентоспецифический белок 1 (PLAC1); гексасахаридную часть гликоцерамида globoH (GloboH); антиген дифференцировки молочной железы (NY-BR-1); уроплакин 2 (UPK2); клеточный рецептор 1 вируса гепатита А (HAVCR1); адренорецептор бета 3 (ADRB3); паннексин 3 (PANX3); связанный с G-белком рецептор-20 (GPR20); комплекс лимфоцитарного антигена 6, локус К 9 (LY6K); ольфакторный рецептор 51E2 (OR51E2); белок альтернативной рамки считывания TCR гамма (TARP); белок опухоли Вильмса (WT1); раково-тестикулярный антиген-1 (NY-ESO-1); раково-тестикулярный антиген 2 (LAGE-1a); меланома-ассоциированный антиген-1 (MAGE-A1); транслокационно-вариантный ген ETS 6, расположенный на хромосоме 12p (ETV6-AML); белок сперматозоидов 17 (SPA17); член 1A семейства антигенов X (XAGE1); ангиопоэтин-связывающий рецептор-2 клеточной поверхности (Tie 2); меланомный раково-тестикулярный антиген-1 (MAD-CT-1); меланомный раково-тестикулярный антиген-2 (MAD-CT-2); связанный с fos антиген 1; опухолевый белок p53 (p53); мутантный p53; протеин; сурвивин; теломеразу; опухолевый антиген-1 карциномы предстательной железы (PCTA-1 или галектин-8), меланомный антиген-1, распознаваемый Т-клетками (MelanA или MART1); мутант саркомы крыс (Ras); теломеразную обратную транскриптазу человека (hTERT); точки разрыва характерных для саркомы транслокаций; меланомный ингибитор апоптоза (ML-IAP); ERG (ген слияния трансмембранной протеазы, серин 2 (TMPRSS2) ETS); N-ацетилглюкозаминилтрансферазу V (NA17); белок с парным боксом Pax-3 (PAX3); андрогеновый рецептор; циклин B1; получаемый из нейробластомы гомолог вирусного онкогена миелоцитоматоза птиц v-мус (MYCN); член C семейства гомологов Ras (RhoC); относящийся к тирозиназе белок-2 (TRP-2); цитохром P450 1B1 (CYP1B1); (подобный белкам цинковых пальцев) CCCTC-связывающий фактор (BORIS или Brother of the Regulator of Imprinted Sites), антиген плоскоклеточной карциномы, распознаваемый Т-клетками 3 (SART3); белок с парным боксом Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающий белок sp32 (OY-TES1); лимфоцит-специфическую протеинтирозинкиназу (LCK); заякоряющий киназу А белок-4 (AKAP-4); точку разрыва X при синовиальной саркоме 2 (SSX2); рецептор для конечных продуктов гликирования (RAGE-1); почечный убиквитинный белок-1 (RU1); почечный убиквитинный белок-2 (RU2); легумин; вирус Е6

папилломы человека (HPV E6); вирус E7 папилломы человека (HPV E7); кишечную карбоксилэстеразу; мутировавший белок теплового шока 70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; лейкоцит-ассоциированный иммуноглобулин-подобный рецептор-1 (LAIR1); Fc-фрагмент рецептора IgA (FCAR или CD89); член 2 подсемейства A лейкоцитарных иммуноглобулин-подобных рецепторов (LILRA2); член f подобного молекуле CD300 семейства (CD300LF); член A семейства 12 лектиновых доменов C-типа (CLEC12A); антиген-2 стромальных клеток костного мозга (BST2); содержащий EGF-подобный модуль муцин-подобный рецептору гормона белок-2 (EMR2); лимфоцитарный антиген-75 (LY75); глипикан-3 (GPC3); Fc-рецептор-подобный белок-5 (FCRL5); и иммуноглобулин лямбда-подобный полипептид-1 (IGLL1). В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген содержит ERBB2 (Her2/neu). В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген содержит PSMA. В определенных вариантах осуществления опухолевый антиген содержит мезотелин. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с неправильно свернутым белковым антигеном или белком белкового агрегата, таким как белок, специфичный в отношении представляющего интерес заболевания/нарушения. В некоторых вариантах осуществления заболевание/нарушение представляет собой нейродегенеративное заболевание/нарушение, воспалительное заболевание/нарушение, сердечно-сосудистое заболевание/нарушение, фиброзное заболевание/нарушение или амилоидоз (например, опосредованный белковыми агрегатами легких цепей иммуноглобулина или транстиретина). В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание/нарушение выбрано из группы, состоящей из таупатии, асинуклеопатии, пресенильной деменции, сенильной деменции, болезни Альцгеймера (опосредованной белковыми агрегатами бета-амилоида), сцепленного с хромосомой 17 паркинсонизма (FTDP-17), прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), болезни Пика, первично-прогрессирующей афазии, лобно-височной деменции, кортико-базальной деменции, болезни Паркинсона, болезни Паркинсона с деменцией, деменции с тельцами Леви, синдрома Дауна, множественной системной атрофии, бокового амиотрофического склероза (БАС), болезни Галлервордена-Шпатца, полиглутаминовой болезни, болезни экспансии тринуклеотидных повторов, семейной британской деменции, фатальной семейной бессонницы, синдрома Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, наследственного геморрагического инсульта с амилоидозом (исландский) (HCHW A-I), спорадической фатальной бессонницы (sFI), вариабельной протеаза-чувствительной прионопатии (VPSPr), семейной датской деменции и прионной болезни (например, болезни Крейтцфельдта-Якоба, CJD и вариантной болезни Крейтцфельда-Якоба (vCJD)).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает любой домен, который связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой или включает моноклональное антитело, поликлональное антитело, синтетическое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, нечеловеческое антитело или любой его фрагмент, например, scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой или включает аптамер, дарпин, центирин, природный или синтетический рецептор, аффитело или другую сконструированную молекулу распознавания белка. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой или включает антитело млекопитающего или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен полностью или частично получен от тех же видов, для которых в конечном итоге будет использоваться CAR. Например, для применения у людей антигенсвязывающий домен CAR включает человеческое антитело, гуманизированное антитело или его фрагмент (например, scFv). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен может представлять собой домен, который является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен может представлять собой домен, который не является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит один или более антигенсвязывающих доменов. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит два или более антигенсвязывающих доменов. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой биспецифический CAR. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка содержит два или более различных CAR, содержащих один или более антигенсвязывающих доменов. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка, содержащая биспецифический CAR и/или содержащая два или более различных CAR, содержащих один или более антигенсвязывающих доменов, может снижать нецелевые и/или целевые внетканевые эффекты, требуя присутствия двух антигенов. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка содержит биспецифический CAR и/или содержит два или более различных CAR, содержащих один или более антигенсвязывающих доменов, при этом CAR обеспечивают различные сигналы, которые в отдельности недостаточны для активации модифицированной клетки, но вместе являются синергичными, стимулируя активацию модифицированной клетки. В некоторых вариантах осуществления такая конструкция может называться логическим вентилем «И».

В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка, содержащая биспецифический CAR и/или содержащая два или более различных CAR, содержащих один или более антигенсвязывающих доменов, может снижать нецелевые и/или целевые внеклеточные эффекты, требуя присутствия одного антигена и во-вторых, нормальный белковый антиген отсутствует до стимуляции активности клетки. В некоторых вариантах осуществления такая конструкция может называться логическим вентилем «НЕТ». В отличие от вентиля «И», CAR-модифицированные клетки с вентилем «НЕТ» активируются путем связывания с одним антигеном. Однако связывание второго рецептора со вторым антигеном действует так, что подавляет активирующий сигнал, передаваемый через CAR. Как правило, такой ингибирующий рецептор должен быть направлен против антигена, который обильно экспрессируется в нормальной ткани, но отсутствует в опухолевой ткани.

Шарнирные домены

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит один или более внеклеточных шарнирных доменов. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный шарнирный домен представляет собой или включает внеклеточный шарнирный домен человека. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный шарнирный домен может быть доменом, который является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный шарнирный домен может быть доменом, который не является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления один или более внеклеточных шарнирных доменов включают внеклеточный шарнирный домен CD8a или внеклеточный шарнирный домен IgG4 или CD28. В некоторых вариантах осуществления один или более внеклеточных шарнирных доменов включают внеклеточный шарнирный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный шарнирный домен оптимизирует физико-химические параметры CAR, например, оптимальный размер по отношению к опухолевому антигену (например, позволяет исключить ингибирующие молекулы), оптимальную гибкость, оптимальный фолдинг белка, оптимальную стабильность белка, оптимальное связывание, оптимальную гомодимеризацию и/или отсутствие гомодимеризации.

Трансмембранные домены

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит трансмембранный домен, например, который соединяет внеклеточный домен с внутриклеточным доменом. В некоторых

вариантах осуществления трансмембранный домен естественным образом связан с одним или более другими доменами CAR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен можно модифицировать, чтобы избежать связывания с трансмембранными доменами других поверхностных мембранных белков, чтобы свести к минимуму взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен получают из природного связанного с мембраной или трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой или включает трансмембранный домен человека. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может представлять собой домен, который является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может быть доменом, который не является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD28, CD8a, CD64, CD32a, CD32c, CD16a, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, ALK, AXL, DDR2, EGFR, EphA1, INSR, cMET, MUSK, PDGFR, PTK7, RET, ROR1, ROS1, RYK, TIE2, TRK, VEGFR, CD40, CD19, CD20, 41BB, CD28, OX40, GITR, TREM-1, TREM-2, DAP12, MR, ICOS, MyD88, CD3-дзета, FcR γ , V/I/LxYxxL/V, SIRPa, CD45, Siglec-10, PD1, SHP-1, SHP-2, KIR-2DL, KIR-3DL, NKG2A, CD170, CD33, BTLA, CD32b, SIRPb, CD22, PIR-B, LILRB1, CD36, или Syk.

Трансмембранные домены FcR

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен FcR включает полноразмерный трансмембранный домен FcR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен FcR включает часть полноразмерного трансмембранного домена FcR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен FcR представляет собой или включает трансмембранный домен FcR человека или его часть. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен FcR может быть доменом, который является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен FcR может быть доменом, который не

является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен FcR содержит домен CD64 (FcγRI), CD32a (FcγRIIa), CD32b (FcγRIIb), CD32c, CD16a (FcγRIIIa), CD16b (FcγRIIIb), FcεRI, FcεRII, или FcαRI (CD89).

Трансмембранные домены TLR

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен TLR включает полноразмерный трансмембранный домен TLR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен TLR включает часть полноразмерного трансмембранного домена TLR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен TLR представляет собой или включает трансмембранный домен TLR человека или его часть. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен TLR может быть доменом, который является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен TLR может быть доменом, который не является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен TLR включает домен TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, или TLR9.

Внутриклеточные домены

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит один или более внутриклеточных доменов. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен представляет собой или включает внутриклеточный домен человека или его часть. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен может быть доменом, который является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен может быть доменом, который не является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен и/или другой цитоплазматический домен CAR отвечает за активацию клетки, в которой экспрессируется CAR (например, иммунной

клетки). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR отвечает за активацию и/или трансдукцию сигнала в иммунной клетке, содержащей указанный CAR.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR включает по меньшей мере один домен, ответственный за активацию и/или трансдукцию сигнала. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен представляет собой или включает по меньшей мере одну костимулирующую молекулу и сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR содержит двойные сигнальные домены. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR содержит более двух сигнальных доменов.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит цитоплазматическую часть поверхностного рецептора. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит костимулирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит молекулу, которая инициирует сигнальную трансдукцию в иммунной клетке.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR включает любую часть одной или более костимулирующих молекул, такую как по меньшей мере один сигнальный домен из CD3, гамма-цепи Fc-эпсилон RI, любого их производного или варианта, любой их синтетической последовательности, которая имеет одинаковые функциональные возможности и любые их комбинации.

Внутриклеточные домены FcR

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен FcR содержит полноразмерный внутриклеточный домен FcR. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен FcR содержит часть полноразмерного внутриклеточного домена FcR. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен FcR представляет собой или содержит внутриклеточный домен FcR человека или его часть. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен FcR может быть доменом, который является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен FcR может быть доменом, который не является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен FcR содержит домен CD64 (FcγRI),

CD32a (FcγRIIa), CD32b (FcγRIIb), CD32c (Fc γамма RIIc), CD16a (FcγRIIIa), CD16b (FcγRIIIb), FcεRI, FcεRII, или FcαRI (CD89).

Внутриклеточные домены TLR

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен TLR включает полноразмерный внутриклеточный домен TLR. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен TLR включает часть полноразмерного внутриклеточного домена TLR. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен TLR представляет собой или включает внутриклеточный домен TLR человека или его часть. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен TLR может быть доменом, который является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен TLR может быть доменом, который не является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен TLR включает домен TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 или TLR9.

Сигнальные домены

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит один или более внутриклеточных сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает внутриклеточный сигнальный домен человека или его часть. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен может быть доменом, эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен может быть доменом, который не является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления один или более внутриклеточных сигнальных доменов содержат внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета, FcR γ, CD64, CD32a, CD32c, CD16a, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, ALK, AXL, DDR2, EGFR, EphA1, INSR, cMET, MUSK, PDGFR, PTK7, RET, ROR1, ROS1, RYK, TIE2, TRK, VEGFR, CD40, CD19, CD20, 41BB, CD28, OX40, GITR, TREM-1, TREM-2, DAP12, MR, ICOS, MyD88, V/I/LxYxxL/V, SIRPa, CD45, Siglec-10, PD1, SHP-1, SHP-2, KIR-2DL,

KIR-3DL, NKG2A, CD170, CD33, BTLA, CD32b, SIRPb, CD22, PIR-B, LILRB1, Syk, лиганд 41BB (41BBL; TNFSF9), CD27, OX40L, CD32b, CD11b, ITGAM, SLAMF7, CD206, CD163, CD209, дектин-2, или рецепторов цитокина (например, внутриклеточный сигнальный домен IL1R, IL2R, IL3R, IL4R, IL5R, IL6R, IL7R, IL8R, IL9R, IL10R, IL11R, IL12R, IL13R, IL14R, IL15R, IL17R, IFNaR, IFNgR, TNFR, CSF1R, CSF2R, Dap10, CD36, дектин-1, или ICOSL)

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR включает двойные сигнальные домены, такие как 41BB, CD28, ICOS, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, бета-цепь рецептора CD116, CSF1-R, LRP1/CD91, SR-A1, SR-A2, MARCO, SR-CL1, SR-CL2, SR-C, SR-E, CR1, CR3, CR4, дектин 1, DEC-205, DC-SIGN, CD14, CD36, LOX-1, CD11b вместе с любым из сигнальных доменов, перечисленных в предыдущем абзаце, в любой комбинации.

Костимулирующие домены

В контексте данного документа термин «костимулирующая молекула» или «костимулирующий домен» относится к молекуле в иммунной клетке, которая используется для усиления или ослабления первоначального стимула. Например, ассоциированные с патогенами паттерн-распознающие рецепторы, такие как TLR или ось CD47/SIRP α , представляют собой молекулы на иммунных клетках, которые, соответственно, усиливают или ослабляют первоначальный стимул. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен включает TCR, CD3-дзета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD86, общую FcR-гамма, FcR beta (Fc-эпсилон R1b), CD79a, CD79b, Fc-гамма RIIa, DAP10, DAP12, Т-клеточный рецептор (TCR), CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганд, который специфически связывается с CD83, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD127, CD160, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, другие костимулирующие молекулы, описанные в данном

документе, любое их производное, вариант или фрагмент, любую синтетическую последовательность костимулирующей молекулы, которая обладает такой же функциональной способностью, и любые их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен может быть доменом, который является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе). В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен может быть доменом, который не является эндогенным для конкретного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в данном документе).

В контексте данного документа термин «костимулирующий сигнал» относится к сигналу, который в сочетании с первичным сигналом, таким как активация CAR на иммунной клетке, приводит к активации иммунной клетки.

Расщепляемые пептиды

В контексте данного документа термин «расщепляемый пептид» относится к пептиду, который может индуцировать расщепление рекомбинантного белка в клетке. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид представляет собой пептид 2A. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид представляет собой или включает пептид P2A, F2A, E2A или T2A. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих один или более расщепляемых пептидов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую расщепляемый пептид, также содержит одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих один или более внутриклеточных доменов, и одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, содержащих один или более пептидных агентов, где трансляция нуклеиновой кислоты приводит к образованию белка, содержащего один или более внутриклеточных доменов, отделенных от одного или более пептидных агентов расщепляемым пептидом. В некоторых вариантах осуществления первый промотор функционально связан с одной или более нуклеиновыми кислотами, кодирующими CAR, а второй промотор функционально связан с одной или более нуклеиновыми кислотами, кодирующими пептидный агент. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая CAR и необязательно один или более пептидных агентов, дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES может быть любой вирусной, хромосомной или искусственно

сконструированной последовательностью, которая инициирует кЭП-независимое связывание рибосомы с мРНК, облегчая инициацию трансляции.

Пептидные агенты

Используемый в данном документе термин «пептидный агент» относится к пептиду, коэкспрессированному с CAR в иммунной клетке. В некоторых вариантах осуществления пептидный агент коэкспрессируется с CAR для обеспечения стехиометрического баланса и оптимального сигналинга CAR. В некоторых вариантах осуществления пептидный агент образует гомодимер с идентичным пептидным агентом. В некоторых вариантах осуществления пептидный агент образует гетеродимер с другим пептидным агентом. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих один или более пептидных агентов. В некоторых вариантах осуществления пептидный агент представляет собой или включает гамма-цепь FcR.

В некоторых вариантах осуществления пептидный агент содержит любой пептид, белок, рецептор, секретируемое антитело или его фрагмент (например, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fc или наноантитело). В некоторых вариантах осуществления пептидный агент содержит один или более цитокинов (например, один или более из IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-α, IFNα, IFNβ, IFN-γ, GM-CSF, или M-CSF), CD40-L, доминантно-негативный SIRPα, доминантно-негативный PD1, доминантно-негативный CD45, доминантно-негативный SIGLEC 10 или доминантно-негативный LILRB.

Fc-рецепторы (FcR)

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит один или более антигенсвязывающих доменов и внеклеточный домен FcR, и/или трансмембранный домен CAR включает трансмембранный домен FcR, и/или внутриклеточный домен CAR включает внутриклеточный домен FcR. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит от N-конца к C-концу один или более внеклеточных связывающих доменов, внеклеточный домен FcR, трансмембранный домен FcR и внутриклеточный домен FcR. В некоторых вариантах осуществления один или более из внеклеточного домена FcR, трансмембранного домена FcR и внутриклеточного домена FcR представляет собой или включает домен FcR человека. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен FcR, трансмембранный домен FcR и внутриклеточный домен FcR вместе составляют полноразмерный FcR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен FcR, трансмембранный домен FcR и

внутриклеточный домен FcR вместе составляют часть полноразмерного FcR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен FcR содержит часть полноразмерного внеклеточного домена FcR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен FcR включает часть полноразмерного трансмембранного домена FcR. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен FcR содержит часть полноразмерного внутриклеточного домена FcR.

Toll-подобные антигенные рецепторы (TLR)

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит один или более антигенсвязывающих доменов и внеклеточный домен Toll-подобного рецептора (TLR), и/или трансмембранный домен CAR включает трансмембранный домен TLR, и/или внутриклеточный домен CAR включает внутриклеточный домен TLR. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит от N-конца к С-концу один или более внеклеточных связывающих доменов, внеклеточный домен TLR, трансмембранный домен TLR и внутриклеточный домен TLR. В некоторых вариантах осуществления один или более из внеклеточного домена TLR, трансмембранного домена TLR и внутриклеточного домена TLR представляет собой или включает домен TLR человека. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TLR, трансмембранный домен TLR и внутриклеточный домен TLR вместе составляют полноразмерный TLR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TLR, трансмембранный домен TLR и внутриклеточный домен TLR вместе составляют часть полноразмерного TLR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TLR включает часть полноразмерного внеклеточного домена TLR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен TLR включает часть полноразмерного трансмембранного домена TLR. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен TLR включает часть полноразмерного внутриклеточного домена TLR.

Конструкции нуклеиновых кислот

Настоящее раскрытие, среди прочего, обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, или его фрагмент. Иммунная клетка может содержать молекулу нуклеиновой кислоты (например, экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты), кодирующую по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления молекула

нуклеиновой кислоты, кодирующая по меньшей мере один CAR, содержит: (a) внеклеточный домен (например, внеклеточный домен, как описано в данном документе), (b) трансмембранный домен (например, трансмембранный домен, как описано в данном документе), и (c) внутриклеточный домен (например, внутриклеточный домен, как описано в данном документе).

Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Выражение «нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК» также может включать интроны в той мере, в какой нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может, в некоторых версиях, содержать интрон(-ы). Термин «кодирующий» относится к присущему свойству конкретных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих или определенную последовательность нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и мРНК), или определенную последовательность аминокислот, а также к биологическим свойствам, полученным в результате этого. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодируют белок, если в результате транскрипции и трансляции мРНК, соответствующей этому гену, вырабатывается белок в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно предоставляется в перечнях последовательностей, так и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут рассматриваться как кодирующие белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Термин «функционально связанный» или «транскрипционный контроль» относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной нуклеотидной последовательностью, которая приводит к экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты является функционально соединенной со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты попадает в функциональную взаимосвязь со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Функционально связанные последовательности ДНК могут быть смежными друг с другом и, например, если

необходимо соединить две кодирующие белок области, находиться в одной и той же рамке считывания.

В контексте данного документа термины «фрагмент» или «часть» относятся к структуре, которая включает дискретную часть целого, но не имеет одного или более фрагментов, присутствующих во всей структуре. В некоторых вариантах осуществления фрагмент состоит из такой дискретной части. В некоторых вариантах осуществления фрагмент состоит из или включает характерный структурный элемент или фрагмент, присутствующий в целом. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный фрагмент содержит или состоит из по меньшей мере 3, 4, 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, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или более мономерных единиц (например, нуклеиновых кислот), обнаруженных в целой нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный фрагмент полимера содержит или состоит из, по меньшей мере, около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 25%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более мономерных единиц (например, остатков), присутствующих во всей нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления весь материал или объект может называться «исходными» для целого.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие по меньшей мере один описанный в данном документе CAR или его фрагмент, могут представлять собой молекулу ДНК, молекулу РНК или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты включает или представляет собой транскрипт матричной РНК (мРНК), кодирующий по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты включает или представляет собой конструкцию ДНК, кодирующую по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, или его фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления весь CAR или его фрагмент, описанные в данном документе, кодируются молекулой кодон-оптимизированной нуклеиновой кислоты, например, для экспрессии в клетке (например, клетке млекопитающего). В данной области техники известны различные способы оптимизации кодонов, например, как описано в патентах США №№ 5786464 и 6114148, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один CAR, как описано в данном документе, или его

фрагмент. В некоторых вариантах осуществления вектор включает плазмиду, вирусный вектор, фагмиду, ретротранспозон (например, piggyBac или «Sleeping beauty»), сайт-направленный инсерционный вектор (например, системы CRISPR/Cas (например, системы CRISPR/Cas, содержащие один или более из Cas9, Cas12a, или C2c2), нуклеазы с цинковыми пальцами или TALEN для вставки матричной донорной ДНК, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере один CAR, как описано в данном документе), суицидальный вектор экспрессии или любой другой вектор, известный в данной области техники. Векторы могут быть пригодны для репликации и интеграции в эукариотах. Векторы могут включать векторы экспрессии, векторы репликации, векторы получения зондов и векторы секвенирования.

Вектор может содержать точку начала репликации, промоторную последовательность (например, конститутивный или индуцируемый промотор) и/или подходящие сайты рестрикционных эндонуклеаз (см., например, WO 01/96584; WO 01/29058; и патент США № 6326193, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки). Вектор также может включать, например, сигнальную последовательность для облегчения секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (например, сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH)), элемент, обеспечивающий эписомальную репликацию и репликацию в прокариотах (например, точку начала репликации SV40 и/или ColE1), элементы, обеспечивающие селекцию (например, ген устойчивости к ампициллину и/или маркер зеоцина), и/или репортерные гены (например, люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, секретируемую щелочную фосфатазу или зеленый флуоресцентный белок).

Экспрессия нуклеиновых кислот, как описано в данном документе, может быть достигнута путем функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид CAR или его фрагмент, с промотором в векторе экспрессии. Иллюстративные промоторы (например, конститутивные промоторы) включают, но не ограничиваются ими, промотор фактора элонгации-1 α (Ef-1 α), немедленно ранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор убиквитина С, промотор фосфоглицерокиназы (PGK), ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор длинных концевых повторов (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор вируса мышинного лейкоза Молони (MoMuLV), промотор вируса птичьего лейкоза, немедленно ранний промотор вируса Эпштейна-Барра, промотор вируса саркомы Рауса, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина или промотор креатинкиназы. Примеры индуцируемых промоторов включают, помимо прочего, промотор

металлотионина, промотор глюкокортикоида, промотор прогестерона и тетрациклиновый промотор. Вектор также может содержать дополнительные промоторные элементы, например, энхансеры, для регуляции частоты инициации транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, или его фрагмент, включает или представляет собой вирусный вектор. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области техники и описана, например, в Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY). Примеры вирусных векторов включают, но не ограничиваются ими, аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса или ретровирусные векторы (например, лентивирусный вектор или гаммаретровирусный вектор). В некоторых вариантах осуществления вектор включает лентивирусный вектор (например, как описано в патенте США № 9149519 или международной публикации № WO 2017/044487, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор включает аденовирусный вектор. Аденовирусы представляют собой большое семейство вирусов, содержащих двухцепочечную ДНК. Они реплицируются в ядре клетки-хозяина, используя механизмы клетки-хозяина для синтеза вирусной РНК, ДНК и белков. В данной области техники известно, что аденовирусы могут поражать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, вмещать большие трансгены и кодировать белки без интеграции в геном клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления аденовирусный вектор содержит вектор Ad2 или вектор Ad5 (например, аденовирусный вектор Ad5f35, например, хелпер-зависимый аденовирусный вектор Ad5F35).

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Системы AAV, как правило, хорошо известны в данной области техники (см., например, Kelleher and Vos, Biotechniques, 17(6):1110-17 (1994); Cotten et al., P.N.A.S. U.S.A., 89(13):6094-98 (1992); Curiel, Nat Immun, 13(2-3):141-64 (1994); Muzyczka, Curr Top Microbiol Immunol, 158:97-129 (1992); и Asokan A, et al., Mol. Ther., 20(4):699-708 (2012)). Способы получения и использования рекомбинантных векторов AAV (rAAV) описаны, например, в патенте США №№ 5139941 и 4797368.

Было охарактеризовано несколько серотипов AAV, включая AAV1, AAV2, AAV3 (например, AAV3B), AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, и AAV11, а также

их варианты. Как правило, любой серотип AAV можно использовать для доставки по меньшей мере одного описанного в данном документе CAR. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор включает аденовирусный вектор.

Недавно было показано, что в некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas9 способствует высокому уровню точного редактирования генома с использованием векторов на основе аденоассоциированного вируса (AAV), которые служат в качестве донорной матрицы ДНК во время гомологичной рекомбинации (HR).

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит гаммаретровирусный вектор (например, как описано у Tobias Maetzig et al., «Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application» *Viruses*. 2011 Jun; 3(6): 677–713, который полностью включен в данный документ посредством ссылки). Примеры гаммаретровирусных векторов включают вирус лейкемии мышей (MLV), вирус некроза селезенки (SFFV), и вирус миелопролиферативной саркомы (MPSV) и полученные из них векторы.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит две или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, например, по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, и второй CAR, например, другой CAR, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления две или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих CAR и второй CAR, кодируются одной нуклеиновой молекулой, например, в одной рамке считывания и в виде одной полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления два или более CAR разделены одним или более сайтами расщепляемых пептидов (например, сайтом ауторасщепления или субстратом для внутриклеточной протеазы). В определенных вариантах осуществления расщепляемый пептид включает пептид свиного тешовируса-1 (P2A), пептид вируса *Thosea asigna* (T2A), пептид вируса ринита лошадей A (E2A), пептид вируса ящура (F2A) или их вариант.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, например, по меньшей мере один CAR, описанный в данном документе, и по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один ген, коэкспрессируемый с CAR, например, цитокин, описанный в данном документе, (например, TNF, IL-12, IFN, GM-CSF, G-CSF, M-CSF и/или IL-1) или стимулирующий лиганд, описанный в данном документе (например, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ICOS-L, ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, бета-рецептор лимфотоксина, 3/TR6, ILT3, ILT4,

HVEM, агонист или антитело, которое связывает рецептор лиганда Toll, и/или лиганд B7-Н3.

Фармацевтические композиции

Настоящее изобретение, среди прочего, обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие иммунные клетки, как описано в данном документе (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки) в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами.

Когда указывается «терапевтически эффективное количество», «иммунологически эффективное количество», «эффективное количество против иммунного ответа» или «эффективное количество, ингибирующее иммунный ответ», врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, весе, иммунном ответе и состоянии пациента (субъекта) может быть определено точное количество фармацевтической композиции, содержащей иммунные клетки, описанные в данном документе, (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки).

Фармацевтические композиции, содержащие иммунные клетки, как описано в данном документе (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), могут содержать буферы, включая нейтральный солевой буфер или фосфатно-солевой буфер (PBS); углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза, декстраны или маннит; белки, полипептиды или аминокислоты (например, глицин); антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит загрязнителей, например, нет определяемых уровней загрязнителя (например, эндотоксина).

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, можно вводить способом, соответствующим заболеванию, нарушению или состоянию, которое необходимо лечить или предотвращать. Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента, а также тип и тяжесть заболевания, нарушения или состояния пациента, хотя соответствующие дозы могут быть определены с помощью клинических исследований.

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть в различных формах. К ним относятся, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий),

дисперсии или суспензии, липосомы и суппозитории. Предпочтительные композиции могут представлять собой растворы для инъекций или инфузий. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть приготовлены для внутривенного, подкожного, внутрикожного, внутриопухолевого, интранодального, интрамедуллярного, внутримышечного, трансартериального или внутрибрюшинного введения.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, составлена для парентерального (например, внутривенного, подкожного, внутрибрюшинного или внутримышечного) введения. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе фармацевтическая композиция составлена для внутривенной инфузии или инъекции. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе фармацевтическая композиция составлена для внутримышечной или подкожной инъекции. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены для введения с использованием методов инфузии, которые широко известны в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

В контексте данного документа термины «вводимый парентерально» и «парентеральное введение» относятся к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, как правило, путем инъекции или инфузии, и включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную, внутриопухолевую и интрастернальную инъекцию и инфузию.

Фармацевтические композиции, содержащие иммунные клетки, как описано в данном документе, можно вводить в дозе от около 10^4 до около 10^9 клеток/кг массы тела (например, от около 10^5 до около 10^6 клеток/кг массы тела), включая все целые значения в этих диапазонах). В некоторых вариантах осуществления доза иммунных клеток, как описано в данном документе (например, макрофагов, моноцитов или дендритных клеток), составляет по меньшей мере около 1×10^6 , около $1,1 \times 10^6$, около 2×10^6 , около $3,6 \times 10^6$, около 5×10^6 , около 1×10^7 , около $1,8 \times 10^7$, около 2×10^7 , около 5×10^7 , около 1×10^8 , около 2×10^8 , около 5×10^8 , около 1×10^9 , около 2×10^9 , или около 5×10^9 клеток. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, также можно вводить несколько раз в определенной дозировке. Специалист в данной области может легко определить

оптимальную дозировку и режим лечения для конкретного пациента путем наблюдения за пациентом на наличие признаков заболевания, нарушения или состояния и соответствующей корректировки лечения.

Может быть желательно ввести фармацевтические композиции, содержащие иммунные клетки (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), как описано в настоящем документе, субъекту, а затем повторно взять кровь (или провести аферез), активировать собранные иммунные клетки и повторно ввести субъекту активированные иммунные клетки. Этот процесс можно выполнять несколько раз, например, каждые несколько недель. Иммунные клетки (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки) могут быть активированы при заборе крови объемом от около 10 куб.см до около 400 куб.см. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки) активируются при заборе крови в объеме около 20 куб.см, около 30 куб.см, около 40 куб.см, около 50 куб.см, около 60 куб.см, около 70 куб.см, около 80 куб.см, около 90 куб.см или около 100 куб.см. Не ограничиваясь теорией, способы, включающие многократные заборы крови и реинфузии, как описано в данном документе, могут быть выбраны для определенных популяций иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие иммунные клетки, как описано в настоящем документе (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), вводят в сочетании с (например, до, одновременно или после) второй терапией. Например, вторая терапия может включать, помимо прочего, противовирусную терапию (например, цидофовир, интерлейкин-2, цитарабин (ARA-C) или натализумаб), терапию на основе Т-клеток с химерными антигенными рецепторами (CAR-T), терапию на основе Т-клеток с Т-клеточным рецептором (TCR), химиотерапию, облучение, иммунодепрессант (например, циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат, антитело FK506 или глюкокортикоиды), антагонист (например, один или более из антагониста PD-1, антагониста PD-L1, антагониста CTLA4, антагониста CD47, антагониста SIRPα, агонистов CD40, антагониста CSF1/CSF1R или агониста STING) или иммунодеструктивное средство (например, антитело к CD52 (например, алектузумаб), антитело к CD3, цитотоксин, флударибин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофеноловую кислоту, стероид, FR901228 или облучение).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие иммунные клетки, как описано в данном документе (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), вводят в комбинации (например, до, одновременно или после) с трансплантацией костного мозга или антилимфоцитарной терапии с использованием

химиотерапевтического агента (например, флударабина, наружную дистанционную лучевую терапии (XRT), циклофосфамида или ритуксана). В определенных вариантах осуществления субъекты проходят стандартное лечение высокодозной химиотерапией с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В определенных вариантах осуществления после трансплантации субъекты получают инфузию фармацевтической композиции, содержащей иммунные клетки, как описано в данном документе. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, можно вводить до или после операции.

Дозировка любой вышеупомянутой терапии для введения субъекту будет варьироваться в зависимости от заболевания, нарушения или состояния, которое лечат, и в зависимости от конкретного субъекта. Масштабирование доз для введения человеку можно выполнять в соответствии с принятыми в данной области техники практиками. Например, доза алемтузумаба, как правило, составляет от около 1 мг до около 100 мг для взрослого человека, как правило, вводимого ежедневно в течение периода от около 1 дня до около 30 дней, например, суточная доза составляет от около 1 мг до около 10 мг в день (например, как описано в патенте США № 6120766, который полностью включен в данный документ посредством ссылки).

Способы лечения

Настоящее изобретение, среди прочего, обеспечивает способы лечения заболевания или нарушения (например, заболевания или нарушения, описанного в данном документе) у субъекта, включающие доставку фармацевтической композиции, содержащей иммунные клетки, как описано в данном документе (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки). В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, описанной в данном документе, вводят субъекту, имеющему заболевание или нарушение. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть использованы для производства лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения у субъекта или для стимуляции иммунного ответа у субъекта.

Субъектом, которого лечат способами, описанными в данном документе, может быть млекопитающее, например, примат, например, человек (например, пациент, имеющий или подверженный риску заболевания или нарушения, описанного в данном документе). В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки) могут быть аутологичными, аллогенными или ксеногенными по

отношению к субъекту. Фармацевтические композиции, как описано в данном документе, можно вводить субъекту в соответствии с режимом дозирования, описанным в данном документе, отдельно или в комбинации с одним или более терапевтическими агентами, процедурами или способами воздействия.

Фармацевтическая композиция, содержащая иммунные клетки, как описано в данном документе (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), может быть использована для лечения или профилактики заболевания, связанного с опухолью или злокачественным новообразованием, нейродегенеративного заболевания или нарушения, воспалительного заболевания или нарушения, сердечно-сосудистого заболевания или нарушения, фиброзного заболевания или нарушения, заболевания, связанное с амилоидозом, и их комбинации.

Предложен способ лечения (например, одного или более из уменьшения, ингибирования или замедления прогрессирования) злокачественного новообразования или опухоли у субъекта помощью фармацевтической композиции, содержащей иммунные клетки, как описано в данном документе (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки). Субъект может иметь взрослую или детскую форму злокачественного новообразования. Злокачественное новообразование может находиться на ранней, промежуточной или поздней стадии или быть метастатическим злокачественным новообразованием. Злокачественное новообразование может включать, но не ограничиваться ими, солидную опухоль, гемобластоз (например, лейкоз, лимфому или миелому, например, множественную миелому) или метастатическое поражение. Примеры солидных опухолей включают злокачественные новообразования, например, саркомы и карциномы, например, аденокарциномы различных систем органов, такие как поражающие легкие, молочные железы, яичники, лимфоидные ткани, желудочно-кишечный тракт (например, толстая кишка), анальный канал, половые органы и мочеполовой тракт (например, почки, уротелиальные клетки, клетки мочевого пузыря, предстательную железу), глотку, ЦНС (например, мозг, нервные или глиальные клетки), голову и шею, кожу (например, меланому, например, кожную меланому), поджелудочную железу и кости (например, хордому).

В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование выбрано из рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) (например, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) с плоскоклеточным и/или неплоскоклеточным гистологическим строением, или аденокарциномы), или мелкоклеточного рака легкого (SCLC)), рака кожи (например, карциномы из клеток Меркеля или меланомы (например,

запущенной меланомы)), рака яичников, мезотелиомы, рака мочевого пузыря, саркомы мягких тканей (например, гемангиоперицитомы (HPC)), рака кости (саркомы кости), рака почки (например, рак почек (например, почечно-клеточной карциномы)), рака печени (например, гепатоцеллюлярной карциномы), холангиокарциномы, саркомы, миелодиспластического синдрома (MDS), рака предстательной железы, рака молочной железы (например, рака молочной железы, который не экспрессирует один, два или все из рецептора эстрогена, рецептора прогестерона или Her2/neu, например, трижды негативного рака молочной железы), колоректального рака (например, рецидива колоректального рака или метастатического колоректального рака, например, колоректального рака с микросателлитной нестабильностью, колоректального рака с микросателлитной стабильностью, колоректального рака с превышающей средней уровень репарацией неспаренных оснований или колоректального рака с дефицитом репарации неспаренных оснований), рака носоглотки, рака двенадцатиперстной кишки, рака эндометрия, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи (например, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC)), рака анального канала, рака желудочно-пищеводного тракта, рака щитовидной железы (например, анапластической карциномы щитовидной железы), рака шейки матки (например, плоскоклеточного рака шейки матки), нейроэндокринной опухоли (NET) (например, атипичной карциноидной опухоли легкого), лимфопролиферативного заболевания (например, посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания), лимфомы (например, Т-клеточной лимфомы, В-клеточной лимфомы или неходжкинской лимфомы), миеломы (например, множественной миеломы) или лейкоза (например, миелоидного лейкоза или лимфоидного лейкоза).

В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой опухоль головного мозга, например, глиобластому, глиосаркому или рецидивирующую опухоль головного мозга. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак поджелудочной железы, например, запущенный рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак кожи, например, меланому (например, меланому стадии II-IV, HLA-A2-положительную меланому, нерезектабельную меланому или метастатическую меланому) или карциному из клеток Меркеля. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак почки, например, почечно-клеточную карциному (RCC) (например, метастатическую почечно-клеточную карциному). В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак молочной железы, например, метастатическую карциному молочной железы или карциному молочной железы IV стадии,

например, трижды негативный рак молочной железы (TNBC). В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой вирус-ассоциированное злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак анального канала (например, плоскоклеточный рак анального канала). В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак шейки матки (например, плоскоклеточный рак шейки матки). В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак желудка (например, положительный по вирусу Эпштейна-Барра (EBV) рак желудка, или рак желудка или желудочно-пищеводного соединения). В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак головы и шеи (например, ВПЧ-положительный и отрицательный плоскоклеточный рак головы и шеи (SCCHN)). В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак носоглотки (NPC). В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой колоректальный рак, например, рецидивирующий колоректальный рак, метастатический колоректальный рак, например, колоректальный рак с микросателлитной нестабильностью, колоректальный рак с микросателлитной стабильностью, колоректальный рак с превышающей средней уровень репарацией неспаренных оснований или колоректальный рак с дефицитом репарации неспаренных оснований.

В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой лейкоз, например, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический лейкоз или острый лейкоз. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой лимфому, например, лимфому Ходжкина (HL), неходжкинскую лимфому, лимфоцитарную лимфому или диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) (например, рецидивирующую или рефрактерную HL или DLBCL). В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой миелому, например, множественную миелому.

Фармацевтическую композицию, содержащую иммунные клетки, как описано в данном документе (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), можно использовать для усиления или модулирования иммунного ответа у субъекта. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, усиливает,

стимулирует или повышает иммунный ответ у субъекта (например, у субъекта, имеющего или подверженного риску заболевания или нарушения, описанного в данном документе). В определенных вариантах осуществления субъект имеет иммунодефицит или подвержен риску его развития. Например, субъект проходит или прошел химиотерапевтическое лечение и/или лучевую терапию.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или подвержен риску развития воспалительного заболевания (например, хронического или острого воспалительного заболевания). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или подвержен риску развития аутоиммунного заболевания или нарушения. Иллюстративные аутоиммунные заболевания, которые можно лечить описанными в данном документе способами, включают, но не ограничиваются ими, болезнь Альцгеймера, астму (например, бронхиальную астму), аллергию (например, atopическую аллергию), синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), атеросклероз, болезнь Бехчета, болезнь Крона, целиакию, кардиомиопатию, болезнь Крона, цирроз печени, диабет, диабетическую ретинопатию, экзему, фибромиалгию, фибромиозит, гломерулонефрит, реакцию трансплантат против хозяина (РТПХ), синдром Гийена-Барре, гемолитическую анемию, рассеянный склероз, тяжелую миастению, остеоартрит, полихондрит, псориаз, ревматоидный артрит, сепсис, инсульт, васкулит, индуцированное ИВЛ повреждение легких, отторжение трансплантата, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматизм, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, язвенный колит, увеит, витилиго или гранулематоз Вегенера.

Введение фармацевтических композиций, описанных в данном документе, можно осуществлять любым удобным способом (например, инъекцией, приемом внутрь, трансфузией, ингаляцией, имплантацией или трансплантацией). В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе фармацевтические композиции вводят путем инъекции или инфузии. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, можно вводить пациенту трансартериально, подкожно, внутривенно, внутрикочно, внутриопухолево, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно или внутрибрюшинно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, вводят парентерально (например, внутривенно, подкожно, внутрибрюшинно или внутримышечно). В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе фармацевтическую композицию вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе фармацевтическую композицию вводят путем

внутримышечной или подкожной инъекции. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть введены путем инъекции непосредственно в очаг воспаления, очаг локального заболевания, лимфатический узел, орган, опухоль или очаг инфекции у субъекта.

Способы модификации иммунных клеток

Способы могут включать доставку в иммунную клетку (например, моноцит, макрофаг или дендритную клетку) конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих: (a) внеклеточный домен (например, внеклеточный домен, как описано в данном документе), (b) трансмембранный домен (например, трансмембранный домен, как описано в данном документе) и (c) внутриклеточный домен (например, внутриклеточный домен, как описано в данном документе), таким образом, что иммунная клетка будет содержать CAR, содержащий (a)-(c). В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, дополнительно кодирует одну, две или три из: (d) внеклеточного лидерного домена (например, внеклеточного лидерного домена, как описано в данном документе), (e) внеклеточного шарнирного домена (например, внеклеточного шарнирного домена, как описано в данном документе), или (f) внутриклеточного костимулирующего домена (например, внутриклеточного костимулирующего домена, как описано в данном документе).

Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих по меньшей мере один CAR, как описано в данном документе, может быть введена в иммунную клетку (например, моноцит, макрофаг или дендритную клетку) физическими, химическими или биологическими способами. Физические способы введения конструкции нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе, в иммунную клетку (например, моноцит, макрофаг или дендритную клетку) могут включать электропорацию, преципитацию фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию или их комбинацию. Конструкция нуклеиновой кислоты может быть введена в иммунные клетки с использованием коммерчески доступных способов, включая электропорацию (Amaxa Nucleofector-II® (Amaxa Biosystems, Кельн, Германия), ECM 830 BTX (Harvard Instruments, Бостон, Массачусетс) Gene Pulser II® (BioRad, Денвер, штат Колорадо) или Multiporator® (Eppendorf, Гамбург, Германия)). Конструкция нуклеиновой кислоты также может быть введена в иммунные клетки с использованием трансфекции мРНК, например, трансфекции,

опосредованной катионными липосомами, липофекции, полимерной инкапсуляции, трансфекции, опосредованной пептидами, или систем доставки биологических частиц, таких как «генные пушки» (см., например, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001), которая полностью включена в данный документ посредством ссылки).

Биологические способы введения конструкции нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе, в иммунную клетку (например, моноцит, макрофаг или дендритную клетку) включают использование ДНК- и РНК-векторов. Вирусные векторы, и особенно ретровирусные векторы, стали широко использоваться для встраивания генов в клетки млекопитающих (например, клетки человека). Вирусные векторы также могут быть получены из лентивирусов, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов (например, Adf535) или аденоассоциированных вирусов (см., например, патенты США №№ 5350674 и 5585362, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки). Ретровирусные векторы, такие как лентивирусы, являются подходящими инструментами для достижения долгосрочного переноса генов, которые обеспечивают долгосрочную стабильную интеграцию трансгена и его размножение в дочерних клетках.

Химические средства введения конструкции нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, в иммунную клетку (например, моноцит, макрофаг или дендритную клетку) включают системы коллоидной дисперсии, комплексы макромолекул, нанокапсулы, микросферы, частицы и системы на основе липидов (например, масляные эмульсии в воде, мицеллы, смешанные мицеллы, наночастицы, липосомы и комплексы липофетамин-нуклеиновая кислота).

Иллюстративная система для доставки конструкции нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе, представляет собой систему на основе липидов. Конструкция нуклеиновой кислоты, описанная в данном документе, может быть инкапсулирована в водную внутреннюю часть липосомы, вкраплена в липидный бислой, присоединена к липосоме через связывающую молекулу, заключена в липосому, связана в комплекс с липосомой, диспергирована в растворе или суспензии, которые содержат липид, смешанный с липидом, связана в комплекс с мицеллой или иным образом связана с липидом. Липиды для применения в описанных в данном документе способах могут быть природными или синтетическими липидами. Липиды также могут быть получены из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидилхолин может быть получен от Sigma (Сент-Луис, штат Миссури); дицетилфосфат может быть получен от K&K Laboratories (Плейнвью, штат Нью-Йорк); холестерин может быть получен от Calbiochem-Behring; и димиристилфосфатидилглицерин можно получить от Avanti Polar Lipids, Inc.

(Бирмингем, Алабама). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить при температуре около -20 °C.

Для подтверждения присутствия конструкции нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе, в иммунной клетке (например, моноците, макрофаге или дендритной клетке) можно проводить различные анализы. Например, такие анализы включают молекулярно-биологические анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как саузерн- и нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; и биохимические анализы, такие как выявление присутствия или отсутствия конкретного пептида, например, с помощью иммунологических способов (ELISA и вестерн-блоттинг).

Опосредованная VPX вирусная доставка нуклеиновых кислот, кодирующих CAR

Описанные в данном документе иммунные клетки (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки) могут быть невосприимчивы к лентивирусной трансдукции из-за экспрессии фактора рестрикции SAMHD1, который истощает нуклеотидные трифосфаты, необходимые для обратной транскрипции. Например, SAMHD1 может ограничивать репликацию вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) путем истощения внутриклеточного пула дезоксинуклеозидтрифосфатов. Вирусный белок X (Vpx), вспомогательный белок, связанный с вирусом иммунодефицита обезьян (SIV) и ВИЧ-2, индуцирует деградацию SAMHD1. Применение Vpx может позволить использовать вирусные векторы, такие как лентивирус, содержащие одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих по меньшей мере один CAR для иммунных клеток, описанных в данном документе, (например, макрофагов, моноцитов или дендритных клеток). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор, содержащий одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих по меньшей мере один CAR и упакованный по меньшей мере одним белком Vpx, может повышать трансфекцию иммунных клеток, описанных в данном документе, (например, макрофагов, моноцитов или дендритных клеток), например, по сравнению с иммунными клетками того же типа, трансфицированными вирусным вектором, содержащим одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих по меньшей мере один CAR и не упакованных по меньшей мере одним белком Vpx. В некоторых вариантах осуществления Vpx-лентивирус может приводить к геномной интеграции последовательности CAR, обеспечивая долговременную постоянную экспрессию химерного антигенного рецептора (CAR). Учитывая, что CAR представляют собой трансмембранные белки, которые регулярно рециркулируют во внутриклеточное пространство, демонстрация постоянной

экспрессии CAR на клеточной поверхности с Vpx-лентивирусом является заметным достижением в этой области. Открытие того, что макрофаги, трансдуцированные Vpx-лентивирусом, фенотипически не подвержены влиянию вирусной трансдукции позволяет получать CAR макрофаги с фенотипической пластичностью. В то время как другие вирусные векторы (такие как Ad5f35) индуцируют провоспалительный фенотип M1, Vpx-лентивирус не влияет на фенотип M1/M2, что позволяет получить продукт в виде M0 CAR-макрофагов, который может не иметь провоспалительных функций/токсичности в исходном состоянии. CAR-макрофаги, трансдуцированные Vpx-лентивирусом, сохраняют фенотипическую пластичность и могут быть дополнительно поляризованы до фенотипа M1 или M2 с помощью цитокинов, агонистов, пептидов, культуральных сред и других факторов. CAR-макрофаги, трансдуцированные Vpx-лентивирусом, могут подвергаться воздействию провоспалительных сигналов (например, одного или более провоспалительных цитокинов, например, одного или более из LPS, IFN α , IFN β , IFN γ , CpG, CD40L, GM-CSF, TNF α , IL-6 или лиганда STING (STING-L)) и поляризуются в M1 макрофаги. CAR-макрофаги, трансдуцированные Vpx-лентивирусом, могут подвергаться воздействию иммуносупрессивных сигналов (например, одного или более иммуносупрессивных цитокинов (например, одного или более из IL-4, IL-10, IL-13 или TGF β) и/или одного или обоих из по меньшей мере одного простагландина или по меньшей мере кортикостероида) и поляризоваться в M2 макрофаги.

В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор упакован с белком Vpx (например, как описано в международной публикации № WO 2017/044487, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления Vpx включает белок, ассоциированный с вирионом, (например, вспомогательный белок для репликации вируса). В некоторых вариантах осуществления белок Vpx кодируется вирусом иммунодефицита человека типа 2 (ВИЧ-2). В некоторых вариантах осуществления белок Vpx кодируется вирусом иммунодефицита обезьян (SIV). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка, как описано в данном документе (например, моноцит, макрофаг или дендритная клетка), трансфицируется лентивирусным вектором, упакованным с белком Vpx. В некоторых вариантах осуществления Vpx ингибирует по меньшей мере один противовирусный фактор иммунной клетки, как описано в данном документе, (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки).

В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор, упакованный с белком Vpx, проявляет повышенную эффективность трансфекции иммунной клетки, как описано в данном документе (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки), например, по

сравнению с лентивирусным вектором, не упакованным с белком Vprх. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка, как описано в данном документе (например, моноцит, макрофаг или дендритная клетка), подвергается электропорации или трансфекции по меньшей мере одной мРНК VPX перед трансфекцией вирусным вектором (например, аденовирусным вектором, например, вектором Ad2 или вектором Ad5 (например, аденовирусным вектором Ad5f35, например, хелпер-зависимым аденовирусным вектором Ad5F35)).

Обработка и культивирование иммунных клеток во время модификации

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают одну или более стадий обработки иммунной клетки (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки) в процессе модификации иммунной клетки.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают стадию обработки иммунной клетки (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки) модулятором пути, активируемого транскрибируемой *in vitro* мРНК. Транскрибируемая *in vitro* (IVT) мРНК распознается различными эндосомальными рецепторами врожденного иммунитета (Toll-подобным рецептором 3 (TLR3), TLR7 и TLR8) и цитоплазматическими рецепторами врожденного иммунитета (протеинкиназы, активируемая РНК (PKR), белка гена I, индуцируемого ретиноевой кислотой, (RIG-I), ассоциированного с дифференцировкой меланомы белка 5 (MDA5) и 2'-5'-олигоаденилатсинтазы (OAS)). Сигналинг через эти различные пути приводит к воспалению, связанному с интерфероном 1 типа (IFN), фактором некроза опухоли (TNF), интерлейкином-6 (IL-6), IL-12 и активацией каскадов программ транскрипции. В целом, они создают провоспалительную среду, способную вызывать специфические иммунные ответы. Более того, последующие эффекты, такие как замедление трансляции за счет фосфорилирования эукариотического фактора инициации трансляции 2α (eIF2α), усиленная деградация РНК рибонуклеазой L (РНКаза L), а также сверхэкспрессия и ингибирование репликации самоамплифицирующейся мРНК, имеют отношение к фармакокинетике и фармакодинамике мРНК IVT.

В некоторых вариантах осуществления модулятор пути, активируемого транскрибируемой *in vitro* мРНК, включает ингибитор РНКаза. В некоторых вариантах осуществления модулятор пути, активируемого транскрибируемой *in vitro* мРНК, включает ингибитор РНКаза L, РНКаза T2 или РНКаза 1. В некоторых вариантах осуществления модулятор

пути, активируемого транскрибируемой *in vitro* мРНК, включает ингибитор РНКазы L. В некоторых вариантах осуществления ингибитор РНКазы L включает сунитиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор РНКазы L включает ABCE1.

В некоторых вариантах осуществления обработка иммунной клетки (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки) ингибитором РНКазы L повышает стабильность мРНК в модифицированной иммунной клетке по сравнению со стабильностью мРНК в модифицированной иммунной клетке того же типа, которая не подвергалась обработке ингибитором РНКазы L. В некоторых вариантах осуществления обработка иммунной клетки (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки) ингибитором РНКазы L увеличивает экспрессию CAR в модифицированной иммунной клетке по сравнению с экспрессией CAR в модифицированной иммунной клетке того же типа, которая не подвергалась обработке ингибитором РНКазы L. В некоторых вариантах осуществления обработка иммунной клетки (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки) ингибитором РНКазы L повышает эффекторную активность в модифицированной иммунной клетке по сравнению с эффекторной активностью в модифицированной иммунной клетке того же типа, которая не подвергалась обработке ингибитором РНКазы L.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадия обработки иммунной клетки (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки) предшествует стадии доставки мРНК в иммунную клетку.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают стадию культивирования иммунной клетки (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки) с цитокином или иммуностимулирующим рекомбинантным белком. В некоторых вариантах осуществления цитокин включает IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF α , IL-6, STNGL, LPS, агонист CD40, лиганд 4-1BB, рекомбинантный 4-1BB, агонист CD19, агонист TLR (например, TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8 или TLR-9), TGF- β (например, TGF- β 1, TGF- β 2 или TGF- β 3), глюкокортикоид, иммунный комплекс, интерлейкин-1 альфа (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-20, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), онкостатин M (OSM), TNF- β , CD154, лимфотоксин-бета (LT- β), индуцирующий пролиферацию лиганд A (APRIL), CD70, CD153, глюкокортикоид-индуцированный лиганд рецептора TNF (GITRL), член 14 надсемейства фактора некроза опухоли (TNFSF14), OX40L (CD252), TALL-1 (член 13B суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли - TNFSF13B), связанный с TNF лиганд, индуцирующий

апоптоз, (TRAIL), связанный с TNF слабый индуктор апоптоза (TWEAK), связанный с TNF индуцируемый активацией цитокин (TRANCE), эритропоэтин (Epo), предшественник тиреоидной пероксидазы (Tpo), связанный с FMS лиганд тирозинкиназы 3, (FLT-3L), фактор стволовых клеток (SCF), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), мерозоитный поверхностный белок (MSP), лиганд белка, содержащего нуклеотид-связывающий домен олигомеризации, (NOD) (например, агонисты NOD1, NOD2 или NOD1/2), лиганд RIG-I-подобного рецептора (RLR) (например, 5'ppp-dsRNA, 3p-hpRNA, поли(I:C) или поли(dA:dT)), лиганд лектинового рецептора C-типа (CLR) (например, курдлан, β -глюкан, НККА, ламинарин, пустулан, склероглюкан, диспергируемый WGP, растворимый WGP, зимозан, обедненный зимозан, фурфурман, b-GlcCer, GlcC14C18, НКМТ, TDB, TDB-HS15 или TDM), циклический динуклеотидный сенсорный лиганд (например, агонист C-Gas или лиганд стимулятора генов интерферона (STING)), индуктор воспаления (например, квасцы, АТФ, кристаллы CPPD, гемозоин, кристаллы MSU, Nano-SiO₂, нигерицин или TDB), арилуглеводородный (AhR) лиганд (например, FICZ, индирубин, ITE или L-кинуренин) и лиганд альфа-протеинкиназы 1 (ALPK1), лиганд мульти-PRR, активатор NF κ B/NFAT (например, конкавалин А, иономицин, РНА-Р или РМА) или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления цитокин включает IFN- β .

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадия культивирования иммунной клетки (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки) происходит после стадии доставки мРНК в иммунную клетку.

В некоторых вариантах осуществления культивирование модифицированной иммунной клетки (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки) с цитокином или иммуностимулирующим рекомбинантным белком повышает жизнеспособность модифицированной иммунной клетки по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, которую не культивировали с цитокином или иммуностимулирующим рекомбинантным белком. В некоторых вариантах осуществления культивирование модифицированной иммунной клетки (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки) с цитокином или иммуностимулирующим рекомбинантным белком увеличивает экспрессию белка (например, CAR) модифицированной иммунной клетки по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, которую не культивировали с цитокином или иммуностимулирующим рекомбинантным белком. В некоторых вариантах осуществления культивирование модифицированной иммунной клетки (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки) с цитокином или

иммуностимулирующим рекомбинантным белком увеличивает продолжительность экспрессии белка (например, CAR) по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, которую не культивировали с цитокином или иммуностимулирующим рекомбинантным белком. В некоторых вариантах осуществления культивирование модифицированной иммунной клетки (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки) с цитокином или иммуностимулирующим рекомбинантным белком повышает эффекторную активность модифицированной иммунной клетки по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, которую не культивировали с цитокином или иммуностимулирующим рекомбинантным белком. В некоторых вариантах осуществления культивирование модифицированной иммунной клетки (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки) с цитокином или иммуностимулирующим рекомбинантным белком увеличивает M1 поляризацию модифицированной иммунной клетки по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, которую не культивировали с цитокином или иммуностимулирующим рекомбинантным белком.

Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, включая номера доступа GenBank, в полном объеме включены посредством ссылки. Кроме того, материалы, способы и примеры являются иллюстративными и не носят ограничительного характера. Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое, как правило, подразумевается средним специалистом в данной области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя при практической реализации или тестировании настоящего изобретения можно использовать способы и материалы, сходные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, в данном документе описаны подходящие способы и материалы.

Изобретение дополнительно проиллюстрировано в следующих примерах. Пример приведен только в иллюстративных целях. Его никоим образом не следует рассматривать как ограничивающий объем или содержание данного изобретения.

ПРИМЕРЫ

Следующие ниже примеры предложены для того, чтобы описать квалифицированному специалисту, как приготовить и использовать способы и композиции, описанные в данном документе, и не предназначены для ограничения объема данного изобретения.

Пример 1: Макрофаги и моноциты с химерным антигенным рецептором (CAR)

Трансген CAR может быть введен в моноциты или макрофаги посредством электропорации или трансфекции ДНК, мРНК или химически модифицированной мРНК или посредством вирусной трансдукции с помощью лентивирусного, аденовирусного или альтернативного вирусного вектора. Экспрессия CAR будет подтверждена с использованием антигенспецифического окрашивания с помощью проточной цитометрии, ПЦР в реальном времени или флуоресцентной микроскопии. Эти методы также будут использоваться для определения интенсивности и кинетики экспрессии CAR.

Конструкции CAR, которые экспрессируются на поверхности макрофага, будут тестировать на активность в анализе фагоцитоза опухоли и/или анализе уничтожения опухоли в отношении мишень-положительной линии клеток. Конструкции, которые вызывают фагоцитоз и/или уничтожение клеток-мишеней, будут тестировать на секрецию цитокинов, секрецию хемокинов, способность рекрутирования иммунных клеток, фенотипическое изменение (т.е. самополяризацию в M1/M2), и функциональность стимуляции Т-клеток/презентации антигена.

В таблице 1 показаны иллюстративные последовательности мРНК и полипептидов, используемые для компонентов CAR, описанных в данном документе. Иллюстративные конструкции CAR из компонентов CAR показаны на Фиг. 8-117 и 135.

Таблица 1. Последовательности мРНК и полипептидов (номера доступов GenBank и коды UniProt KB, соответственно) для компонентов CAR, описанных в данном документе.

Название гена	Номер в GenBank (транскрипционный вариант 1)	Код UniProt KB
CD8a	NM_001768.7	P01732
CD3z	NM_198053.3	P20963
FCER1G	NM_004106.2	P30273
IgG4	AJ294733.1	P01861
CD64	NM_001378804.1	P12314

CD32a	NM_001136219.3	P12318
CD32c	NM_201563.5	P31995
CD16	NM_000569.8	P08637
TLR1	NM_003263.4	Q15399
TLR2	NM_001318787.2	O60603
TLR6	NM_006068.4	Q9Y2C9
TLR4	NM_138554.5	O00206
TLR5	NM_003268.6	O60602
SIRPa	NM_001040022.1	P78324
Siglec 10	NM_033130.5	Q96LC7
Siglec 9	NM_001198558.1	Q9Y336
Siglec 11	NM_052884.3	Q96RL6
4-1BBL	NM_003811.4	P41273
CD27	NM_001242.5	P26842
CD28	NM_006139.4	P10747
CD36	NM_001001548.2	P16671
CD80	NM_005191.4	P33681
CD86	NM_175862.5	P42081
CD209	NM_021155.4	Q9NNX6
DAP10	NM_014266.4	Q9UBK5
DAP12	NM_003332.4	O43914
GITR	NM_004195.3	Q9Y5U5
ICOS	NM_012092.4	Q9Y6W8
ICOSL	NM_015259.6	O75144

OX40	NM_003327.4	P43489
OX40L	NM_003326.5	P23510
PDL1	NM_014143.4	Q9NZQ7
PD1	NM_005018.3	Q15116
TLR2	NM_001318787.2	O60603
TLR4	NM_138554.5	O00206
TLR8	NM_138636.5	Q9NR97
CD40	NM_001250.6	P25942
Myd88	NM_001172567.2	Q99836
IFNaR1	NM_000629.3	P17181
GMCSFR	NM_006140.6	P15509
TREM1	NM_018643.5	Q9NP99
TREM2	NM_018965.4	Q9NZC2
SHP1	NM_002831.6	P29350
SHP2	NM_002834.5	Q06124
SHIP1	NM_001017915.3	Q92835
Lyn	NM_002350.4	P07948
INPP5E	NM_019892.6	Q9NRR6

Пример 2: Вирусная трансдукция первичных макрофагов и моноцитов человека

Для продукции лентивируса клетки НЕК293Т высевали в количестве $3,5 \times 10^6$ клеток/10 см чашку в 10 мл среды DMEM с добавлением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. После выращивания в течение ночи клетки в планшетах трансфицировали pVSV-G (2,5 мкг), RSV-Rev (2,5 мкг), PMDL-Chp6 (10 мкг), pVPX (1 мкг) и лентивирусной плазмидой для переноса, содержащей желаемую последовательность вставки (14 мкг), используя трансфекцию фосфатом кальция. Супернатант удаляли через 16 часов после трансфекции с последующим добавлением 6 мл DMEM. Супернатант собирали через 48 часов после

трансфекции с последующим центрифугированием при $1200\times g$ в течение 5 минут и фильтрованием через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Вирус хранили при температуре -80°C для последующего использования.

Для лентивирусной трансдукции первичных макрофагов человека первичные макрофаги человека высевали при заданной плотности и инкубировали в течение 2 часов при 37°C . Затем к культуре макрофагов добавляли лентивирус при заданной множественности заражения (MOI). Через 48-72 часа среду заменяли и трансдуцированные макрофаги использовали для различных анализов.

Пример 3: Экспрессия рецептора в моноцитах и макрофагах

Макрофаги, полученные из CD14⁺ моноцитов, высевали на культуральную среду (10-20% FBS-TEX-MACS с 10 нг/мл GM-CSF) и культивировали в течение ночи. 120 нМ мРНК CAR трансфицировали и инкубировали при 37°C в культуральной среде в течение одного дня, а экспрессию CAR определяли по связыванию гHER2 с помощью проточной цитометрии. Около 60-70% клеток, трансфицированных CAR и химерным FcR (CFR), и 40-60% клеток, трансфицированных Toll-подобным антигенным рецептором (TAR), были жизнеспособными (**Фиг. 1A**). Экспрессия CAR:HER2 была положительной в 40-60% клеток, трансфицированных CAR, и положительной в 30-40% клеток, трансфицированных CFR и TAR (**Фиг. 1B**). Экспрессию CAR1 и CAR13 выделяли среди других конструкций в первичных макрофагах человека.

CD14⁺ моноциты, очищенные с помощью частиц MACS, выдерживали в культуральной среде в течение ночи. Трансфицировали 40 нМ мРНК CAR и клетки инкубировали при 37°C в течение трех дней, и экспрессию CAR определяли по связыванию гHER2 с помощью проточной цитометрии. Ad5f35 использовали в качестве положительного контроля. Около 50-80% клеток, трансфицированных CAR и TAR, и 40-60% клеток, трансфицированных CFR, были жизнеспособными (**Фиг. 2A**). Экспрессия CAR:HER2 была положительной в 15-30% моноцитов, трансфицированных CAR, CFR и TAR (**Фиг. 2B**). Эти результаты демонстрируют, что мРНК CAR, CFR и TAR могут экспрессироваться в первичных моноцитах человека; однако интенсивность экспрессии намного ниже, чем в макрофагах.

Пример 4. Экспрессия рецепторов и уничтожение опухолевых клеток CAR макрофагами

Для получения макрофагов, экспрессирующих рецептор, первичные макрофаги человека суспендировали в буфере EP, содержащем 50-500 нМ мРНК (или максимально возможную концентрацию на основе исходного раствора мРНК) при концентрации от $1,0 \times 10^5$ до $1,0 \times 10^9$ клеток/мл, и подвергали электропорации. Клетки удаляли из кассеты, высевали на среду TechMACS, содержащую 20% FBS, и инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. СИФ и процент экспрессии CAR, CFR и TAR определяли через 24 часа после связывания rHER2 с помощью проточной цитометрии. Процент живых клеток определяли с помощью Live/Dead Aqua. Для уничтожения макрофаги совместно культивировали с опухолевыми клетками Her2+ CRL2351-NucGFP в соотношении 2:1 Е:Т и контролировали с помощью Incucyte® в течение 72 часов. Гибель опухолевых клеток рассчитывали по интегрированной интенсивности GFP на лунку относительно времени 0.

Экспрессия и процентное содержание CAR⁺ различались для разных конструкций CAR (Фиг. 3А и В, а также 119 и 120). Электропорация мРНК, по-видимому, не влияла на процент живых клеток (Фиг. 3С и 118). По-видимому, никакие конструкции CFR или TAR не оказывали влияния на уничтожение опухолевых клеток. Конструкции CAR001 (CAR, содержащий лидер CD8, scFv к HER2, шарнир CD8, ТМ CD8 и IC CD3z), CAR003 (CAR, содержащий лидерный домен CD8, scFv к HER2, шарнир CD8 и ТМ CD8), CAR007 (CAR, содержащий лидерный домен CD8, scFv 4D5, шарнир IgG4, ТМ CD8 и IC CD3z), CAR013 (CAR, содержащий лидерный домен CD8, scFv к HER2, шарнир CD8, CD64 ТМ и ICD CD64), CAR017 (CAR, содержащий лидерный домен CD8, scFv к HER2, шарнир CD8, ТМ CD64, ICD CD64, P2A и FCER1G) и CAR039 (CAR, содержащий лидерный домен CD8, scFv к HER2, шарнир CD8, ТМ TLR4 и ICD TLR4) экспрессировались в первичных макрофагах человека и демонстрировали функцию уничтожения (Фиг. 3D).

Экспрессия и процентное содержание CFR и TAR⁺ варьировали в зависимости от конструкции (Фиг. 4А и В). Электропорация мРНК, по-видимому, не влияла на процент живых клеток (Фиг. 4С).

Пример 5: Оценка экспрессии CAR

Продолжительность экспрессии CAR можно оценить с помощью проточной цитометрии. CAR макрофаги можно высевать в лунки 96-луночного планшета. Для измерения экспрессии CAR к Her2 рекомбинантный белок Her2, меченный His, вместе с буфером, таким как PBS, дополненный BSA, добавляют к клеткам и оставляют инкубироваться на 15 минут. Затем клетки центрифугируют при 300×g в течение 5 минут и удаляют супернатант.

Затем Fc-рецепторы блокируют, используя Fc-блокирующий раствор, такой как Human TruStain FcX (BioLegend, кат. 422302), в течение пяти минут в PBS. После блокирования Fc можно проводить окрашивание для определения жизнеспособности клеток и других поверхностных маркеров. Например, жизнеспособность клеток можно определить с помощью набора LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, кат. L34957). Кроме того, добавляют антитела к His, такие как конъюгированное с APC антитело к His-метке (R&D Systems, кат. IC050A). Экспрессию CAR определяют с помощью проточной цитометрии, сначала гейтируя популяцию отдельных клеток, затем отбирая живые клетки и, наконец, измеряя флуоресценцию APC клеток. Клетки, экспрессирующие CAR, будут более яркими в канале APC, чем контрольные клетки, которые не подвергались воздействию антитела к His. Яркость CAR-положительных клеток определяет степень экспрессии, а повторные измерения с течением времени позволяют отслеживать экспрессию CAR с течением времени.

Для определения иммунофлуоресценции клетки можно культивировать на предметном стекле. Затем среду удаляют и клетки трижды промывают PBS. Затем клетки можно зафиксировать с помощью 4% параформальдегида или метанола. Точное время инкубации в фиксаторе будет зависеть от его идентичности. По прошествии необходимого количества времени фиксатор удаляют и клетки снова трижды промывают PBS. Если желательно внутриклеточное окрашивание, клетки теперь инкубируют в 1% Triton X-100 (ThermoFisher, кат. BP151-100) в PBS, а затем трижды промывают в PBS. Теперь к клеткам добавляют блокирующий раствор, такой как BSA в PBS, и дают возможность блокироваться в течение 60 минут. Затем блокирующий раствор удаляют и клетки промывают. Антитела, конъюгированные с флуорохромом, разводят в соответствии с инструкциями производителя и оставляют связываться с клетками в течение ночи. Затем раствор антител удаляют, а клетки промывают. Наконец, на клетки наносят монтирующий раствор, такой как ProLong™ Diamond Antifade Mountant с DAPI (Invitrogen, кат. P36966), и сверху помещают покровное стекло. Перед визуализацией ему дают высохнуть в течение 24 часов. Визуализация осуществляется с помощью флуоресцентной микроскопии. Клетки, экспрессирующие CAR, будут ярче, чем клетки, не экспрессирующие CAR, в соответствующем канале для флуорофора.

Для ОТ-ПЦР можно лизировать макрофаги и собирать РНК с помощью набора для одностадийной ОТ-ПЦР (SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit, Invitrogen, кат. 11732-020), следуя инструкциям производителя. В анализе будут использоваться праймеры, специфичные для CAR. Для макрофагов с мРНК для CAR будет обнаруживаться сигнал в

анализе ОТ-ПЦР, тогда как нетрансдуцированные макрофаги не будет обнаруживаться сигнал.

Пример 6: Оценка функциональности CAR

Для анализа фагоцитоза клеток методом проточной цитометрии мишень-положительные и мишень-отрицательные опухолевые клетки метили с помощью набора для пролиферации клеток CellTrace™ CFSE (Invitrogen, кат. C34554) в соответствии с инструкциями производителя, или клетки конструировали для экспрессии флуоресцентного белка, такого как GFP. CAR-экспрессирующие и контрольные макрофаги затем высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном при соотношении макрофаги:опухолевые клетки 1:1 и культивировали в течение 4 часов. По окончании инкубации клетки удаляли из лунок и окрашивали для проточной цитометрии. Панель включает краситель для оценки жизнеспособности и специфический для макрофагов маркер, такой как CD11b. При гейтировании живых клеток клетки, которые являются дважды положительными по CD11b/CFSE, представляют собой макрофаги, предположительно фагоцитировавшие клетку. CAR макрофаги должны иметь повышенный процент дважды положительных клеток при культивировании с мишень-положительными опухолевыми клетками по сравнению с макрофагами без CAR. Кроме того, специфичность фагоцитоза проявляется отсутствием значительного изменения интенсивности фагоцитоза при культивировании макрофагов с мишень-отрицательными клетками.

Для анализа фагоцитоза методом проточной цитометрии с использованием частиц полистирольные частицы могут быть функционализированы с мишенью CAR или нерелевантным белком. Кроме того, эти частицы помечены красителем pHrodo™ Red, SE (Invitrogen, кат. P36600), который представляет собой pH-реактивный краситель. При подкислении краситель увеличивает уровень флуоресценции. Затем частицы культивируют с CAR-макрофагами и нетрансдуцированными макрофагами. Через некоторое время макрофаги могут быть удалены и окрашены для проточной цитометрии с использованием красителя жизнеспособности и специфического для макрофагов маркера, такого как CD11b. При гейтировании живых клеток клетки, которые являются дважды положительными по CD11b/pHrodo, представляют собой макрофаги, предположительно фагоцитировавшие частицу. CAR макрофаги должны иметь повышенный процент дважды положительных клеток при культивировании с мишень-положительными частицами по сравнению с макрофагами без CAR. Кроме того, специфичность фагоцитоза проявляется отсутствием

значительного изменения интенсивности фагоцитоза при культивировании макрофагов с мишень-отрицательными частицами.

Для анализа клеток Incucyte® мишень-положительные опухолевые клетки, экспрессирующие флуоресцентный белок, такой как GFP, культивируют с CAR-макрофагами и нетрансдуцированными макрофагами в 96-луночном планшете. Соотношение между эффекторными макрофагами и опухолевыми клетками-мишенями варьировало от 10:1 E:T до 1:10 E:T, наряду с контролем только с клетками-мишенями 0:1 E:T. Количество макрофагов поддерживается постоянным и составляет 10×10^3 макрофагов на лунку. Изменение флуоресценции с течением времени, измеряемое каждые четыре часа, может быть измерено для определения степени уничтожения опухолевых клеток в культуре. Кроме того, методы анализа изображений можно использовать для определения местоположения макрофагов в культуре и определения количества макрофагов, которые также фагоцитировали опухолевые клетки. CAR-макрофаги должны демонстрировать повышенную колокализацию макрофагов и опухолевых клеток, наряду с повышенным уничтожением, по сравнению с нетрансдуцированными макрофагами или только опухолевыми клетками.

Для анализа частиц Incucyte® функционализированные pHrodo частицы, несущие белок-мишень для CAR, добавляли как к CAR-макрофагам, так и к нетрансдуцированным макрофагам в лунки 96-луночного планшета. Макрофаги высевали в концентрации 20×10^3 мкл на лунку и добавляли шарики в соотношении 5:1 частиц к макрофагам. Флуоресценцию pHrodo измеряли в течение пяти часов с измерениями каждые 30 минут. Соотношение увеличения флуоресценции между начальным моментом времени и моментом времени 1 час используется для определения интенсивности происходящего фагоцитоза. Ожидается, что CAR макрофаги будут иметь более высокое изменение флуоресценции, чем нетрансдуцированные контроли.

В отношении процессинга и презентации антигена после фагоцитоза можно проанализировать экспансию Т-клеток, высвобождение IL2, высвобождение IFN γ , высвобождение TNF α и/или активацию CD69. Можно получить и культивировать клоны Т-клеток, которые реагируют на определенный антиген (например, овальбумин). Часто эти клоны представляют собой мышинные клетки. CAR-макрофаги мышей, которые были соответствовали по МНС с Т-клетками, культивируют с раковыми клетками, экспрессирующими как целевой для CAR рецептор, так и известный антиген. Затем макрофаги можно выделить и культивировать совместно с Т-клетками. После презентации антигена макрофагами Т-клетки будут выделять IL2 (что можно измерить с помощью

методов измерения цитокинов) и пролиферировать (что можно измерить с помощью подсчета количества клеток или разведения CFSE). Кроме того, активированные Т-клетки можно проверить на цитотоксическую функцию путем совместного культивирования Т-клеток с линией клеток, экспрессирующей антиген. Ожидается, что CAR-макрофаги будут вызывать большую пролиферацию и повышенную продукцию цитокинов в Т-клетках по сравнению с контрольными нетрансдуцированными макрофагами.

Также можно оценить уничтожение опухоли другими способами, помимо фагоцитоза. В кондиционированной среде CAR-макрофаги и клетки-мишени можно совместно культивировать в течение определенного периода времени (например, 24 часа), чтобы макрофаги могли распознать клетки-мишени и отреагировать на них. Соотношение между количеством опухолевых клеток можно варьировать в зависимости от уровня экспрессии целевого белка на опухолевых клетках. По истечении необходимого времени супернатант удаляют из CAR-макрофагов, а все оставшиеся в супернатанте клетки удаляют путем фильтрации через фильтр с размером пор 0,22 мкм или путем центрифугирования. Отфильтрованный супернатант затем помещают на другие раковые клетки, которые не культивировали с CAR-макрофагами. Полученное в результате изменение жизнеспособности и пролиферации опухолевых клеток можно измерить с помощью подсчета клеток, проточной цитометрии, анализа MTT/XTT или микроскопии. CAR макрофаги должны вызывать либо гибель опухолевых клеток, культивируемых с супернатантом, либо снижение скорости роста по сравнению с супернатантом нетрансдуцированных макрофагов, культивируемых с той же мишень-положительной линией клеток.

Для совместного культивирования мишень+/мишень-/CAR macs, CAR-макрофагов, мишень-положительные клетки и мишень-отрицательные клетки культивируют совместно. Должен быть какой-то способ различать мишень-положительные и мишень-отрицательные клетки, например, экспрессия различных флуоресцентных белков. Со временем можно определить относительное количество различных типов клеток либо с помощью микроскопии, либо с помощью проточной цитометрии. Сравнение роста мишень-отрицательных клеток с CAR-макрофагами с мишень-положительными клетками и без них дает некоторое представление об уничтожении опухолевых клеток без использования фагоцитоза. Можно было бы ожидать, что CAR-макрофаги будут демонстрировать либо повышенную гибель, либо снижение скорости роста мишень-отрицательной линии клеток по сравнению с нетрансдуцированными макрофагами. Кроме того, ожидается, что разница

между мишень-отрицательными клетками, культивируемыми с CAR-макрофагами, также будет зависеть от присутствия мишень-положительных клеток.

Для получения благоприятных цитокинов с помощью проточной цитометрии CAR-макрофаги можно культивировать совместно либо с мишень-положительными клетками, либо с мишень-положительными частицами вместе с мишень-отрицательным контролем. По прошествии определенного времени супернатант культуры можно собрать, а случайные клетки удалить путем фильтрации или центрифугирования. Желаемые цитокины можно измерить с помощью анализа на основе частиц с цитокинами методом проточной цитометрии, который измеряет концентрацию различных цитокинов в супернатанте. Частицы окрашивают в соответствии с инструкциями производителя. Одним из примеров такой системы является система BioLegend LEGENDplex. Кроме того, CAR-макрофаги из культуральной системы можно собирать и окрашивать для продукции цитокинов с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинов с использованием проточной цитометрии. Клетки можно фиксировать, пермеабилизировать и окрашивать в соответствии с инструкциями производителя, например, для набора для фиксации/пермеабилизации (BD, кат. 554714). CAR-макрофаги, культивируемые с мишень-положительными клетками или частицами, должны демонстрировать более высокие уровни провоспалительных цитокинов по сравнению с нетрансдуцированными макрофагами или CAR-макрофагами, не стимулированными целевым белком.

Для анализа ELISA/MSD CAR-макрофаги можно культивировать совместно либо с мишень-положительными клетками, либо с мишень-положительными частицами вместе с мишень-отрицательным контролем. По прошествии определенного времени супернатант культуры можно собрать, а случайные клетки удалить путем фильтрации или центрифугирования. Одним из примеров может быть соотношение макрофагов к мишени 8:1 в течение 24 часов. После периода культивирования супернатант удаляют, и количество цитокина, присутствующего в растворе, можно измерить с помощью набора цитокинов для ELISA (например, набора IL-1 beta Human Instant ELISA™ Kit, Invitrogen, кат. BMS224INST), следуя указаниям производителя. Кроме того, цитокины можно измерить с помощью системы MesoScaleDiscovery QuickPlex, следуя указаниям производителя. Ожидается, что CAR-макрофаги, культивируемые с мишень-положительными клетками или частицами, должны демонстрировать более высокие уровни провоспалительных цитокинов по сравнению с нетрансдуцированными макрофагами или CAR-макрофагами, не стимулированными целевым белком.

Для получения АФК с помощью проточной цитометрии CAR-макрофаги можно культивировать совместно либо с мишень-положительными клетками, либо с мишень-положительными частицами вместе с мишень-отрицательным контролем. Нетрансдуцированные макрофаги можно культивировать в тех же условиях. Измерение продукции активных форм кислорода (АФК) можно измерить с помощью наборов на основе проточной цитометрии, таких как набор Total Reactive Oxygen Species (ROS) Assay Kit 520 nm (Invitrogen, кат. 88-5930-74). Клетки могут быть подготовлены в соответствии с инструкциями производителя. Ожидается, что CAR-макрофаги, культивируемые с мишень-положительными клетками или частицами, будут демонстрировать более высокие уровни АФК, чем CAR-макрофаги, культивируемые с мишень-отрицательными клетками или частицами, и нетрансдуцированные макрофаги, культивируемые либо с мишень-положительными, либо с мишень-отрицательными клетками или частицами. Дополнительные способы описаны Dikalov & Harrison. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(2):372-382, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Для резистентности к фагоцитарным контрольным точкам CAR макрофаги можно культивировать совместно с мишень-положительными частицами или клетками, которые имеют различные уровни CD47 или других антифагоцитарных лигандов. Частицы могут легко иметь измененные уровни CD47 или других антифагоцитарных лигандов из-за различий в количестве белка, используемого для их функционализации. Для изменения уровней антифагоцитарных лигандов в клетках необходима генная инженерия, например, использование систем кшПНК или CRISPR/Cas9. Интенсивность фагоцитоза можно количественно определить с помощью микроскопии или проточной цитометрии, как указано в разделах выше. Ожидается, что как CAR, так и нетрансдуцированные макрофаги будут демонстрировать меньший фагоцитоз по мере увеличения количества CD47 или других антифагоцитарных лигандов. Макрофаги, сконструированные для экспрессии доминантно-негативных рецепторов (таких как укороченный SIRPa), должны демонстрировать повышенные уровни фагоцитоза по сравнению с макрофагами, лишенными таких доминантно-негативных рецепторов, как для CAR, так и для нетрансдуцированных типов.

Для сравнения с блокадой CD47 действие CD47 можно заблокировать с помощью блокирующих антител, таких как мышинный клон В6Н12. Изменение количества CD47 на поверхности мишень-положительной или мишень-отрицательной клетки позволит обеспечить различные уровни фагоцитоза. Кривая титрования дозы блокирующего

антитела к CD47 может быть определена путем культивирования мишень-положительных и мишень-отрицательных клеток с различными количествами блокирующего антитела. Анализы фагоцитоза с использованием как CAR, так и нетрансдуцированных макрофагов должны показать, что CAR макрофаги менее чувствительны к CD47, демонстрируя более низкий уровень ингибирования при заданном уровне блокады CD47 по сравнению с нетрансдуцированными клетками. Напротив, мишень-отрицательные клетки не будут показывать разницы между CAR-макрофагами и нетрансдуцированными макрофагами.

Для экспрессии хемокиновых рецепторов, способствующих переносу, экспрессия хемокиновых рецепторов может быть измерена путем связывания специфических антител с CAR-макрофагами, которые затем могут быть измерены с помощью проточного цитометра. Ожидается, что CAR-макрофаги будут демонстрировать более высокий уровень и более широкое разнообразие хемокиновых рецепторов по сравнению с нетрансдуцированными макрофагами.

CAR-макрофаги и нетрансдуцированные макрофаги могут быть лизированы, а РНК собрана для РНК-секвенирования. Сравнение экспрессируемых РНК-транскриптов внутри клетки может позволить определить, какие рецепторы экспрессируются в клетке. Ожидается, что CAR-макрофаги будут демонстрировать более высокий уровень и более широкое разнообразие хемокиновых рецепторов по сравнению с нетрансдуцированными макрофагами.

Для вестерн-блоттинга CAR-макрофаги и нетрансдуцированные макрофаги можно культивировать, лизировать и собирать общий белок. Затем этот белок фракционируют по размеру за счет его подвижности через гель в электрическом поле, а затем переносят на мембрану. Мембрану можно окрасить с помощью антител, специфичных к определенному белку, и посредством этого окрашивания можно определить наличие или отсутствие белка. Ожидается, что CAR-макрофаги будут демонстрировать более высокий уровень и более широкое разнообразие хемокиновых рецепторов по сравнению с нетрансдуцированными макрофагами.

Для экспрессии хемокинов для рекрутирования других иммунных клеток CAR-макрофаги можно культивировать совместно либо с мишень-положительными клетками, либо с мишень-положительными частицами вместе с мишень-отрицательным контролем. По прошествии определенного времени супернатант культуры можно собрать, а случайные клетки удалить путем фильтрации или центрифугирования. Желаемые цитокины можно измерить с помощью анализа на основе частиц с цитокинами методом проточной цитометрии, который измеряет концентрацию различных цитокинов в супернатанте.

Частицы окрашивают в соответствии с инструкциями производителя. Одним из примеров такой системы является система BioLegend LEGENDplex. Кроме того, CAR-макрофаги из культуральной системы можно собирать и окрашивать для продукции цитокинов с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинов с использованием проточной цитометрии. Клетки можно фиксировать, пермеабилизировать и окрашивать в соответствии с инструкциями производителя, например, для набора для фиксации/пермеабилизации (BD, кат. 554714). CAR-макрофаги, культивируемые с мишень-положительными клетками или частицами, должны демонстрировать более высокие уровни провоспалительных цитокинов по сравнению с нетрансдуцированными макрофагами или CAR-макрофагами, не стимулированными целевым белком.

Для ELISA/MSD CAR-макрофаги можно культивировать совместно либо с мишень-положительными клетками, либо с мишень-положительными частицами вместе с мишень-отрицательным контролем. По прошествии определенного времени супернатант культуры можно собрать, а случайные клетки удалить путем фильтрации или центрифугирования. Одним из примеров может быть соотношение макрофагов к мишени 8:1 в течение 24 часов. После периода культивирования супернатант удаляют, и количество цитокина, присутствующего в растворе, можно измерить с помощью набора цитокинов для ELISA (например, набора IL-1 beta Human Instant ELISA™ Kit, Invitrogen, кат. BMS224INST), следуя указаниям производителя. Кроме того, цитокины можно измерить с помощью системы MesoScaleDiscovery QuickPlex, следуя указаниям производителя. Ожидается, что CAR-макрофаги, культивируемые с мишень-положительными клетками или частицами, должны демонстрировать более высокие уровни провоспалительных цитокинов по сравнению с нетрансдуцированными макрофагами или CAR-макрофагами, не стимулированными целевым белком.

Для анализа в системе Transwell CAR-макрофаги можно культивировать совместно либо с мишень-положительными клетками, либо с мишень-положительными гранулами вместе с мишень-отрицательным контролем. Кроме того, макрофаги и клетки-мишени можно культивировать отдельно в качестве контроля. После окончания инкубации, например, 48 часов, супернатант может быть собран, а оставшиеся клетки удалены путем фильтрации. Очищенная субпопуляция иммунных клеток, такая как CD3-положительные Т-клетки, может быть помечена CFSE в соответствии с инструкциями производителя. Вставки Transwell (например, проницаемая подложка HTS Transwell®-96 с поликарбонатной мембраной с порами 3,0 мкм, Corning, кат. 3386) могут быть функционализированы белком внеклеточного матрикса, таким как фибронектин или коллаген. С матриксным белком

готовят раствор и наносят на мембраны на 30 минут при 37°C. Оставшийся раствор затем удаляют, а мембрану промывают PBS. Клетки, меченные CFSE, затем ресуспендируют в среде, не содержащей сыворотки, и помещают на верхнюю поверхность вставки. Этим клеткам дают осесть и прилипнуть в течение 20 минут. Затем вставку переносят так, чтобы нижняя сторона мембраны подвергалась воздействию собранного супернатанта. Клеткам дают возможность мигрировать в течение по меньшей мере 2 часов. По истечении периода инкубации вставку извлекают и измеряют флуоресценцию лунок на дне планшета, содержащего супернатант. Ожидается, что CAR-макрофаги будут демонстрировать более высокую степень рекрутирования по сравнению с нетрансдуцированными контролями. Кроме того, ожидается, что CAR-макрофаги, культивируемые с мишень-положительными клетками, лучше рекрутируют меченые иммунные клетки, чем CAR-макрофаги, культивируемые с мишень-отрицательными клетками.

Для пролиферации путем разбавления CFSE макрофаги можно пометить красителем CFSE в соответствии с указаниями производителя. Затем эти меченые макрофаги можно культивировать в течение соответствующего периода времени. Уровень разведения CFSE для клеток можно использовать для определения степени пролиферации макрофагов.

Для анализа МТТ/ХТТ клетки высевают и проводят анализ в соответствии с инструкциями производителя для анализов МТТ (ThermoFisher, кат. V13154) или ХТТ (ThermoFisher, кат. X12223).

Для получения макрофагов из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) можно использовать способы, описанные в Ackermann et al. Nat Commun. 2018;9(1):5088; Zhang et al. Circ Res. 2015;117(1):17-28; Mucci et al. Stem Cell Reports. 2018;11(3):696-710; Shi et al. Curr Protoc Stem Cell Biol. 2019;48(1):e74; and Takata et al. 2017;47(1):183-198.e6; Cao et al. Stem Cell Reports. 2019;12(6):1282-1297, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки. Для подготовки iPSC перед дифференцировкой можно провести трансдукцию лентивирусом.

Пример 7. Праймирование макрофагов

Для создания макрофагов, экспрессирующих Her2-Zeta CAR, первичные макрофаги человека суспендировали в буфере EP (MaxCyte), содержащем 300 нМ мПНК (TriLink) в концентрации 90×10^6 клеток/мл. 100 мкл клеточной смеси добавляли в кассету для электропорации (OC100x2; MaxCyte) и подвергали электропорации с использованием экспериментальных настроек T-cell 1.μ Клетки удаляли из кассеты, высевали в 3 мл среды

TexMACS (Miltenyi Biotech), содержащей 20% FBS (Gibco), на планшеты UpCell (Thermo Scientific) и инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂.

Рекомбинантный лиганд CD40 (Peprotech), лиганд 4-1BB (Enzo Life Sciences) и рецептор 4-1BB (Peprotech) ресуспендировали в воде молекулярной чистоты до исходной концентрации 100 мкг/мл. Затем исходный раствор использовали для создания рабочих растворов в PBS в диапазоне от 2 до 0,002 мкг/мл. 100 мкл рабочего раствора добавляли в лунки 96-луночного планшета и оставляли при комнатной температуре на 4 часа.

Планшеты вынимали из инкубатора и оставляли при комнатной температуре на 30 мин. Клетки отделяли от планшета, подсчитывали с использованием автоматического счетчика клеток NC-200 (Chemomtech) и ресуспендировали в среде TexMACS с 10% FBS. Покрытые белком планшеты дважды промывали PBS с последующим добавлением макрофагов в конечном объеме 100 мкл среды TexMACS с 10% FBS. Планшеты инкубировали в течение 3 часов при 37 °C и 5% CO₂. Через 3 часа в каждую лунку добавляли по 10000 клеток CRL-2351, экспрессирующих ядерный GFP. Конечная концентрация GM-CSF во всех лунках составляла 10 нг/мл. Лизис клеток обнаруживали с помощью анализа Incucyte® (Essen Bioscience). Гибель опухолевых клеток рассчитывали по интегрированной интенсивности GFP на лунку относительно времени 0.

Для обнаружения белков клеточной поверхности макрофаги высевали в лунки, покрытые молекулами агонистов, в конечном объеме среды TexMACS 200 мкл + 10% FBS + 10 нг/мл GM-CSF и инкубировали в течение 3 дней при 37°C и 5% CO₂. Клетки инкубировали в 300 мкл аккутазы (Sigma) в течение 30 мин и переносили в 96-луночный круглодонный планшет для окрашивания. Клетки инкубировали в буфере для FACS, содержащем 20 мкг/мл Her2-His, в течение 20 минут при комнатной температуре, после чего инкубировали в Human TruStain FcX в течение 10 минут при комнатной температуре. Окрашивание поверхностных белков проводили с использованием следующей панели: CD80-FITC, CD86-PE, CD163-APC-Cy7, CD206-BV421, анти-His-APC, Aqua Live/Dead. Детекцию экспрессии поверхностных белков завершали с использованием проточного цитометра Attune NxT (Thermo Fisher).

Обработка CAR-макрофагов с помощью CD40L значительно улучшала способность макрофагов и CAR-макрофагов уничтожать опухоли (**Фиг. 5А**). Праймирование с помощью CD40L также индуцировало фенотип M1 в трансдуцированных мРНК CAR-макрофагах (**Фиг. 5В**). Обработка 4-1BB и 4-1BBL вызывала сходные результаты, хотя и была менее эффективной, чем CD40L (**Фиг. 6А-6В и 7А-7В**). Эти результаты демонстрируют, что

предварительная обработка или праймирование CAR-макрофагов агонистами CD40, такими как CD40L, может привести к повышению эффективности и что комбинированная терапия, включающая CAR-макрофаги с агонистами CD40, может иметь повышенную эффективность.

Пример 8: Поляризация M1 увеличивает персистенцию мРНК и функцию макрофагов/CAR-макрофагов

Макрофаги человека подвергали электропорации мРНК CAR к HER2, содержащей модификации m6AGCap1 и PsU. Клетки культивировали с цитокинами, которые индуцируют фенотип M1, такими как IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма, IFN-гамма плюс липополисахарид (LPS), TNF-альфа, IL-6 или лиганд STING (STING-L), в течение 48 часов, затем цитокины отмывали и добавляли свежую среду. Экспрессию CAR и экспрессию маркера M1 измеряли на 2-й и 7-й дни после трансфекции. HER2+ клетки рака молочной железы с флуоресцентной меткой (CRL2351) совместно культивировали с макрофагами с CAR к HER2 через два дня после трансфекции макрофагов. Рост раковых клеток контролировали по их флуоресценции на микроскопе Incucyte® live imaging каждые четыре часа. Соотношение эффекторов (CAR-макрофагов) к мишеням (раковым клеткам) составляло 5:1.

Как показано на **Фиг. 121A**, тестируемые цитокины в виде интерферонов не приводили к снижению жизнеспособности макрофагов, трансфицированных CAR, на 2-й день. Неожиданно макрофаги, обработанные IFN-β, продемонстрировали более высокую экспрессию CAR, чем макрофаги, обработанные контрольной средой, IFN-α или IFN-γ (**Фиг. 121B**). Как показано на **Фиг. 121C**, обработка макрофагов цитокинами в виде интерферонов не приводила к снижению жизнеспособности макрофагов, трансфицированных CAR, на 7-й день. Неожиданно макрофаги, обработанные IFN-β, продемонстрировали более высокую экспрессию CAR, чем макрофаги, обработанные контрольной средой, IFN-α, или IFN-γ, демонстрируя, что IFN-β улучшает продолжительность экспрессии кодируемых мРНК трансгенов, таких как CAR, в макрофагах человека (**Фиг. 121D**). Кроме того, обработка CAR-макрофагов, трансфицированных мРНК, IFN-α, IFN-β или IFN-γ приводила к индукции фенотипа M1 (на основе экспрессии CD86; **Фиг. 121E**) и снижению маркеров M2 (на основе экспрессии CD163; **Фиг. 121F**). IFN-β приводил к наиболее сильному фенотипу M1 среди оцениваемых интерферонов, и фенотип M1 сохранялся по меньшей мере в течение 7 дней после обработки (**Фиг. 121E**).

Пример 9. Влияние обработки IFN на экспрессию CAR, функцию CAR-макрофагов, маркеры фенотипа M1 и продукцию цитокинов

Были также протестированы пять различных модификаций мРНК, чтобы определить, оказывает ли обработка интерфероном дифференциальное воздействие на макрофаги, трансфицированные мРНК, содержащей различные модификации. Макрофаги человека подвергали электропорации мРНК CAR к HER2, содержащей различные модификации мРНК. Экспрессию CAR и маркеры M1 определяли с помощью проточной цитометрии (Attune) на четвертый день после электропорации. CAR-макрофаги на 4-й день затем совместно культивировали с меченой Nuc-Light HER2+ линией клеток рака молочной железы (CRL2351) при соотношении эффектора (макрофаг CAR) к мишени (раковая клетка) 5:1. Рост раковых клеток контролировали по их флуоресценции на микроскопе Incucyte® Live Imaging каждые четыре часа.

Чтобы дополнительно оценить влияние IFN- β на персистенцию CAR, макрофаги человека, подвергнутые электропорации мРНК m6AGCap1/PsU, кодирующей CAR к HER2, оценивали на 2-й и 7-й день. Обработка IFN- β привела к значительному повышению уровня экспрессии CAR на 7-й день по сравнению с CAR-макрофагами, не обработанными IFN- β (**Фиг. 122**).

Чтобы подтвердить влияние обработки IFN- β на улучшение экспрессии CAR и оптимизировать концентрацию IFN- β , макрофаги, трансфицированные модифицированной мРНК M6AGCap1/PsU, обрабатывали 0, 3, 10, 30 или 100 нг/мл IFN- β в течение 4 часов и оценивали жизнеспособность, процент CAR и СИФ CAR на 4 и 7 день после электропорации. Наблюдали дозозависимый эффект IFN- β на экспрессию CAR-макрофагами человека (**Фиг. 123A**). Как описано в Примере 4, обработка CAR-макрофагов IFN- β индуцировала формирование фенотипа M1, поэтому были проведены дополнительные эксперименты, чтобы определить, зависит ли эффект от дозы. Как показано на **Фиг. 123B**, индукция маркеров M1 CD80, CD86 и HLA-DR зависела от дозы IFN- β .

Учитывая, что фенотип макрофагов считается пластичным, и известно, что иммуносупрессивные цитокины, такие как IL-10, индуцируют формирование фенотипа M2, оценивали влияние обработки IL-10 на обработанные или необработанные IFN- β макрофаги, которые были трансфицированы мРНК CAR к HER2. CAR-макрофаги, обработанные IFN- β , были устойчивы к действию IL-10 и не экспрессировали маркер M2

CD163, но вместо этого сохраняли экспрессию маркера M1 CD86 через 48 часов после обработки (**Фиг. 124А**) и через 7 дней после обработки IL-10 (**Фиг. 124В**). CAR-макрофаги, праймированные IFN- β , также были устойчивы к другим факторам, индуцирующим формирование M2.

Для оценки противоопухолевой функции макрофагов, трансфицированных мРНК, кодирующей CAR к HER2, с или без праймирования IFN- β , нетрансдуцированные (UTD) макрофаги или CAR-макрофаги праймировали 0, 3, 10, 30 или 100 нг/мл IFN- β в течение 4 часов или 20 часов. Затем эти эффекторные клетки культивировали совместно с HER2+ линией клеток рака молочной железы CRL2351-GFP при соотношении эффектора к мишени 3:1 или 1,5:1, и измеряли противоопухолевую активность на основе экспрессии GFP с использованием микроскопа Incucyte® для прямой визуализации. Праймирование IFN- β приводило к повышенной способности CAR-макрофагов уничтожать раковые клетки (**Фиг. 125А**). Чтобы оценить, улучшает ли обработка IFN- β противоопухолевую активность CAR-макрофагов с мРНК, содержащей модификации, оценивали противоопухолевую активность макрофагов, подвергнутых электропорации мРНК, содержащей уникальные модификации, с обработкой IFN- β или без нее. Обработка IFN- β приводила к улучшению противоопухолевой активности для всех CAR-макрофагов, кроме макрофагов, трансфицированных 5 мкЕд мРНК (**Фиг. 125В**). Чтобы оценить, является ли улучшенный противоопухолевый эффект CAR-макрофагов, трансфицированных мРНК, универсальным для всех интерферонов или только для интерферона бета, макрофаги, электропорированные мРНК M6AGCap1/PsU, обрабатывали IFN-альфа, бета или гамма и оценивали их способность уничтожать раковые клетки. CAR-макрофаги, обработанные IFN- β , приводили к лучшему уничтожению раковых клеток с более сильным эффектом, чем IFN- α или IFN- γ (**Фиг. 125С**).

Чтобы оценить, улучшает ли интерфероном макрофагов другие противоопухолевые функции, оценивали секрецию цитокинов обработанных или необработанных интерфероном макрофагов с CAR к HER2, трансфицированных мРНК, после совместного культивирования с HER2+ клетками рака молочной железы. Макрофаги человека подвергали электропорации с 150 нМ мРНК CAR к HER2, содержащей модификации m6AGCap1 и PsU. HER2+ клетки рака молочной железы (CRL2351) совместно культивировали с CAR-макрофагами после того, как макрофаги были трансфицированы мРНК CAR при соотношении эффектора (CAR-макрофаг) к мишени (раковая клетка) 3:1. Супернатант собирали через 48 часов после совместного культивирования раковых клеток и макрофагов и измеряли уровни цитокинов с использованием прибора Meso Scale

Discovery (MSD). Как показано на **Фиг. 126**, обработка макрофагов IFN- α , IFN- β или IFN- γ приводила к увеличению секреции макрофагами цитокинов IL-6, IL-8 и TNF α .

Были проведены дополнительные исследования, чтобы определить, может ли обработка интерферонами дополнительно улучшить персистенцию мРНК CAR в макрофагах и можно ли расширить функциональность CAR-макрофагов. Макрофаги человека подвергали электропорации 300 нМ мРНК CAR, содержащей модификации m6AGCap1 и PsU. Клетки культивировали с 20 нг/мл IFN в течение 24 часов, а затем клетки промывали для удаления цитокинов. Экспрессию CAR определяли с помощью проточной цитометрии (Attune) на 2-й день после трансфекции. Затем клетки совместно культивировали с меченной Nuc-Light HER2+ линией клеток рака молочной железы (CRL2351) при соотношении эффектора к мишени 3:1. Рост раковых клеток контролировали по их флуоресценции на микроскопе для визуализации в реальном времени Incucyte®. Экспрессию CAR и маркеры M1 в макрофагах определяли с помощью проточной цитометрии (Attune) на 7-й день после трансфекции.

Как показано на **Фиг. 127А**, через два дня после трансфекции мРНК CAR жизнеспособность CAR-макрофагов и экспрессия CAR были очень высокими, за исключением макрофагов, обработанных IFN- γ . Кроме того, как показано на **Фиг. 127В** и **Фиг. 127С**, обработка IFN усиливала активность CAR-макрофагов по уничтожению клеток-мишеней. На **Фиг. 127С** показано уничтожение клеток-мишеней после совместного культивирования раковых клеток и макрофагов в течение 72 часов. Обработка IFN также влияла на жизнеспособность макрофагов, экспрессию CAR, экспрессию маркера M1 и функциональность CAR-макрофагов. Как показано на **Фиг. 128А**, обработка трансфицированных макрофагов IFN- β приводит к повышению жизнеспособности клеток, экспрессии CAR к HER2 и экспрессии маркеров M1 CD80, CD86 и HLA-DR по сравнению с макрофагами, которые не были обработаны интерфероном в более поздней временной точке на 7-й день. На **Фиг. 128А** показано, что все макрофаги имели высокую жизнеспособность на 7-й день, но макрофаги, обработанные IFN- β , экспрессировали самый высокий уровень CAR со значительным отрывом. На **Фиг. 128В** показано, что из всех CAR-макрофагов, которые были протестированы в анализе уничтожения раковых клеток через 7 дней после электропорации, макрофаги, обработанные IFN- β , приводили к наивысшему уровню уничтожения злокачественного новообразования (наибольшее снижение роста опухоли). Через семь дней после электропорации макрофагов их совместно культивировали с раковыми клетками-мишенями в течение 72 часов. Как показано на **Фиг. 128С**, все интерфероны улучшали активность CAR-макрофагов по уничтожению раковых

клеток по сравнению с CAR-макрофагами, которые не подвергались обработке интерфероном.

Пример 10. Трансфицированные макрофаги чувствительны к IFN γ

Макрофаги человека трансфицировали мРНК mCherry, содержащей модификации m6AGCap1 и PsU или N1mPsU, а затем культивировали в течение одного дня различными дозами IFN- γ . Экспрессию mCherry контролировали с помощью микроскопа Incucyte® для визуализации в реальном времени. Как показано на **Фиг. 129**, IFN- γ снижал экспрессию мРНК mCherry, когда макрофаги трансфицировали мРНК.

Ранее было показано, что транскрибируемая *in vitro* мРНК распознается различными эндосомальными рецепторами врожденного иммунитета (например, Toll-подобным рецептором (TLR) 3, TLR7 и TLR8) и цитоплазматическими рецепторами врожденного иммунитета (протеинкиназы R (PKR), белка гена I, индуцируемого ретиноевой кислотой, (RIG-I), ассоциированного с дифференцировкой меланомы белка 5 (MDA5) и 2'-5'-олигоаденилатсинтазы (OAS)). Сигналинг через эти различные пути приводит к воспалению, связанному с интерфероном 1 типа (IFN), фактором некроза опухоли (TNF), интерлейкином-6 (IL-6), IL-12 и активацией каскадов программ транскрипции. В целом, они создают провоспалительную среду, способную вызывать специфические иммунные ответы. Более того, все последующие эффекты, такие как снижение трансляции с помощью фосфорилирования эукариотического фактора инициации трансляции 2 α (eIF2 α), усиленная деградация РНК рибонуклеазой L (РНКазой L), избыточная экспрессия, ингибирование репликации самоамплифицирующейся мРНК, имеют отношение к фармакокинетике и фармакодинамике мРНК IVT.

Активация IFN- γ через пути TLR может активировать 2'-5'-олигоаденилатсинтазу (OAS), которая продуцирует 2'-5'-олигоаденилат (2-5A), который, в свою очередь, может активировать РНКазу L, что приводит к деградации РНК и апоптозу.

Пример 11. Влияние ингибиторов РНКазы L, сунитиниба и ABCE1, на CAR-макрофаги

Чтобы определить, может ли ингибитор РНКазы L устранить индуцированную IFN- γ нестабильность трансфицированной мРНК, макрофаги человека обрабатывали 1 мкМ сунитиниба (ингибитор РНКазы L) за два часа до трансфекции мРНК mCherry, содержащей модификации m6AGCap1 и PsU. Затем трансфицированные клетки культивировали в

течение одного дня с различными дозами IFN- γ . Экспрессию mCherry контролировали с помощью микроскопа для визуализации в реальном времени Incucyte®. Как показано на **Фиг. 130А**, сунитиниб устранял вызванную IFN- γ деградацию мРНК.

Чтобы оценить, может ли ингибирование РНКазы L улучшить противоопухолевую функцию мРНК-трансфицированных CAR-макрофагов, макрофаги трансфицировали мРНК, содержащей модификации, и предварительно обрабатывали сунитинибом перед оценкой в качестве эффекторных клеток в анализе уничтожения раковых клеток. CAR-макрофаги, предварительно обработанные 1 нМ сунитиниба, приводили к более высокому уровню уничтожения раковых клеток, чем макрофаги CAR, предварительно не обработанные сунитинибом, или нетрансфицированные контрольные макрофаги, обработанные или необработанные сунитинибом (**Фиг. 130В**). Улучшенная способность CAR-макрофагов, праймированных сунитинибом, уничтожать злокачественное новообразование в 48-часовом анализе уничтожения клеток рака молочной железы CRL2351 показана на **Фиг. 130С**.

Эффект другого ингибитора РНКазы L (RLI или ABCE1) также был протестирован для дальнейшего подтверждения концепции. Макрофаги человека совместно трансфицировали мРНК, кодирующей mCherry, содержащей модификации mBAGCap 1 и PsU, и мРНК, кодирующей ABCE1.

Как показано на **Фиг. 131**, коэкспрессия ABCE1 значительно улучшала экспрессию представляющего интерес трансгена, кодируемого мРНК, через 48 часов после электропорации. Жизнеспособность макрофагов, котрансфицированных ABCE1, не пострадала и оставалась высокой. Котрансфекция ABCE1 увеличила экспрессию mCherry примерно в 2 раза, а предварительная обработка сунитинибом еще больше усилила этот эффект.

Пример 12. Экспрессия рецептора и уничтожение опухолевых клеток CAR-макрофагами, содержащими шарнирный домен CD28

В этом примере была создана конструкция CAR, содержащая лидерный домен CD8, scFv 4D5, шарнирный домен CD28, трансмембранный домен CD28 и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета (CTX_219) (**Фиг. 132**). Затем экспрессию CTX_219 сравнивали с идентичной конструкцией CAR с шарнирным доменом CD8 и трансмембранным доменом CD8 вместо шарнирного домена CD28 и трансмембранного домена CD28 (CTX_001; **Фиг. 8**). Способность CTX_219 уничтожать опухоль сравнивали

с CTX_001, а также с конструкцией CAR, идентичной CTX_001, но лишенной внутриклеточного сигнального домена (CTX_003).

Первичные макрофаги человека суспендировали в буфере EP, содержащем 50-500 нМ мРНК в концентрации от $1,0 \times 10^5$ до $1,0 \times 10^9$ клеток/мл, и подвергали электропорации. Клетки удаляли из кассеты, высевали и инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. СИФ и процент экспрессии CAR определяли через 24 часа после связывания rHER2 с помощью проточной цитометрии. Процент живых клеток определяли с помощью Live/Dead Aqua через 24 часа. Для уничтожения макрофаги совместно культивировали с опухолевыми клетками Her2+ CRL2351-NucGFP при соотношении E:T 2:1 или соотношении E:T 1:1 и контролировали с помощью Incucyte® в течение 72 часов. Гибель опухолевых клеток рассчитывали по интегрированной интенсивности GFP на лунку относительно времени 0.

Экспрессия и процент CAR+ были сопоставимы для конструкции CAR, содержащей шарнирный домен CD28 (CTX_219), конструкции CAR, содержащей шарнирный домен CD8 (CTX_001), и конструкции CAR без внутриклеточного сигнального домена (CTX_003; см. **Фиг. 133А-133С**). Процент живых клеток также был сопоставим для CTX_219 и CTX_001 (**Фиг. 133D**). Неожиданно оказалось, что конструкция CAR, содержащая шарнирный домен CD28 (CTX_219), продемонстрировала усиленную функцию уничтожения по сравнению с контролем CTX_001 и CTX_003 (**Фиг. 133Е**). Эти данные демонстрируют, что конструкция CAR, содержащая шарнирный домен CD28, приводила к улучшенному уничтожению опухолевых клеток макрофагами по сравнению с конструкцией CAR, содержащей шарнирный домен CD8.

Определяли секрецию TNFα и IL6 макрофагами, содержащими CTX_219, относительно CTX_001 и CTX_003. Эффекторные клетки культивировали совместно с HER2+ клетками-мишенями в течение 24 часов при соотношении E:T 1:1. Собирали супернатант и измеряли концентрации TNFα и IL6 с использованием провоспалительной панели MSD 1 (Meso Scale Discovery) в соответствии с инструкциями производителя. Удивительно, но конструкция CAR, содержащая шарнирный домен CD28 (CTX_219), продемонстрировала значительно повышенную секрецию TNFα (примерно в 5 раз выше, чем у CTX_001) без дополнительного увеличения продукции IL6 (**Фиг. 134**). Эти данные демонстрируют, что конструкция CAR, содержащая шарнирный домен CD28, приводила к улучшению секреции цитокина TNFα, уничтожающего опухоль, по сравнению с конструкцией CAR, содержащей шарнирный домен CD8, без увеличения продукции воспалительного цитокина IL6.

Пример 13. VPX-опосредованная лентивирусная трансдукция макрофагов, содержащих CAR

Для лентивирусной трансдукции макрофагов для экспрессии CAR макрофаги размораживали и высевали с плотностью 5-10⁶ клеток на 10 см в чашках в 10 мл полной среды (СМ). После 2-3 часов покоя частицы VPX-лентивируса разводили в СМ и добавляли к макрофагам при заданных MOI. Среду полностью заменяли через 24 часа после добавления лентивируса.

Для сбора макрофагов для экспериментов, описанных в данном документе, 10-сантиметровые чашки вынимали из инкубатора и помещали на 30 мин при 4°C. Клетки удаляли с планшета, осаждали и ресуспендировали в СМ. Проводили подсчет клеток, и макрофаги либо использовали для экспериментов, либо повторно высевали на более поздние временные точки.

Функциональные анализы для оценки CAR-макрофагов

Для анализа уничтожения макрофаги высевали в 96-луночный планшет в 100 мкл СМ при определенной плотности для достижения определенного соотношения макрофагов к мишеням (E:T). После 1-2 часов покоя 10000 опухолевых клеток, экспрессирующих nucLight GFP, ресуспендировали в 100 мл СМ и добавляли в каждую лунку. Планшеты помещали в Incucyte® и визуализировали каждые 4 часа, начиная примерно через 1 час после добавления опухолевых клеток. Уничтожение определяли как интегрированную интенсивность GFP относительно времени сканирования 0. Опухолевые клетки, используемые в этих анализах, представляли собой HER2+ клетки рака молочной железы AU565 и клетки карциномы яичника SKOV3.

Для исследования секреции цитокинов растворимый Her2-His растворяли в сверхчистой воде в концентрации 0,2 мкг/мкл. Затем Her2-His разводили в PBS в определенных концентрациях. 100 мкл разведения Her2-His добавляли в лунки 96-луночного планшета. Планшет хранили при 4°C в течение ночи и затем дважды промывали PBS. В каждую лунку добавляли 50000 макрофагов в конечном объеме 200 мкл СМ. Супернатант собирали примерно через 24 часа после добавления макрофагов и хранили при -20°C для дальнейшей оценки. Детекцию цитокинов проводили с использованием набора MSD U-Plex.

Для обнаружения белков клеточной поверхности и экспрессии CAR клетки инкубировали в буфере для FACS, содержащем Human TruStain FcX, в течение 10 мин при комнатной температуре. Окрашивание поверхностных белков проводили с использованием

следующей панели: CD80-FITC, CD86-PE, CD163-APC-Cy7, CD206-BV421, анти-трастузумаб-APC и Aqua Live/Dead. Детекцию экспрессии поверхностных белков завершали с использованием проточного цитометра Attune NxT (Thermo Fisher) и анализировали в FlowJo.

Для обнаружения экспрессии CAR при сравнении лентивируса с VPX и без VPX, клетки инкубировали в буфере для FACS, содержащем 20 мкг/мл Her2-His, в течение 20 минут при комнатной температуре, после чего инкубировали в Human TruStain FcX в течение 10 минут при комнатной температуре. Окрашивание поверхностных белков проводили с использованием следующей панели: CD80-FITC, CD86-PE, CD163-APC-Cy7, CD206-BV421, анти-His-APC, Aqua Live/Dead. Детекцию экспрессии поверхностных белков завершали с использованием проточного цитометра Attune NxT (Thermo Fisher) и анализировали в FlowJo.

Результаты лентивирусной трансдукции с использованием VPX CAR-макрофагов

Добавление VPX приводило к значительному увеличению экспрессии конструкции CAR (CTX_001) в макрофагах (**Фиг. 136**). CTX_001 содержит scFv к HER2, шарнир CD8, трансмембранный домен CD8 и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета (**Фиг. 8**). Трансдукция на основе VPX увеличила CAR (%) до более чем 40% при MOI 5, более 60% при MOI 10, более 80% при MOI 50 и более 90% при MOI 50 по сравнению с тем же CAR (CTX_001) трансдуцировали без VPX с ~ 20% CAR (%) при MOI 5-50.

Затем жизнеспособность и экспрессию CAR оценивали в зависимости от времени для трансдукции VPX-лентивирусом с титрованием MOI. Было показано, что CAR-M, трансдуцированный VPX-лентивирусом, обладает высокой жизнеспособностью и экспрессирует CTX-001 в течение 30 дней (**Фиг. 137**). CAR-M, трансдуцированные VPX-лентивирусом с MOI 1, 5 и 10, были жизнеспособны в течение периода времени около 30 дней с % живых клеток в диапазоне от около 80% до около 100%. % экспрессии CAR увеличился с MOI 1 до MOI 5 и 10. В качестве контроля использовали нетрансдуцированные (UTD) макрофаги.

Экспрессию CAR также оценивали для CTX_001 в макрофагах, трансдуцированных VPX-лентивирусом, с использованием α -трастузумаб-AF647 для анализа поверхностного белка в зависимости от времени. Экспрессия CAR на клеточной поверхности была показана при MOI 1, MOI 5 и MOI 10 с повышенной экспрессией при MOI 5 и 10 на 4, 7, 15, 22 и 29 дни (**Фиг. 138**). UTD макрофаги использовали в качестве контроля.

Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) для экспрессии CAR также оценивали для CTX_001 в макрофагах, трансдуцированных VPX-лентивирусом, с использованием α -трастузумаб-AF647 для анализа поверхностного белка в зависимости от времени. Было показано, что CAR-макрофаги, трансдуцированные VPX-лентивирусом, обладают высокой жизнеспособностью и экспрессируют CTX-001 в течение 30-дневного периода времени (**Фиг. 139**). Таким образом, макрофаги CAR, трансдуцированные VPX-лентивирусом, сохраняли экспрессию CAR по меньшей мере 29 дней.

Также оценивали функцию уничтожения макрофагов CTX_001, трансдуцированных VPX-лентивирусом. Соотношение эффекторных макрофагов к опухолевым клеткам-мишеням (Е:Т) составляло 4:1, 2:1, 1:1 и 1:2. Интегрированная интенсивность свидетельствует об опухолевой массе. UTD макрофаги и клетки AU565 (HER2+ линия клеток рака молочной железы) без макрофагов использовали в качестве контроля. Функция уничтожения была очевидна для макрофагов CTX_001 при всех соотношениях Е:Т и при MOI 1, 5 и 10 через 4 дня, и она сохранялась через 7 дней (**Фиг. 140**). Примечательно, что макрофаги CTX_001 при MOI 5 и MOI 10 демонстрировали одинаковые уровни функции уничтожения при всех соотношениях Е:Т. Наносили на график противоопухолевую активность через 72 часа после совместного культивирования.

Затем был исследован диапазон MOI для клинической трансдукции. CAR исследовали с доменом CD3-дзета (CTX_001) и без домена CD3-дзета (CTX_003; CAR, содержащий scFv к HER2, шарнирный домен CD8 и трансмембранный домен CD8; **Фиг. 10**). MOI 2 и MOI 5 приводили к экспрессии CTX_001 и CTX_003 на клеточной поверхности CAR в макрофагах, трансдуцированных VPX-лентивирусом (**Фиг. 141A**). Было показано, что макрофаги CTX_001 и CTX_003, трансдуцированные VPX-лентивирусом, являются жизнеспособными и экспрессируют каждый CAR относительно UTD макрофагов (**Фиг. 141B**). Было показано, что макрофаги CTX_001, трансдуцированные VPX-лентивирусом, экспрессируют более высокие уровни CAR при MOI 5, чем при MOI 2 (**Фиг. 142**). Трансдукция VPX-лентивирусом также приводила к умеренной дозозависимой M1 поляризации макрофагов CTX_001 и CTX_003 на основании экспрессии CD80 и CD86 и снижения экспрессии CD163 и CD206 (**Фиг. 143**).

Были также проведены эксперименты для сравнения поляризации макрофагов CTX_001, трансдуцированных VPX-лентивирусом, по сравнению с трансдукцией аденоассоциированным вирусом Ad5f35. Трансдукция Ad5f35, но не VPX-лентивирусом, индуцировала образование маркеров M1 CD80 и CD86 (**Фиг. 144**). Макрофаги CTX_001, трансдуцированные VPX-лентивирусом, также продемонстрировали более стойкую

противоопухолевую активность по сравнению с макрофагами CTX_001, трансдуцированными Ad5f35, через 7 дней после трансдукции и через 21 день после трансдукции (**Фиг. 145**). Эти результаты демонстрируют, что в некоторых случаях можно использовать разные вирусные векторы для эквивалентной экспрессии CAR в макрофагах без индукции формирования M1 при использовании VPX-лентивируса, что позволяет поддерживать пластичность макрофагов и последующий контроль фенотипа. Таким образом, VPX-лентивирус может быть использован для получения M0 CAR-макрофагов. Впоследствии M0 CAR-макрофаги, полученные из Vpx-лентивируса, могут быть поляризованы до M1 или M2, чтобы получить M1 или M2 поляризованные сконструированные макрофаги или CAR-макрофаги. Такие CAR-макрофаги могут также кодировать сигнальные домены внутри конструкции CAR, чтобы вызвать изменение фенотипа. Такие CAR-макрофаги могут быть праймированы цитокинами M1 (например, IFN α , IFN β , IFN γ , LPS или агонистами TLR) или цитокинами M2 (например, IL4, IL10, IL13 или TGF β) для получения CAR-макрофагов с выбранным фенотипом. Такие CAR-макрофаги могут быть сконструированы с факторами транскрипции, иммунными лигандами или секретируемыми цитокинами, чтобы индуцировать формирование фенотипа M1 или M2.

Функцию уничтожения для макрофагов CTX_001 и CTX_003, трансдуцированных VPX-лентивирусом, также оценивали при MOI 2 и MOI 5 в клетках AU565 и SKOV3. Соотношения Е:Т составляли 4:1 и 1:2 для AU565. Через 7 дней после трансдукции VPX-лентивирусом макрофаги CTX_001, трансдуцированные при MOI 2 и MOI 5, продемонстрировали аналогичную способность к уничтожению при соотношениях Е:Т 4:1 и 2:1 с UTD клетками и клетками AU565 в качестве контроля (**Фиг. 146**). Соотношение Е:Т составляло 4:1 для SKOV3. Через 7 дней после трансдукции VPX-лентивирусом макрофаги CTX_001, трансдуцированные при MOI 2 и MOI 5, продемонстрировали аналогичную способность к уничтожению при соотношении Е:Т 4:1 с UTD клетками и клетками SKOV3 в качестве контроля (**Фиг. 147**).

Также исследовали продукцию воспалительных цитокинов после трансдукции макрофагов CTX_001 и CTX_003 VPX-лентивирусом. Макрофаги CTX_001 и CTX_003 трансдуцировали VPX-лентивирусом и культивировали с или без HER2, связанного с планшетами, в течение 24 часов. Через 7 дней после трансдукции VPX-лентивирусом макрофаги CTX_001, трансдуцированные при MOI 2 и MOI 5, показали различия в секреции воспалительных цитокинов с повышенной продукцией TNF α и IL-6 в присутствии HER2 (**Фиг. 148**).

Затем оценивали жизнеспособность и экспрессию CAR с течением времени для VPX-лентивирусной трансдукции макрофагов CTX_001 и CTX_003 с MOI 2 и MOI 5. Было показано, что макрофаги CTX_001 и CTX_003, трансдуцированные VPX-лентивирусом, обладают высокой жизнеспособностью и экспрессируют CTX-001 и CTX_003 в течение 21 дня (**Фиг. 149**). UTD макрофаги использовали в качестве контроля. СИФ экспрессии CAR CTX-001 и CTX_003 также оценивали для макрофагов, трансдуцированных VPX-лентивирусом, с использованием α -трастазумаб-AF647 для анализа белка клеточной поверхности в зависимости от времени. Было показано, что макрофаги CTX_001 и CTX_003, трансдуцированные VPX-лентивирусом, обладают высокой жизнеспособностью и экспрессируют CTX-001 и CTX-003 в течение 21 дня (**Фиг. 150**).

Функцию уничтожения для макрофагов CTX_001 и CTX_003, трансдуцированных VPX-лентивирусом, также оценивали при MOI 2 и MOI 5 в клетках AU565 и SKOV3 в зависимости от времени. Анализ уничтожения начинали через 21 день после трансдукции. Соотношения Е:Т составляли 4:1 и 1:2 для AU565. Через 21 дней после трансдукции VPX-лентивирусом макрофаги CTX_001, трансдуцированные при MOI 2 и MOI 5, продемонстрировали аналогичную способность к уничтожению при соотношениях Е:Т 4:1 и 2:1 в течение 72 часов с UTD клетками и клетками AU565 в качестве контроля (**Фиг. 151**). Соотношение Е:Т составляло 4:1 для SKOV3. Через 21 дней после трансдукции VPX-лентивирусом макрофаги CTX_001, трансдуцированные при MOI 2 и MOI 5, продемонстрировали аналогичную способность к уничтожению при соотношении Е:Т 4:1 с UTD клетками и клетками SKOV3 в качестве контроля (**Фиг. 152**).

Также исследовали экспрессию CTX_001 (**Фиг. 8**) и жизнеспособность в моноцитах после трансдукции VPX-лентивируса. CD14⁺ моноциты человека размораживали, промывали и подсчитывали. Клетки высевали в 6-луночный планшет Urcell в количестве 3е6 клеток/лунка, UTD или с добавлением лентивируса при подходящем MOI. Клетки подпитывали на 5-й день и собирали на 7-й день для анализа методом проточной цитометрии. CAR макрофаги и CAR моноциты, трансдуцированные с помощью трансдукции Ad5f35, использовали в качестве контроля. CAR моноциты были жизнеспособны после трансдукции VPX-лентивирусом при MOI 2, 5 или 10 с трансдуцированными Ad5f35 CAR-моноцитами и CAR-макрофагами, используемыми в качестве сравнения жизнеспособности (**Фиг. 153А**). CAR-моноциты, трансдуцированные VPX-лентивирусом при MOI 2, 5 и 10, демонстрировали возрастающий процент (%) экспрессии CAR: 27,6% при MOI 2, 51,3% при MOI 5 и 66,3% при MOI 10 с трансдуцированными Ad5f35 CAR-моноцитами и CAR-макрофагами, используемыми в

качестве клеток для сравнения жизнеспособности (**Фиг. 153B**). CAR-моноциты, трансдуцированные VPX-лентивирусом при MOI 2, 5 и 10, демонстрировали увеличение средней интенсивности флуоресценции (MFI) экспрессии CAR с увеличением множественности заражения моноцитами CAR, трансдуцированными Ad5f35, и макрофагами CAR, использованными в качестве сравнения (**Фиг. 153C**). Гистограммы экспрессии CAR в CD14⁺ моноцитах, трансдуцированных VPX-лентивирусом при MOI 2, 5 и 10, также показали увеличение экспрессии CAR с увеличением MOI с трансдуцированными Ad5f35 CAR-моноцитами и CAR-макрофагами, используемыми в качестве клеток для сравнения (**Фиг. 153D**). UTD макрофаги также использовали в качестве контроля для гистограмм экспрессии CAR. Эти результаты демонстрируют, что моноциты экспрессируют CAR после трансдукции VPX-лентивирусом, и указывают на то, что моноциты сохраняют экспрессию CAR на макрофагальной стадии.

Пример 14. Нокаут SIRP α для усиленного фагоцитоза CAR-макрофагами

Взаимодействие иммунных контрольных точек SIRP α и CD47 ингибирует фагоцитоз макрофагами. Таким образом, макрофаги, экспрессирующие CAR, получают противоречивые про- и антифагоцитарные сигналы от опухолей. Представленные в данном документе результаты демонстрируют, что нокаут SIRP α улучшает уничтожение CAR-макрофагов и фагоцитоз.

Выполняли получение рибонуклеопротеина (РНП) и смешивали его с макрофагами через день после размораживания макрофагов. Очищенный белок Cas9 инкубировали с коктейлем из трех гРНК при комнатной температуре в течение 10-20 минут. Используемые последовательности гРНК были взяты из «набора для нокаута генов» от Synthego для человеческого SIRP α (таблица 2). Использовали соотношение 1:3 Cas9 к общей гРНК (таким образом, отношение Cas9 к каждой отдельной гРНК в коктейле составляло 1:1). РНП, смешанный с макрофагами в буфере EP, имел конечную концентрацию 2,5 мкМ РНП Cas9 для $3 \times 10^7 - 8 \times 10^7$ клеток/мл. Макрофаги подвергали электропорации в кассете для электропорации MaxCyte. После восстановления культуры клетки анализировали не менее чем через 3 дня после электропорации, чтобы нокаут гена успел проявиться на уровне экспрессии белка. Затем анализировали экспрессию SIRP α и проводили функциональные анализы.

Таблица 2. Последовательности направляющих РНК для нокаута SIRP α .

Название нРНК	Последовательность РНК
SIRPa_gKOv2_1	GAGCCCGCCGGCCCGGCCCC
SIRPa_gKOv2_2	GUGCUUACCUGACCAGGCGC
SIRPa_gKOv2_3	CGGGCTCAGGCCTCTCAGAC

Свежие макрофаги от двух разных доноров (HCC 163264 и HCC 151560) получали за день до начала экспериментов, макрофаги подвергали электропорации с Cas9 в указанных концентрациях РНП на 0-й день, а экспрессию SIRPα оценивали на 3 день. Иммуноокрашивание на SIRPα проводили на поверхности макрофагов с помощью проточной цитометрии. Результаты показали, что у двух доноров SIRPα может быть нокаутирован в макрофагах дозозависимым образом (**Фиг. 154А-В**). Результаты показали две различные популяции CAR-макрофагов на графиках проточной цитометрии при 312 нМ РНП (**Фиг. 154С**), что подтверждает характер нокаута гена Cas9 по принципу «все или ничего», так что ген SIRPα либо нокаутируется, либо нет, что приводит к образованию бинарных популяций, а не к градиенту экспрессии SIRPα. Важно отметить, что нокаут SIRPα не влиял на жизнеспособность клеток (**Фиг. 154D**).

Также было показано, что нокаут SIRPα усиливает фагоцитоз CAR-макрофагами клеток карциномы яичников SKOV-3. Макрофаги размораживали и трансдуцировали аденовирусом, кодирующим CTX_001 (CAR, содержащий scFv к HER2, шарнир CD8, трансмембранный домен CD8 и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета; **Фиг. 8**) за один день до электропорации с РНП Cas9. Через три дня оценивали экспрессию SIRPα и начинали анализ фагоцитоза с использованием SKOV-3. Эти результаты демонстрируют нокаут SIRPα в макрофагах CTX_001 с помощью Cas9 и нРНК, нацеленной на SIRPα (**Фиг. 155А**). CTX_001 экспрессировался в трансдуцированных макрофагах (**Фиг. 155В**). Макрофаги CTX_001 демонстрировали фагоцитоз в течение 12 часов, который измеряли по сигналу pHrodo-green с помощью анализа Incucyte® (**Фиг. 155С**). Общий фагоцитоз, измеренный в течение 12 часов, был количественно выражен в виде площади под кривой (**Фиг. 155D**). Нокаут SIRPα вместе с экспрессией CAR в макрофагах приводил к наибольшему фагоцитозу, в то время как нокаут SIRPα сам по себе не значительно усиливал фагоцитоз UTD макрофагами.

Также было показано, что нокаут SIRP α усиливает фагоцитоз CAR-макрофагами клеток рака молочной железы человека HCC-1954. Макрофаги размораживали и трансдуцировали аденовирусом, кодирующим CTX_001, за один день до электропорации с РНП Cas9. Через три дня оценивали экспрессию SIRP α и начинали анализ фагоцитоза с использованием HCC-1954. Эти результаты демонстрируют нокаут SIRP α в макрофагах CTX_001 с помощью Cas9 и нРНК, нацеленной на SIRP α (**Фиг. 156A**). CTX_001 экспрессировался в трансдуцированных макрофагах (**Фиг. 156B**). Макрофаги CTX_001 продемонстрировали фагоцитоз в течение 12 часов, что было измерено по сигналу pHrodo-green с помощью анализа Incucyte® с изменением масштаба нижнего графика по оси y, чтобы показать, что макрофаги CTX_001 демонстрировали фагоцитоз в большей степени, чем все группы UTD (**Фиг. 156C**). Общий фагоцитоз, измеренный в течение 12 часов, был количественно выражен в виде площади под кривой (**Фиг. 156D**). Эти результаты демонстрируют, что, хотя контрольная нРНК увеличивала фагоцитоз, нокаут SIRP α наряду с экспрессией CAR в макрофагах оставался мощнейшим усилителем процесса фагоцитоза.

Также было показано, что нокаут SIRP α усиливает уничтожение CAR-макрофагов в клетках карциномы яичника SKOV-3 с использованием макрофагов из других донорских клеток, чем в приведенном выше эксперименте. Макрофаги размораживали за один день до электропорации с РНП Cas9 и трансдуцировали аденовирусом, кодирующим CTX_001, через три дня после электропорации. Через два дня оценивали экспрессию SIRP α и начинали анализ фагоцитоза с использованием SKOV-3. Эти результаты демонстрируют нокаут SIRP α в макрофагах CTX_001 с помощью Cas9 и нРНК, нацеленной на SIRP α (**Фиг. 157A**). CTX_001 экспрессировался в трансдуцированных макрофагах (**Фиг. 157B**). Уничтожение SKOV-3 измеряли в виде роста клеток SKOV-3, экспрессирующих флуоресцентный белок nuclight green, которые измеряли с помощью анализа Incucyte® в течение 24 часов (**Фиг. 157C**). Нокаут SIRP α в CAR-макрофагах человека увеличивал кинетику уничтожения опухоли, исходя из количества часов, необходимых для клиренса 50% опухолевых клеток-мишеней (**Фиг. 157D**). Общий фагоцитоз измеряли в течение 12 часов (**Фиг. 157E**). Нокаут SIRP α вместе с экспрессией CAR в макрофагах приводил к наибольшему фагоцитозу, в то время как нокаут SIRP α сам по себе не значительно усиливал фагоцитоз UTD макрофагами. Полученные результаты относительно фагоцитоза соответствовали результатам при использовании второго донора. Оказалось, что CAR-макрофаги с нокаутом SIRP α убивают быстрее, чем CAR-макрофаги без нокаута SIRP α .

Эти результаты, представленные в данном документе, демонстрируют высокую эффективность нокаута SIRP α с помощью системы CRISPR/Cas в первичных CAR-

макрофагах человека и то, что нокаут SIRP α с помощью системы CRISPR/Cas может успешно выполняться на первичных CAR-макрофагах человека. Эти результаты сочетаются с функциональными данными, демонстрирующими повышенный фагоцитоз и уничтожение CAR-макрофагами с нокаутом SIRP α по сравнению с CAR-макрофагами без нокаута SIRP α . Для двух отдельных доноров и экспериментов нокаут SIRP α увеличивал фагоцитоз клеток SKOV-3 CAR-макрофагами. Примечательно, что нокаут SIRP α в макрофагах, не экспрессирующих CAR, не увеличивал фагоцитоз или уничтожение опухоли; таким образом, эффект можно считать синергетическим.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что различные изменения, модификации и улучшения настоящего раскрытия будут очевидны специалистам в данной области техники. Предполагается, что такие изменения, модификации и улучшения являются частью настоящего изобретения и находятся в пределах сущности и объема изобретения. Соответственно, приведенное выше описание и графические материалы приведены только в качестве примера, и любое изобретение, описанное в данном изобретении, дополнительно подробно описано в следующей формуле изобретения.

Специалисты в данной области техники будут учитывать типичные стандартные отклонения или ошибки, относящиеся к значениям, полученным в анализах или других способах, как описано в данном документе. Публикации, веб-сайты и другие справочные материалы, на которые в данном документе делаются ссылки для описания уровня техники и предоставления дополнительных подробностей относительно практического применения изобретения, тем самым включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Формула изобретения

1. Иммунная клетка, содержащая химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:
 - (a) внеклеточный домен,
 - (b) трансмембранный домен и
 - (c) внутриклеточный домен,
 при этом иммунная клетка представляет собой макрофаг, моноцит или дендритную клетку.
2. Иммунная клетка по п. 1, отличающаяся тем, что внеклеточный домен CAR содержит один или более антигенсвязывающих доменов и внеклеточный домен FcR, и/или трансмембранный домен CAR включает в себя трансмембранный домен FcR, и/или внутриклеточный домен CAR включает в себя внутриклеточный домен FcR.
3. Иммунная клетка по п. 2, отличающаяся тем, что CAR содержит от N-конца к С-концу один или более внеклеточных связывающих доменов, внеклеточный домен FcR, трансмембранный домен FcR и внутриклеточный домен FcR.
4. Иммунная клетка по п. 2 или п. 3, отличающаяся тем, что один или более из внеклеточного домена FcR, трансмембранного домена FcR и внутриклеточного домена FcR представляет собой или включает в себя домен FcR человека.
5. Иммунная клетка по любому из пп. 2–4, отличающаяся тем, что внеклеточный домен FcR, трансмембранный домен FcR и внутриклеточный домен FcR вместе составляют полноразмерный FcR.
6. Иммунная клетка по любому из пп. 2–5, отличающаяся тем, что внеклеточный домен FcR включает в себя домен CD64 (FcγRI), CD32a (FcγRIIa), CD32b (FcγRIIb), CD32c, CD16a (FcγRIIIa), CD16b (FcγRIIIb), FcεRI, FcεRII или FcαRI (CD89).
7. Иммунная клетка по любому из пп. 2–6, отличающаяся тем, что трансмембранный домен FcR включает в себя домен CD64 (FcγRI), CD32a (FcγRIIa), CD32b (FcγRIIb), CD32c, CD16a (FcγRIIIa), CD16b (FcγRIIIb), FcεRI, FcεRII или FcαRI (CD89).

8. Иммунная клетка по любому из пп. 2–7, отличающаяся тем, что внутриклеточный домен FcR включает в себя домен CD64 (FcγRI), CD32a (FcγRIIa), CD32b (FcγRIIb), CD32c, CD16a (FcγRIIIa), CD16b (FcγRIIIb), FcεRI, FcεRII или FcαRI (CD89).

9. Иммунная клетка по п. 1, отличающаяся тем, что внеклеточный домен CAR содержит один или более антигенсвязывающих доменов и внеклеточный домен Toll-подобного рецептора (TLR), и/или трансмембранный домен CAR включает в себя трансмембранный домен TLR, и/или внутриклеточный домен CAR включает в себя внутриклеточный домен TLR.

10. Иммунная клетка по п. 9, отличающаяся тем, что CAR содержит от N-конца к С-концу один или более внеклеточных связывающих доменов, внеклеточный домен TLR, трансмембранный домен TLR и внутриклеточный домен TLR.

11. Иммунная клетка по п. 9 или п. 10, отличающаяся тем, что один или более из внеклеточного домена TLR, трансмембранного домена TLR и внутриклеточного домена TLR представляет собой или включает в себя домен TLR человека.

12. Иммунная клетка по любому из пп. 9–11, отличающаяся тем, что внеклеточный домен TLR, трансмембранный домен TLR и внутриклеточный домен TLR вместе составляют полноразмерный TLR.

13. Иммунная клетка по любому из пп. 9–12, отличающаяся тем, что внеклеточный домен TLR включает в себя домен TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 или TLR9.

14. Иммунная клетка по любому из пп. 9–13, отличающаяся тем, что трансмембранный домен TLR включает в себя домен TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 или TLR9.

15. Иммунная клетка по любому из пп. 9–14, отличающаяся тем, что внутриклеточный домен TLR включает в себя домен TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 или TLR9.

16. Иммунная клетка по п. 1, отличающаяся тем, что химерный антигенный рецептор дополнительно содержит одно или более из:

- (d) одного или более внеклеточных лидерных доменов,
- (e) одного или более внеклеточных шарнирных доменов, и
- (f) одного или более внутриклеточных костимулирующих доменов.

17. Иммунная клетка по п. 16, отличающаяся тем, что один или более внеклеточных лидерных доменов содержат внеклеточный лидерный домен CD8.

18. Иммунная клетка по любому из пп. 1–17, отличающаяся тем, что один или более внеклеточных антигенсвязывающих доменов содержат scFv, центирин или дарпин.

19. Иммунная клетка по любому из пп. 16–18, отличающаяся тем, что один или более внеклеточных шарнирных доменов содержат внеклеточный шарнирный домен CD28, внеклеточный шарнирный домен CD8a или внеклеточный шарнирный домен IgG4.

20. Иммунная клетка по любому из пп. 1–19, отличающаяся тем, что трансмембранный домен включает в себя трансмембранный домен CD28, CD8a, CD64, CD32a, CD32c, CD16a, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 или TLR9.

21. Иммунная клетка по любому из пп. 1–20, отличающаяся тем, что внутриклеточный домен содержит один или более внутриклеточных сигнальных доменов.

22. Иммунная клетка по п. 21, отличающаяся тем, что один или более внутриклеточных сигнальных доменов включают в себя внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета, FcR γ , CD64, CD32a, CD32c, CD16a, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, ALK, AXL, DDR2, EGFR, EphA1, INSR, cMET, MUSK, PDGFR, PTK7, RET, ROR1, ROS1, RYK, TIE2, TRK, VEGFR, CD40, CD19, CD20, 41BB, CD28, OX40, GITR, TREM-1, TREM-2, DAP12, MR, ICOS, MyD88, V/I/LxYxxL/V, SIRPa, CD45, Siglec-10, PD1, SHP-1, SHP-2, KIR-2DL, KIR-3DL, NKG2A, CD170, CD33, BTLA, CD32b, SIRPb, CD22, PIR-B, LILRB1, 41BBL (TNFSF9), CD27, OX40L, CD32b, CD11b, ITGAM, SLAMF7, CD206, CD163, CD209, дектин-2, IL1R, IL2R, IL3R, IL4R, IL5R, IL6R, IL7R, IL8R, IL9R, IL10R, IL11R, IL12R, IL13R, IL14R, IL15R, IL17R, IFN α R, IFN γ R, TNFR, CSF1R, CSF2R, Dap10, CD36, дектин-1, ICOSL и/или Syk.

23. Иммунная клетка по п. 22, отличающаяся тем, что один или более внутриклеточных сигнальных доменов содержит по меньшей мере один внутриклеточный костимулирующий домен.

24. Фармацевтическая композиция, содержащая иммунную клетку по любому из предыдущих пунктов.

25. Фармацевтическая композиция по п. 24, отличающаяся тем, что содержит фармацевтически приемлемый носитель.

26. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих:

- (a) внеклеточный домен,
- (b) трансмембранный домен и
- (c) внутриклеточный домен,

при этом конструкция нуклеиновой кислоты кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий (a)-(c).

27. Конструкция нуклеиновой кислоты по п. 26, дополнительно содержащая одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих:

- (e) один или более внеклеточных лидерных доменов,
- (f) один или более внеклеточных шарнирных доменов,
- (g) один или более внутриклеточных костимулирующих доменов,
- (h) расщепляемый пептид, и
- (i) один или более пептидных агентов.

28. Конструкция нуклеиновой кислоты по п. 27, отличающаяся тем, что расщепляемый пептид представляет собой пептид P2A, F2A, E2A или T2A.

29. Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 26–28.

30. Фармацевтическая композиция по п. 29, отличающаяся тем, что содержит фармацевтически приемлемый носитель.

31. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающий:

доставку субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по пп. 24, 25, 29 или 30.

32. Способ модификации иммунной клетки, включающий:

доставку в иммунную клетку конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих:

(a) внеклеточный домен,

(b) трансмембранный домен и

(c) внутриклеточный домен,

при этом модифицированная иммунная клетка содержит химерный сконструированный рецептор, содержащий (a)-(c), и

при этом модифицированная иммунная клетка представляет собой макрофаг, моноцит или дендритную клетку.

33. Способ модификации макрофага, моноцита или дендритной клетки, включающий:

доставку в макрофаг, моноцит или дендритную клетку вирусного вектора, содержащего одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих:

(a) внеклеточный домен,

(b) трансмембранный домен и

(c) внутриклеточный домен,

при этом вирусный вектор упакован по меньшей мере с одним белком V_{px},

при этом модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка содержат химерный сконструированный рецептор (CAR), содержащий (a)-(c), и

при этом модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка проявляют повышенную экспрессию CAR по сравнению с модифицированными макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой, содержащими CAR, который был доставлен вирусным вектором, кодирующим CAR, который не был упакован по меньшей мере с одним белком V_{px}.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что вирусный вектор представляет собой или включает в себя лентивирусный вектор.

35. Способ по п. 33 или п. 34, отличающийся тем, что вирусный вектор доставляют с множественностью заражения (MOI) от около 1 до около 50.

36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что вирусный вектор доставляют с MOI около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9 или около 10.

37. Способ по любому из пп. 33–36, отличающийся тем, что модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка проявляют повышенную экспрессию CAR на около 20%, около 30%, около 40%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90% или более относительно модифицированных макрофага, моноцита или дендритной клетки, содержащих CAR, который был доставлен вирусным вектором, кодирующим CAR, который не был упакован по меньшей мере с одним белком Vprх.

38. Способ по любому из пп. 33–37, отличающийся тем, что модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка проявляют экспрессию CAR в течение продленного периода времени по сравнению с немодифицированными макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что продленный период времени экспрессии CAR составляет по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 25 дней, по меньшей мере 30 дней или дольше.

40. Способ по любому из пп. 33–39, отличающийся тем, что модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка проявляют повышенную эффекторную активность по сравнению с немодифицированными макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой.

41. Способ по п. 39, отличающийся тем, что модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка проявляют повышенную способность к уничтожению опухоли или фагоцитоз по сравнению с немодифицированными макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой.

42. Способ по любому из пп. 33–41, отличающийся тем, что модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка не проявляют повышенную поляризацию в отношении фенотипа M1 по сравнению с макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой, содержащими CAR, который был доставлен вирусным вектором, кодирующим CAR, который не был упакован по меньшей мере с одним белком Vprх.

43. Способ по п. 42, отличающийся тем, что модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка не проявляют повышенную экспрессию одного или более маркеров фенотипа M1 по сравнению с макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой, содержащими CAR, который был доставлен вирусным вектором, кодирующим CAR, который не был упакован по меньшей мере с одним белком Vprx.

44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что один или более маркеров фенотипа M1 включают в себя или представляют собой один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 из CD86, CD80, MHC II, IL-1R, TLR2, TLR4, iNOS, SOCS3, CD83, PD-L1, CD69, MHC I, CD64, CD32, CD16, IL1R, члена семейства IFIT или члена семейства ISG.

45. Способ по любому из пп. 33–44, отличающийся тем, что модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка проявляют повышенную продукцию одного или более воспалительных цитокинов по сравнению с немодифицированными макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что один или более воспалительных цитокинов включают в себя или представляют собой один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11 или 12 из TNF α , IL-6, IL-1 α , IL-1 β , IL-12, IL-18, IL-8, IL-2, IL-23, IFN α , IFN β , IFN γ , IL-2, IL-8, IL33, CCL3, CXCL12, CCL22, CCL4, CXCL10 или CCL2.

47. Способ по любому из пп. 32–46, отличающийся тем, что модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка проявляют сниженную активность SIRP α по сравнению с немодифицированными макрофагом, моноцитом или дендритной клеткой.

48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка включают в себя делецию SIRP α с использованием одной или более эндонуклеаз.

49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что одна или более эндонуклеаз включают в себя или представляют собой одно или более из системы CRISPR/Cas, нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции, (TALEN) или мегануклеазы.

50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что система CRISPR/Cas содержит Cas9, Cas12a или C2c2.
51. Способ по п. 47, отличающийся тем, что модифицированные макрофаг, моноцит или дендритную клетку обрабатывают одним или более антителами к SIRP α .
52. Способ по п. 47, отличающийся тем, что модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка содержат одно или более антител к SIRP α .
53. Способ по п. 47, отличающийся тем, что модифицированные макрофаг, моноцит или дендритная клетка содержат одну или более кННК, которые снижают количество SIRP α .
54. Способ по любому из пп. 33–53, отличающийся тем, что внеклеточный домен CAR содержит один или более антигенсвязывающих доменов и внеклеточный домен FcR, и/или трансмембранный домен CAR включает в себя трансмембранный домен FcR, и/или внутриклеточный домен CAR включает в себя внутриклеточный домен FcR.
55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что CAR содержит от N-конца к С-концу один или более внеклеточных связывающих доменов, внеклеточный домен FcR, трансмембранный домен FcR и внутриклеточный домен FcR.
56. Способ по п. 54 или п. 55, отличающийся тем, что один или более из внеклеточного домена FcR, трансмембранного домена FcR и внутриклеточного домена FcR представляют собой или включают в себя домен FcR человека.
57. Способ по любому из пп. 54–56, отличающийся тем, что внеклеточный домен FcR, трансмембранный домен FcR и внутриклеточный домен FcR вместе составляют полноразмерный FcR.
58. Способ по любому из пп. 54–57, отличающийся тем, что внеклеточный домен FcR включает в себя домен CD64 (Fc γ RI), CD32a (Fc γ RIIa), CD32b (Fc γ RIIb), CD32c, CD16a (Fc γ RIIIa), CD16b (Fc γ RIIIb), Fc ϵ RI, Fc ϵ RII или Fc α RI (CD89).

59. Способ по любому из пп. 54–58, отличающийся тем, что трансмембранный домен FcR включает в себя домен CD64 (FcγRI), CD32a (FcγRIIa), CD32b (FcγRIIb), CD32c, CD16a (FcγRIIIa), CD16b (FcγRIIIb), FcεRI, FcεRII или FcαRI (CD89).

60. Способ по любому из пп. 54–59, отличающийся тем, что внутриклеточный домен FcR включает в себя домен CD64 (FcγRI), CD32a (FcγRIIa), CD32b (FcγRIIb), CD32c, CD16a (FcγRIIIa), CD16b (FcγRIIIb), FcεRI, FcεRII или FcαRI (CD89).

61. Способ по любому из пп. 33–53, отличающийся тем, что внеклеточный домен CAR содержит один или более антигенсвязывающих доменов и внеклеточный домен Toll-подобного рецептора (TLR), и/или трансмембранный домен CAR включает в себя трансмембранный домен TLR, и/или внутриклеточный домен CAR включает в себя внутриклеточный домен TLR.

62. Способ по п. 61, отличающийся тем, что CAR содержит от N-конца к С-концу один или более внеклеточных связывающих доменов, внеклеточный домен TLR, трансмембранный домен TLR и внутриклеточный домен TLR.

63. Способ по п. 61 или п. 62, отличающийся тем, что один или более из внеклеточного домена TLR, трансмембранного домена TLR и внутриклеточного домена TLR представляет собой или включает в себя домен TLR человека.

64. Способ по любому из пп. 61–63, отличающийся тем, что внеклеточный домен TLR, трансмембранный домен TLR и внутриклеточный домен TLR вместе составляют полноразмерный TLR.

65. Способ по любому из пп. 61–64, отличающийся тем, что внеклеточный домен TLR включает в себя домен TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 или TLR9.

66. Способ по любому из пп. 61–65, отличающийся тем, что трансмембранный домен TLR включает в себя домен TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 или TLR9.

67. Способ по любому из пп. 61–66, отличающийся тем, что внутриклеточный домен TLR включает в себя домен TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 или TLR9.

68. Способ по любому из пп. 33–67, отличающийся тем, что CAR дополнительно содержит одно или более из:

- (d) одного или более внеклеточных лидерных доменов,
- (e) одного или более внеклеточных шарнирных доменов, и
- (f) одного или более внутриклеточных костимулирующих доменов.

69. Способ по п. 68, отличающийся тем, что один или более внеклеточных лидерных доменов содержат внеклеточный лидерный домен CD8.

70. Способ по любому из пп. 33–69, отличающийся тем, что один или более внеклеточных связывающих доменов содержат scFv, центирин или дарпин.

71. Способ по любому из пп. 68–70, отличающийся тем, что один или более внеклеточных шарнирных доменов содержат внеклеточный шарнирный домен CD28, внеклеточный шарнирный домен CD8a или внеклеточный шарнирный домен IgG4.

72. Способ по любому из пп. 33–71, отличающийся тем, что трансмембранный домен включает в себя трансмембранный домен CD28, CD8a, CD64, CD32a, CD32c, CD16a, TRL1, TLR2, TLR3, TRL4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 или TLR9.

73. Способ по любому из пп. 33–72, отличающийся тем, что внутриклеточный домен содержит один или более внутриклеточных сигнальных доменов.

74. Способ по п. 73, отличающийся тем, что один или более внутриклеточных сигнальных доменов включают в себя внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета, FcR γ , CD64, CD32a, CD32c, CD16a, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, ALK, AXL, DDR2, EGFR, EphA1, INSR, cMET, MUSK, PDGFR, PTK7, RET, ROR1, ROS1, RYK, TIE2, TRK, VEGFR, CD40, CD19, CD20, 41BB, CD28, OX40, GITR, TREM-1, TREM-2, DAP12, MR, ICOS, MyD88, V/I/LxYxxL/V, SIRPa, CD45, Siglec-10, PD1, SHP-1, SHP-2, KIR-2DL, KIR-3DL, NKG2A, CD170, CD33, BTLA, CD32b, SIRPb, CD22, PIR-B, LILRB1, 41BBL (TNFSF9), CD27, OX40L, CD32b, CD11b, ITGAM, SLAMF7, CD206, CD163, CD209, дектин-2, IL1R, IL2R, IL3R, IL4R, IL5R, IL6R, IL7R, IL8R, IL9R, IL10R, IL11R, IL12R, IL13R, IL14R, IL15R, IL17R, IFNaR, IFNgR, TNFR, CSF1R, CSF2R, Dap10, CD36, дектин-1, ICOSL и/или Syk.

75. Способ по п. 74, отличающийся тем, что один или более внутриклеточных сигнальных доменов содержит по меньшей мере один внутриклеточный костимулирующий домен.

76. Способ по любому из пп. 33–75, отличающийся тем, что вирусный вектор дополнительно содержит одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих:

- (e) один или более внеклеточных лидерных доменов,
- (f) один или более внеклеточных шарнирных доменов,
- (g) один или более внутриклеточных костимулирующих доменов,
- (h) расщепляемый пептид, и
- (i) один или более пептидных агентов.

77. Способ по п. 76, отличающийся тем, что расщепляемый пептид представляет собой пептид P2A, F2A, E2A или T2A.

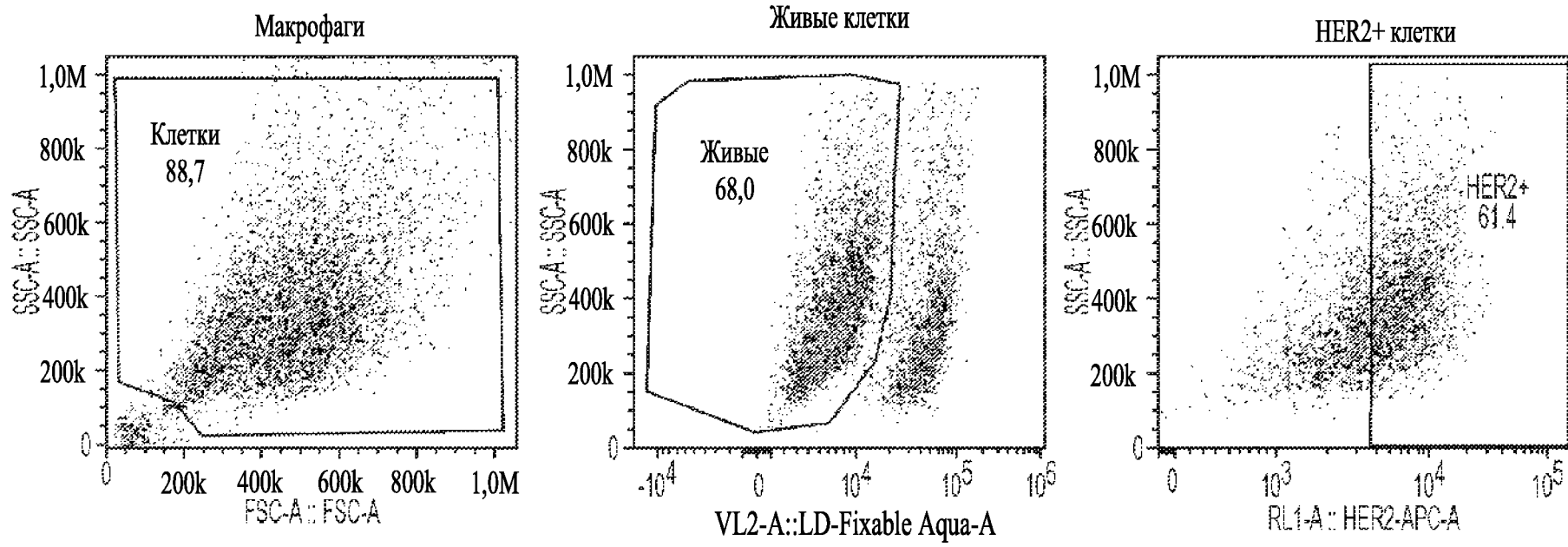
78. Фармацевтическая композиция, содержащая макрофаг, моноцит или дендритную клетку, модифицированные с помощью способа по любому из пп. 33–77.

79. Фармацевтическая композиция по п. 78, отличающаяся тем, что содержит фармацевтически приемлемый носитель.

80. Способ лечения заболевания, нарушения или состояния у субъекта, включающий:

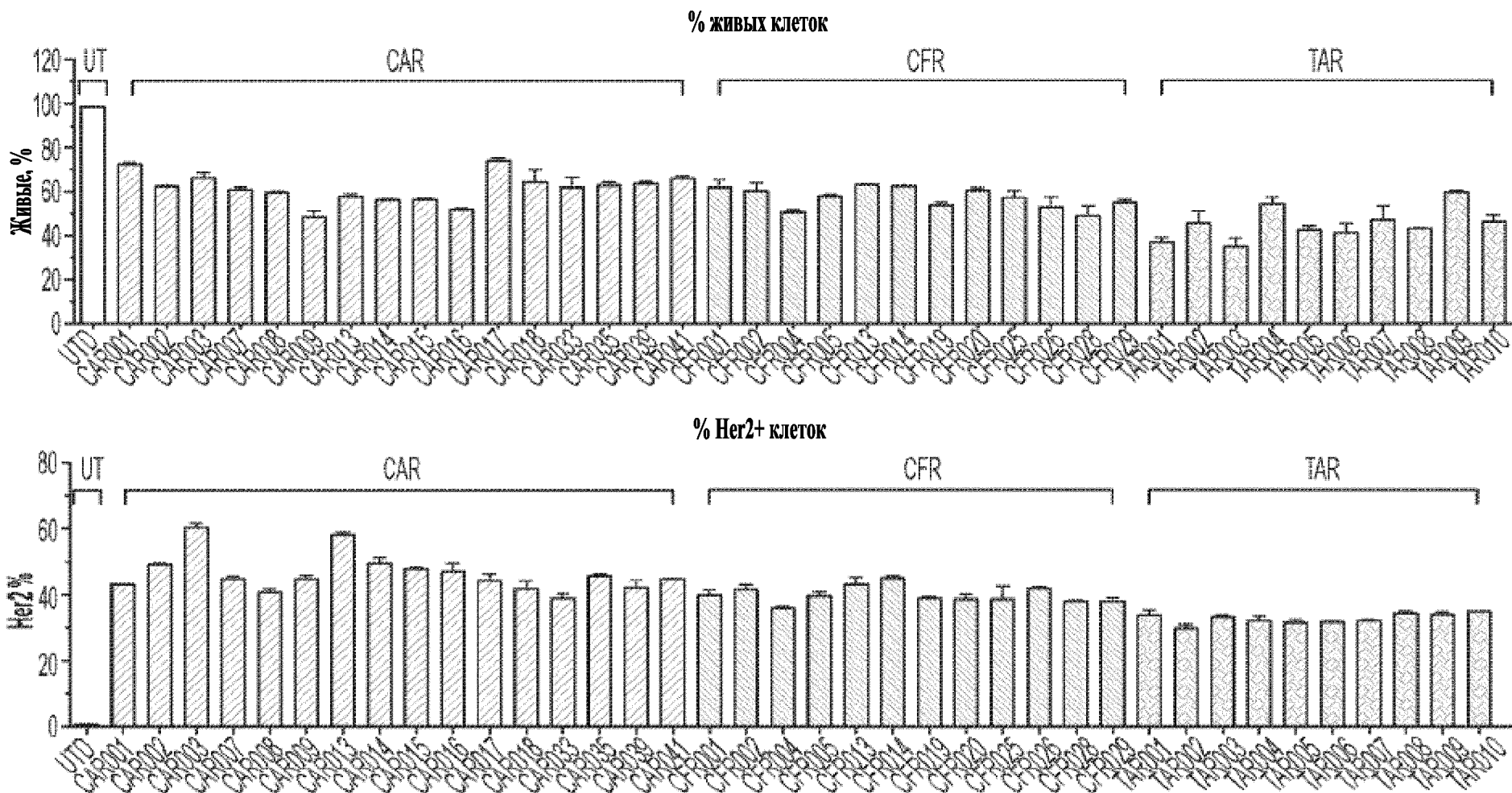
введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 78 или п. 79.

1/204

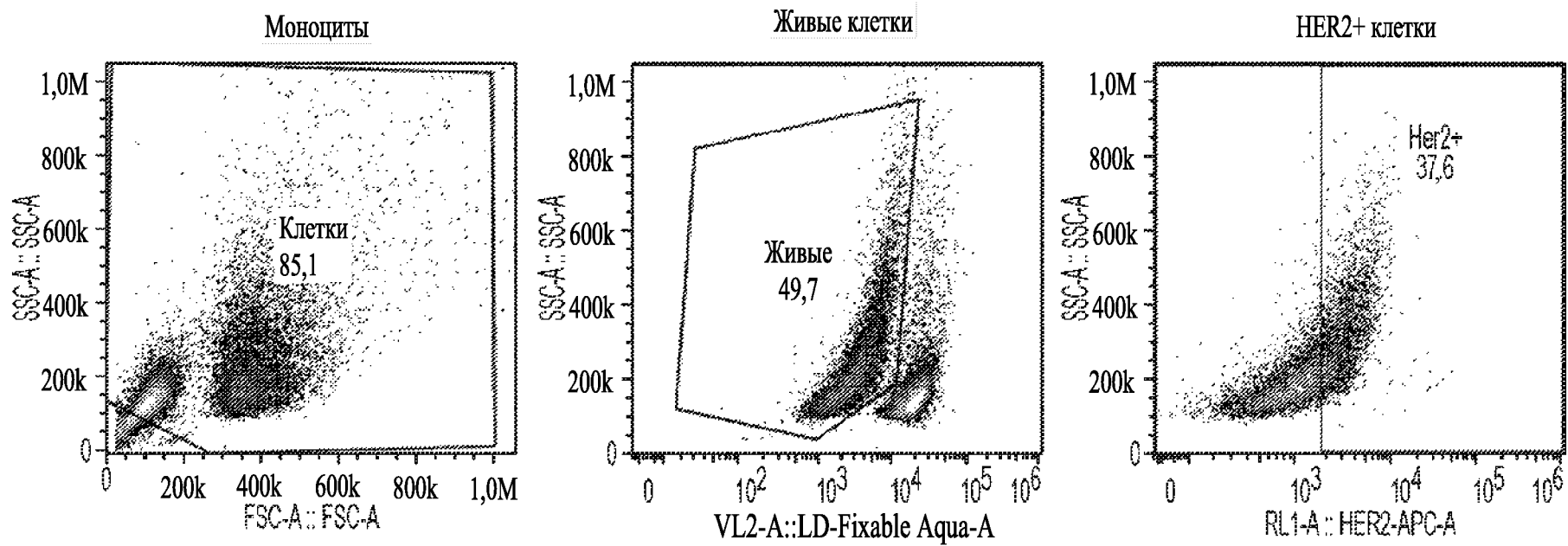


ФИГ. 1А

2/204

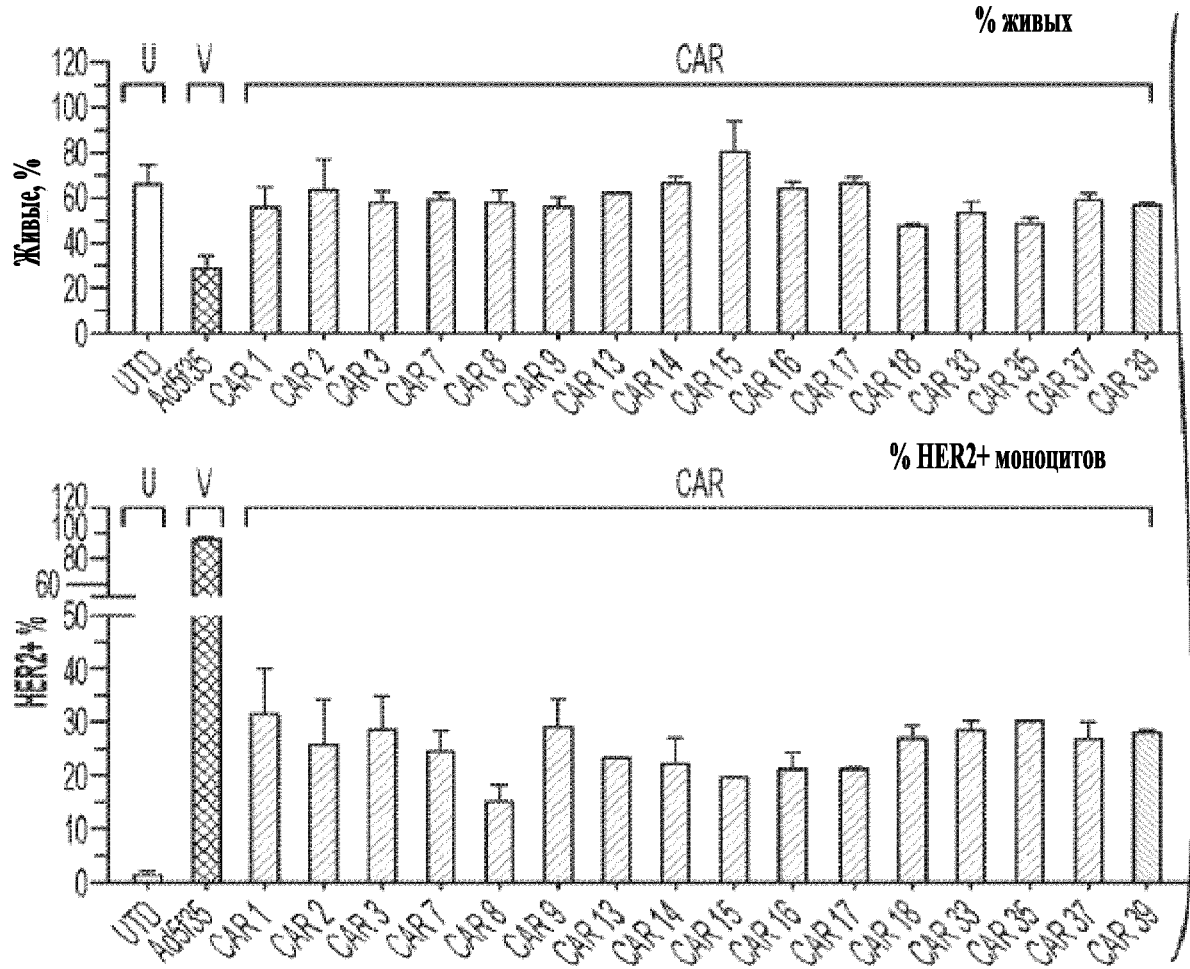


ФИГ. 1В

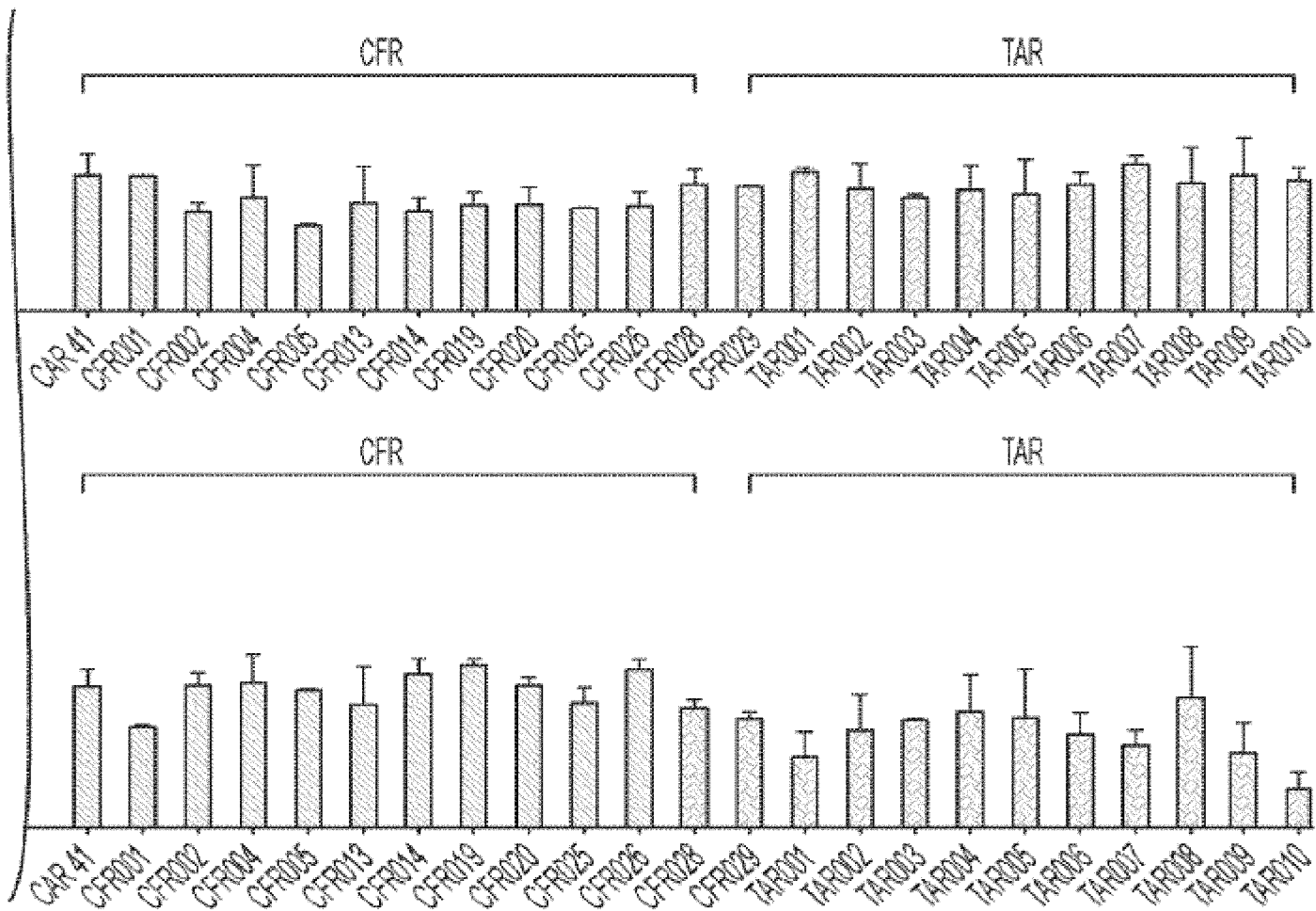


ФИГ. 2А

4/204



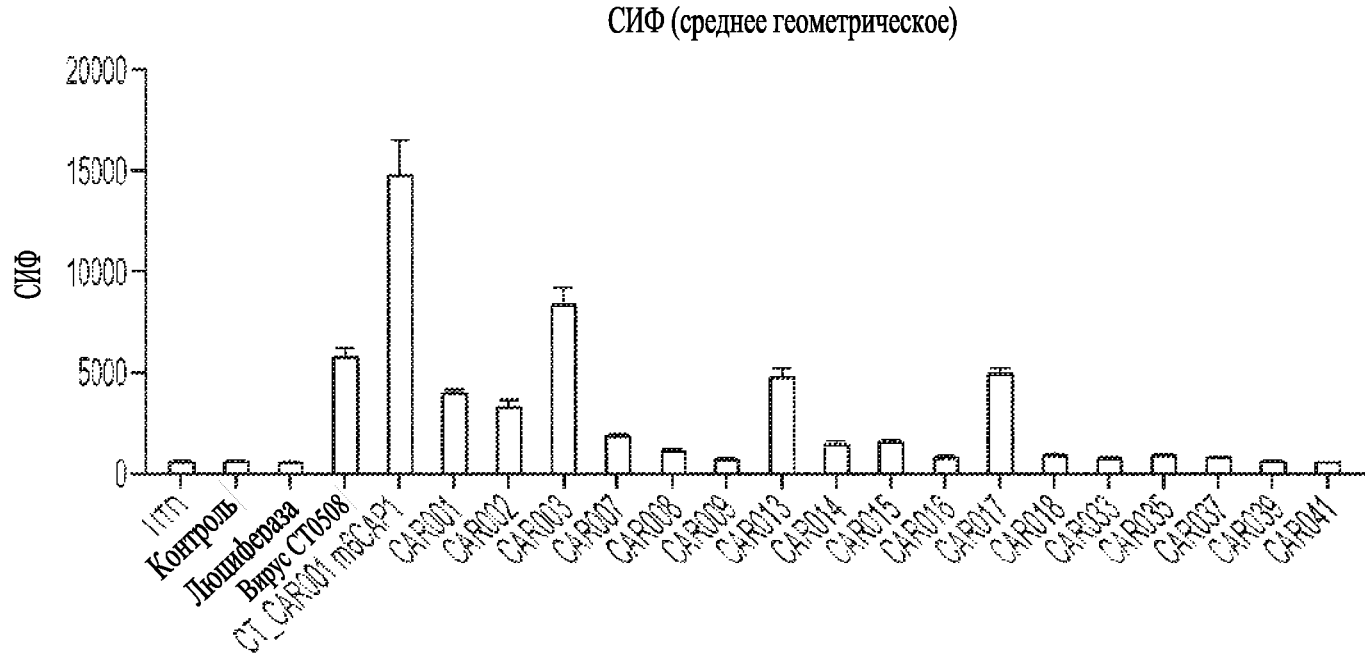
ФИГ. 2В



ФИГ. 2В

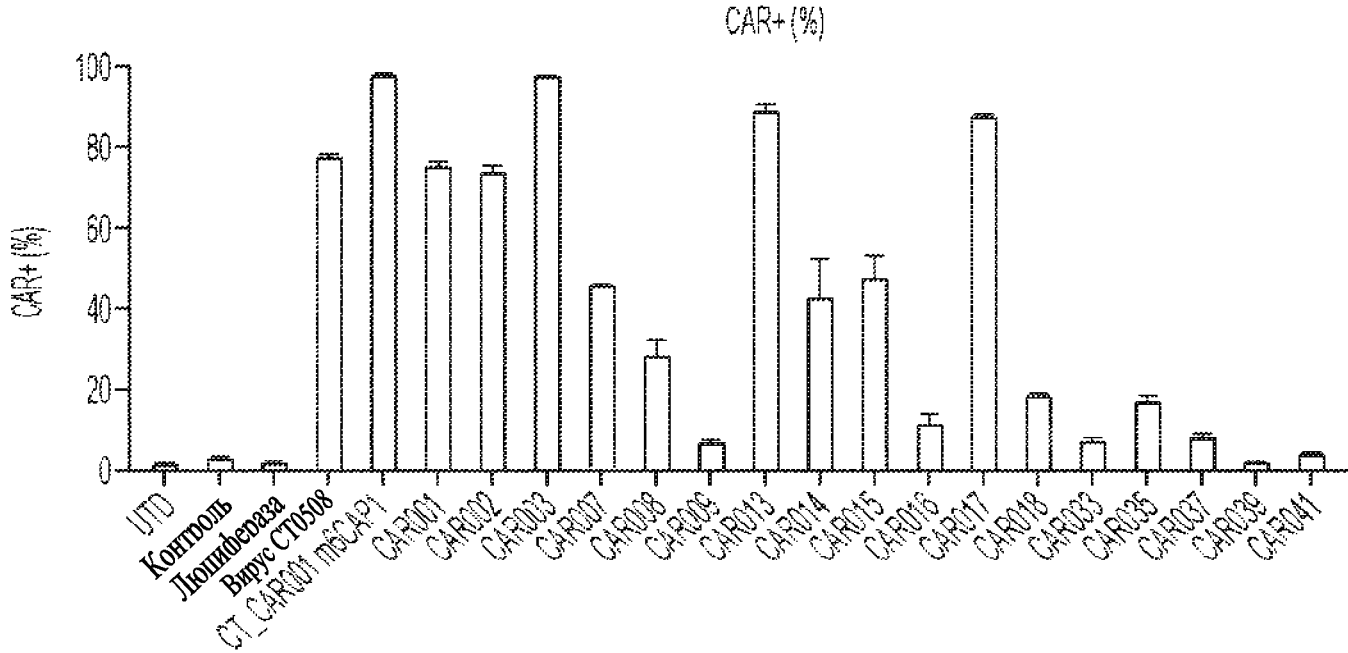
ПРОДОЛЖЕНИЕ

6/204



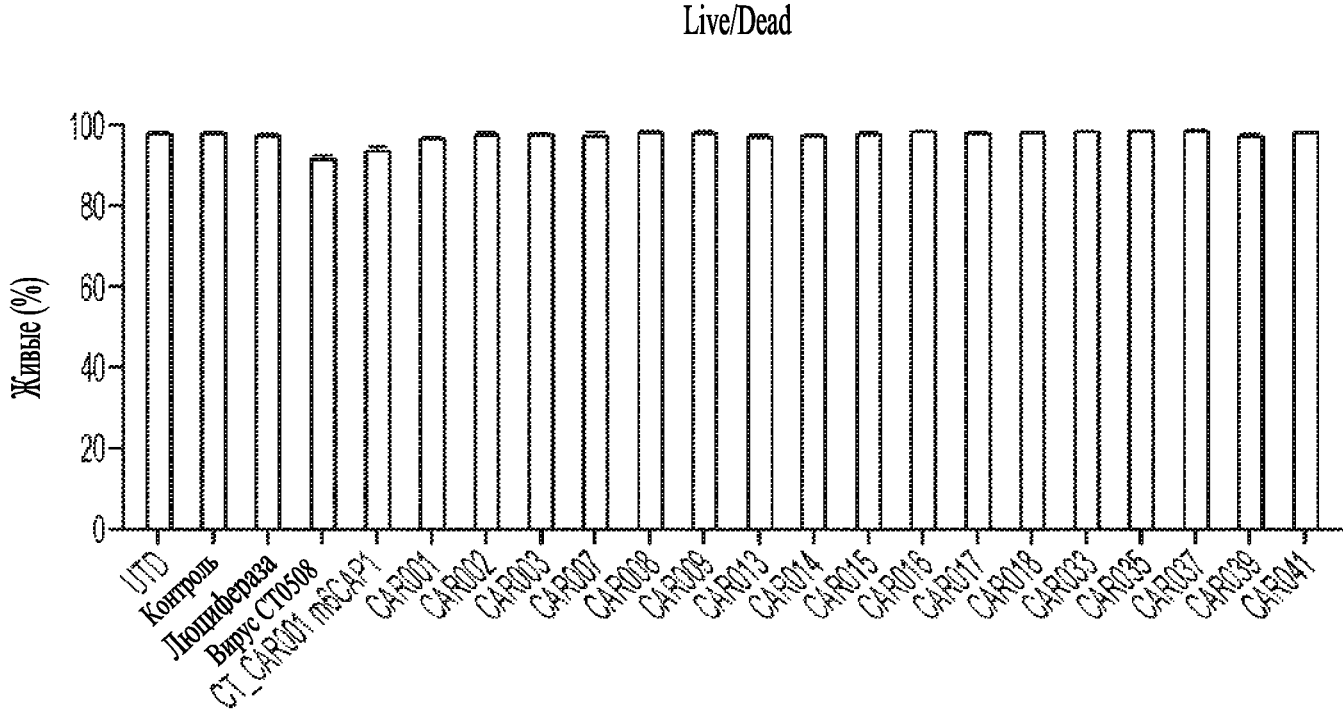
ФИГ. 3А

7/204



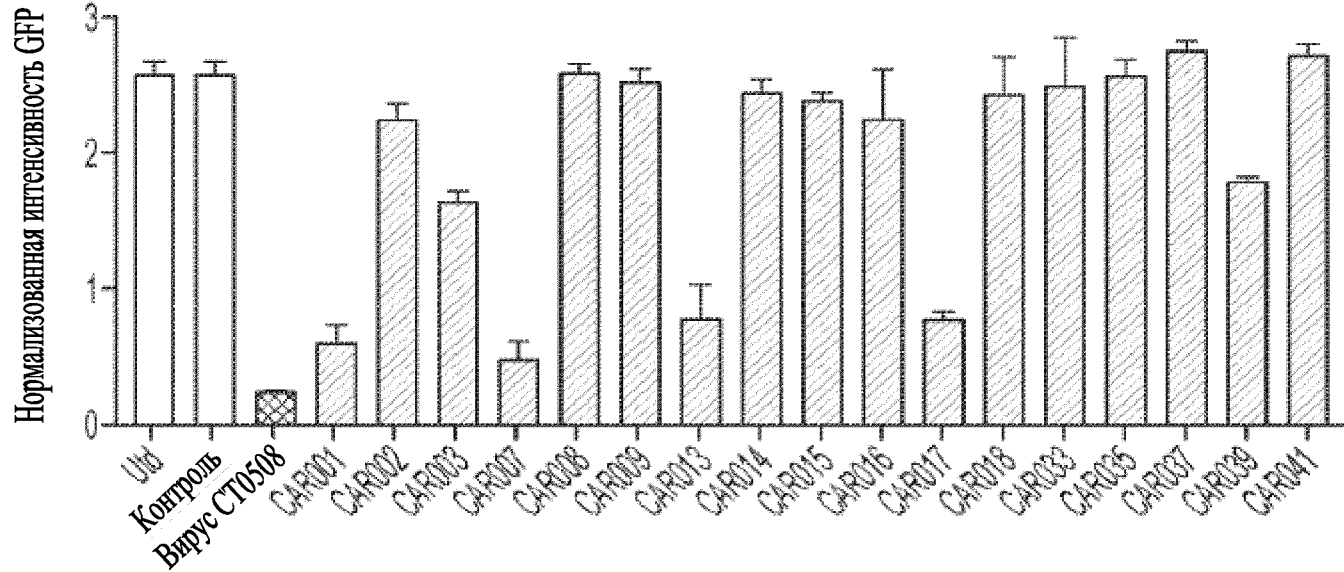
ФИГ. 3В

8/204



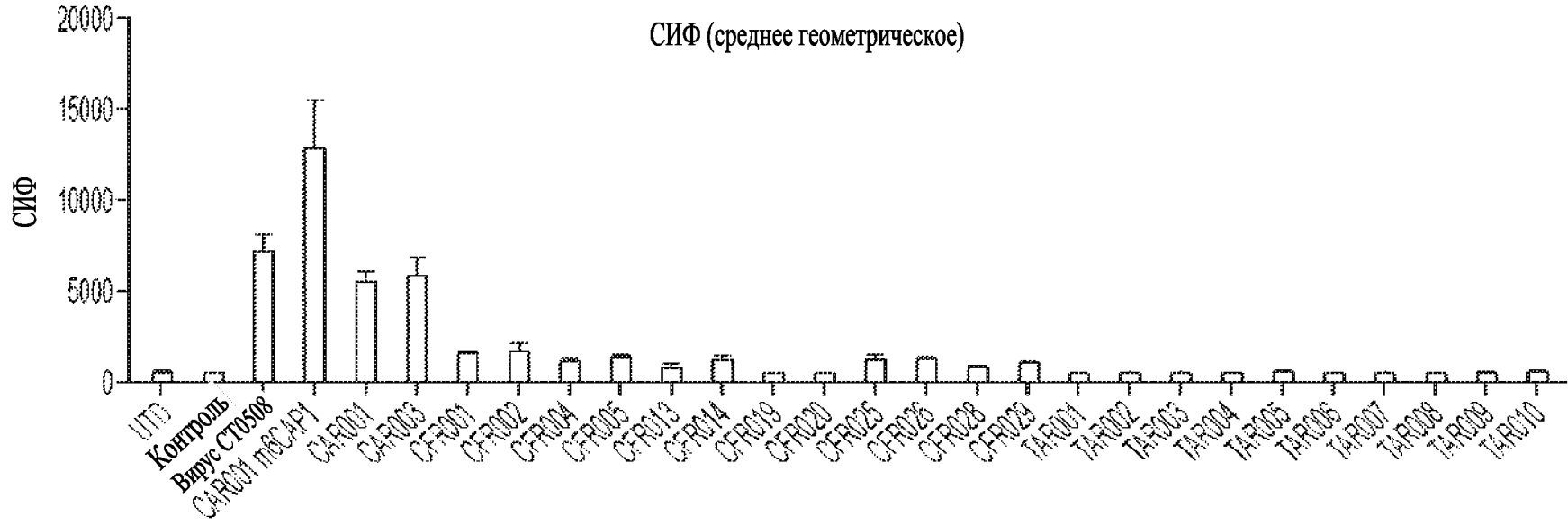
ФИГ. 3С

9/204



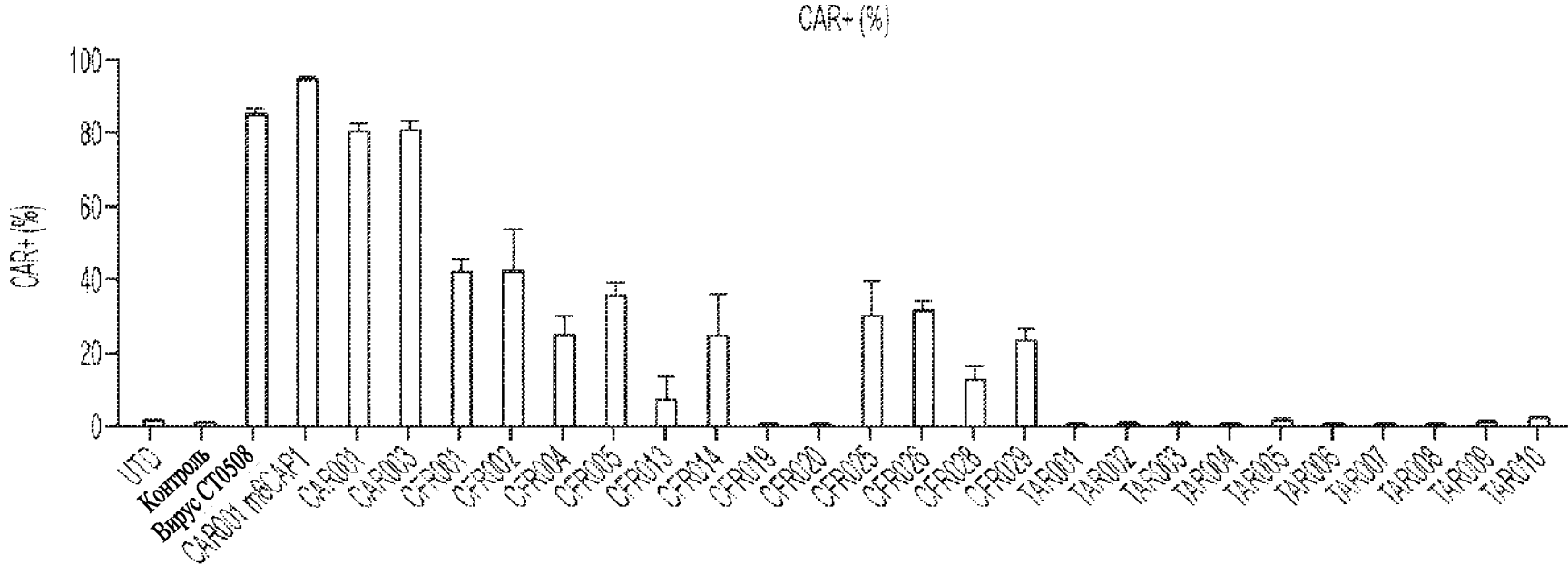
Фиг. 3D

10/204



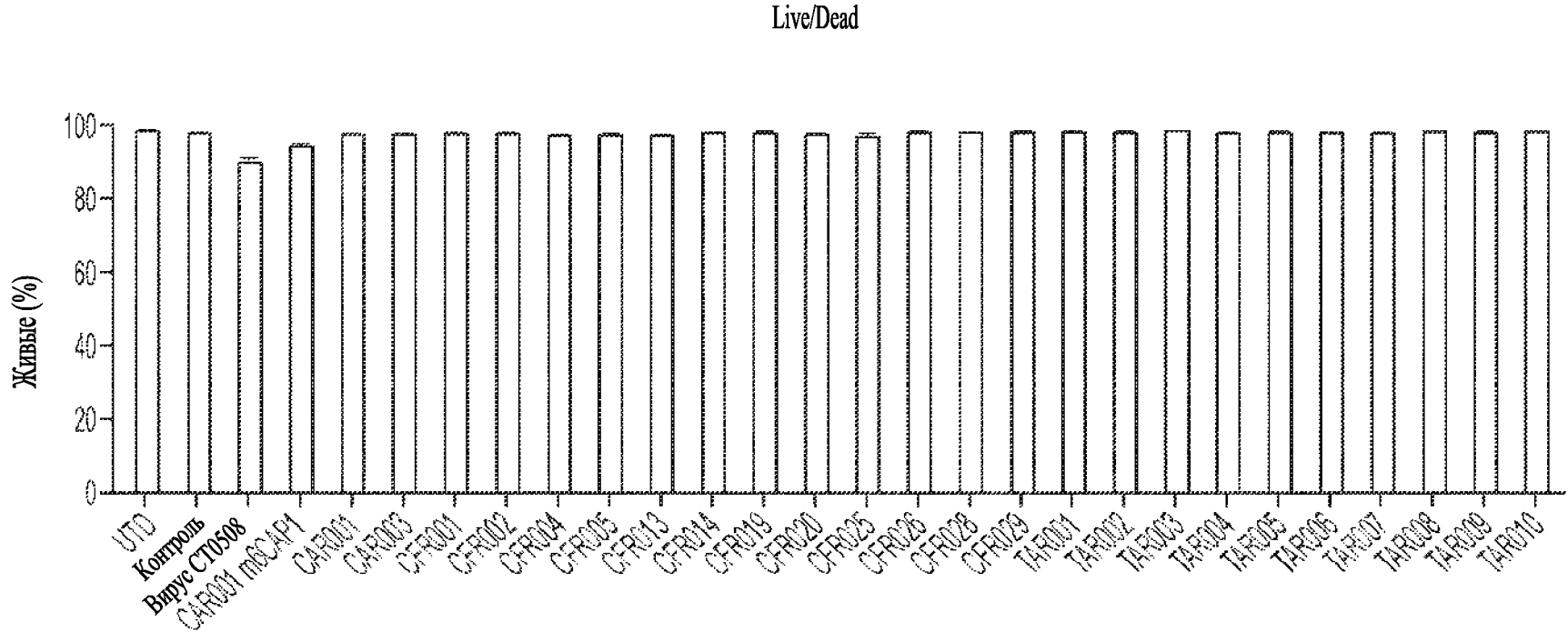
ФИГ. 4А

11/204



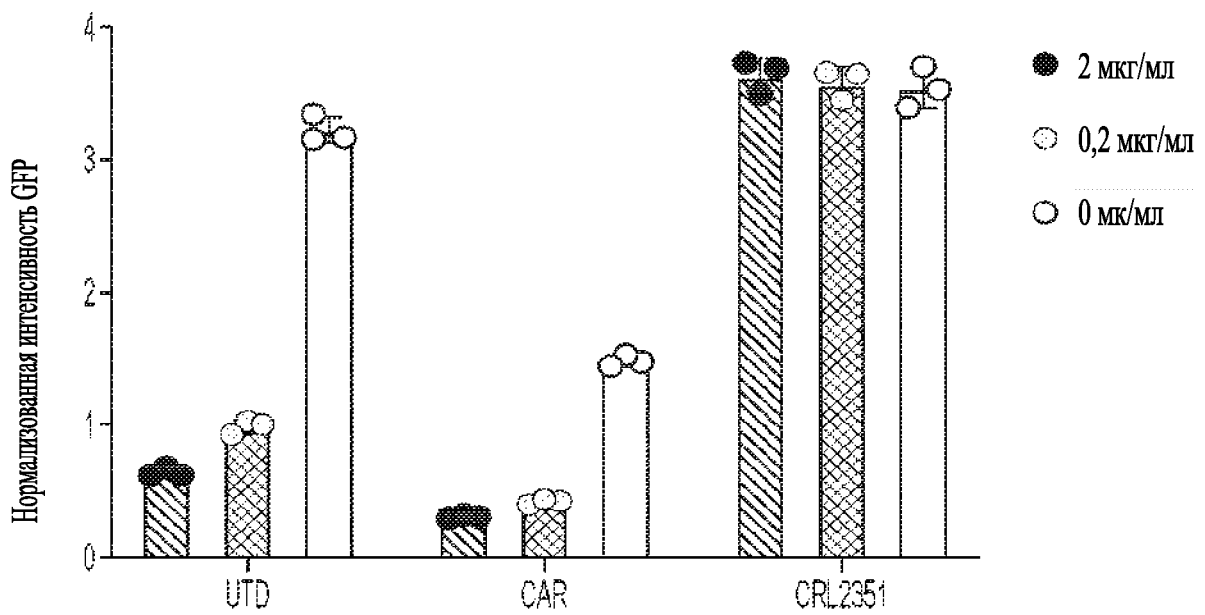
ФИГ. 4В

12/204

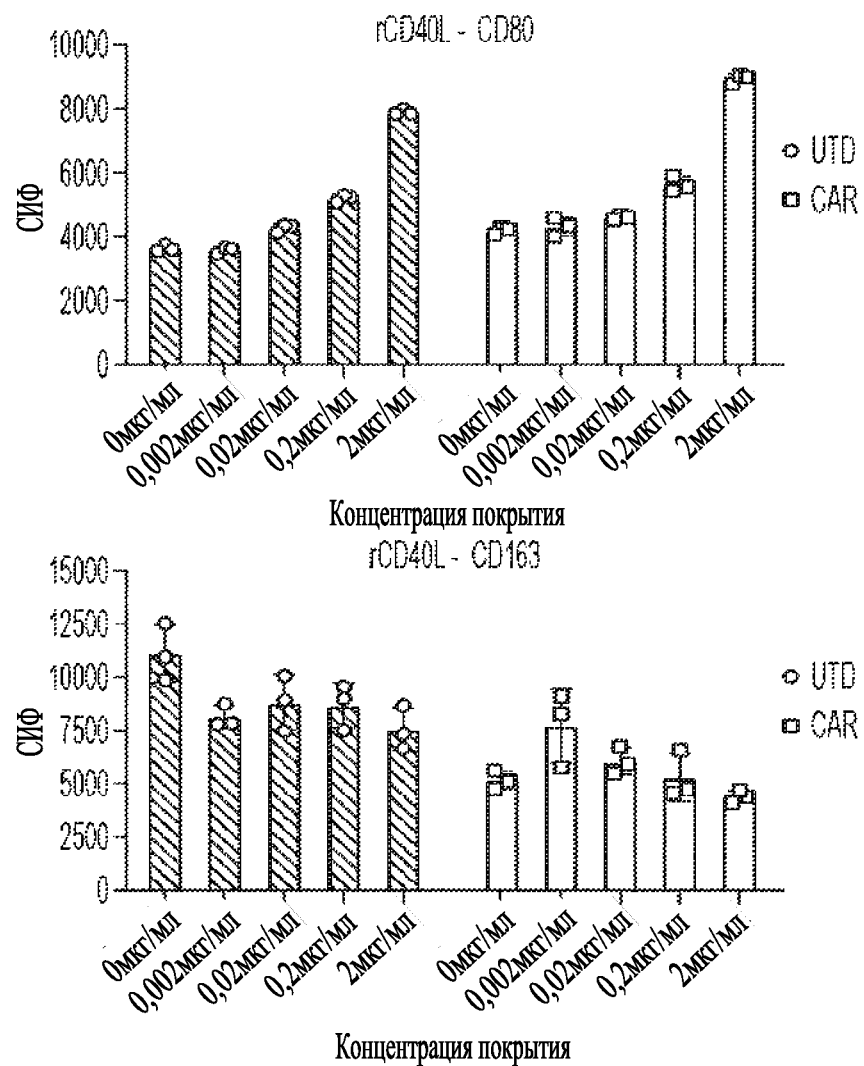


ФИГ. 4С

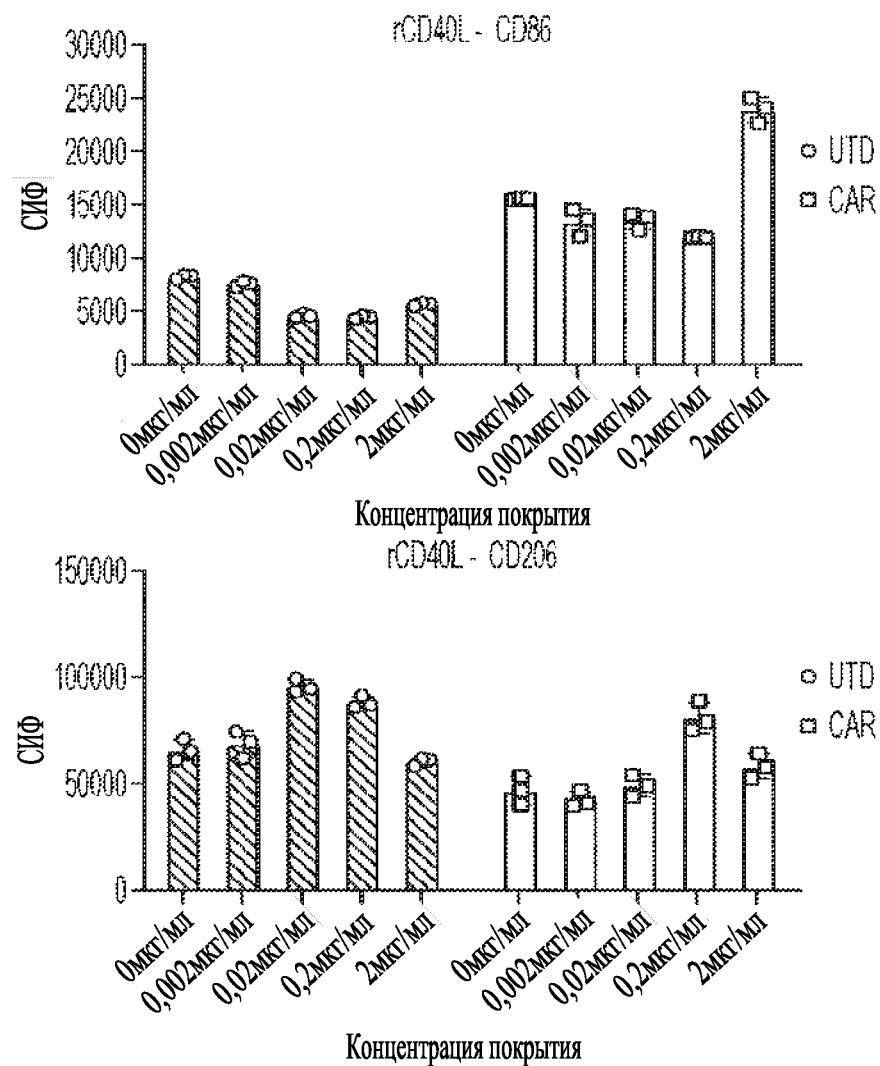
13/204



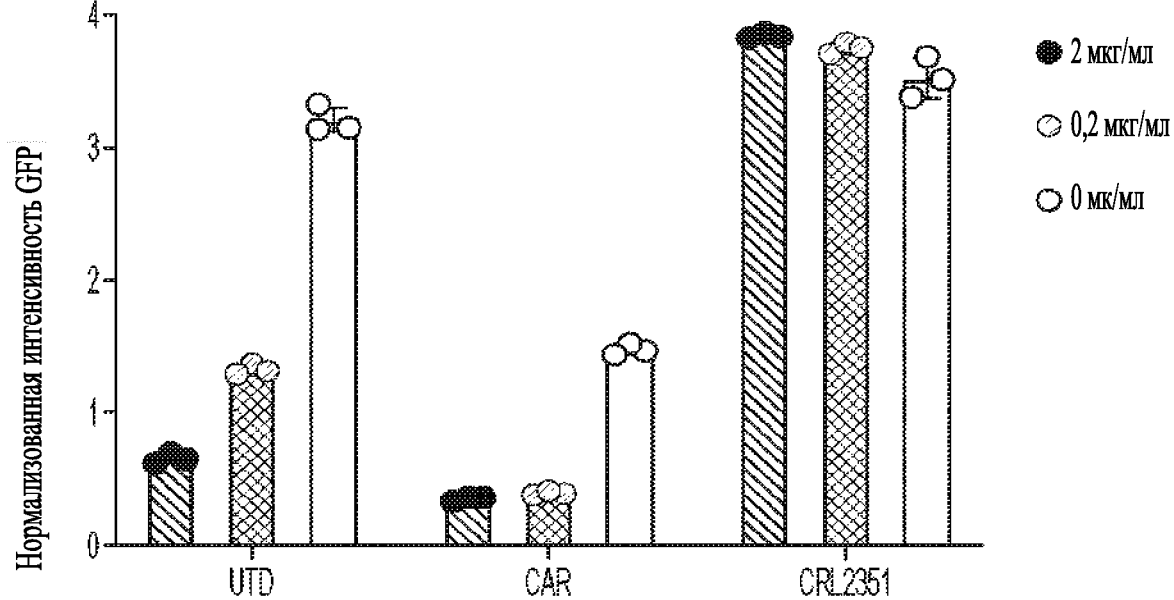
ФИГ. 5А



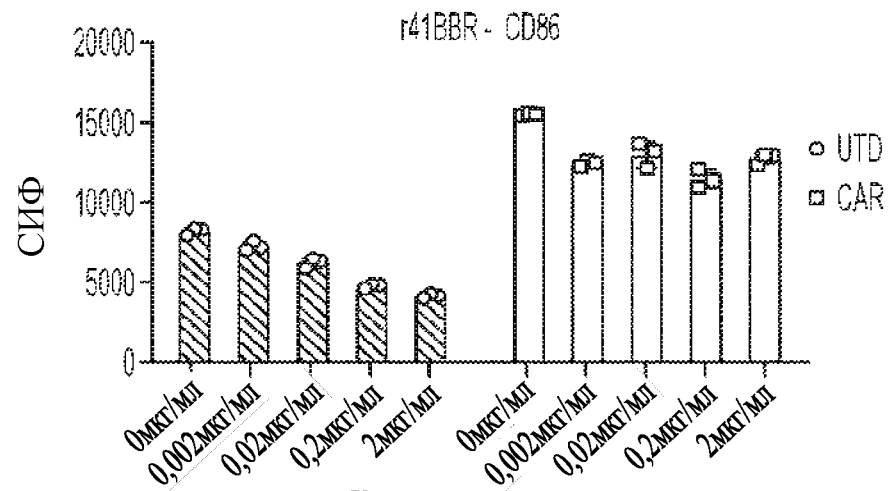
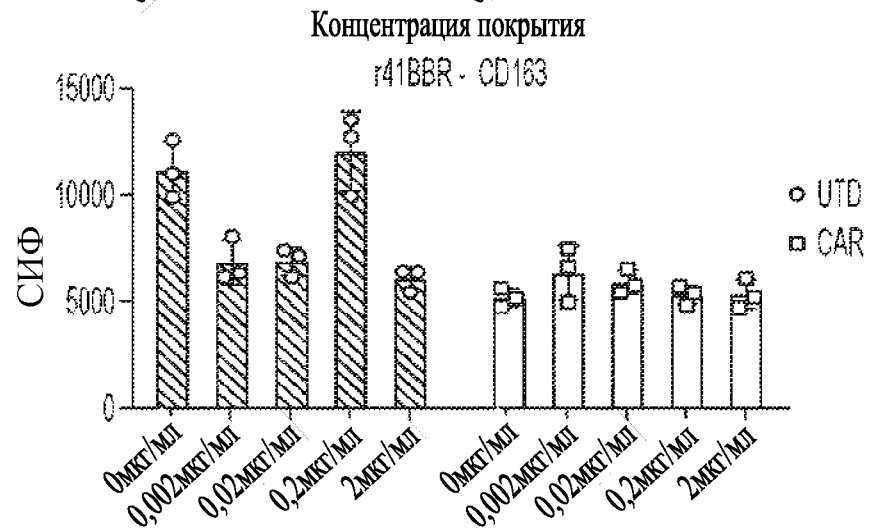
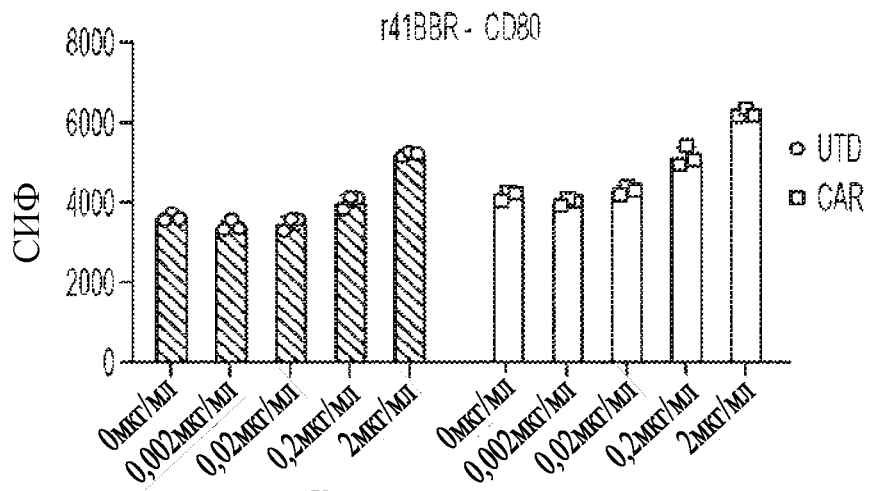
ФИГ. 5В



15/204

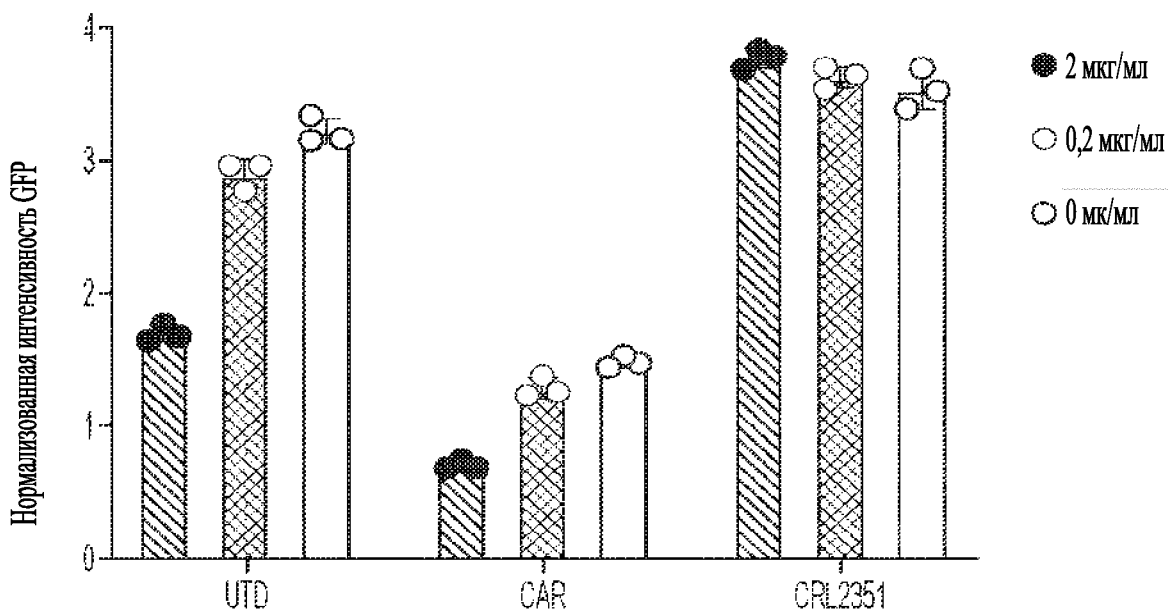


Фиг. 6А

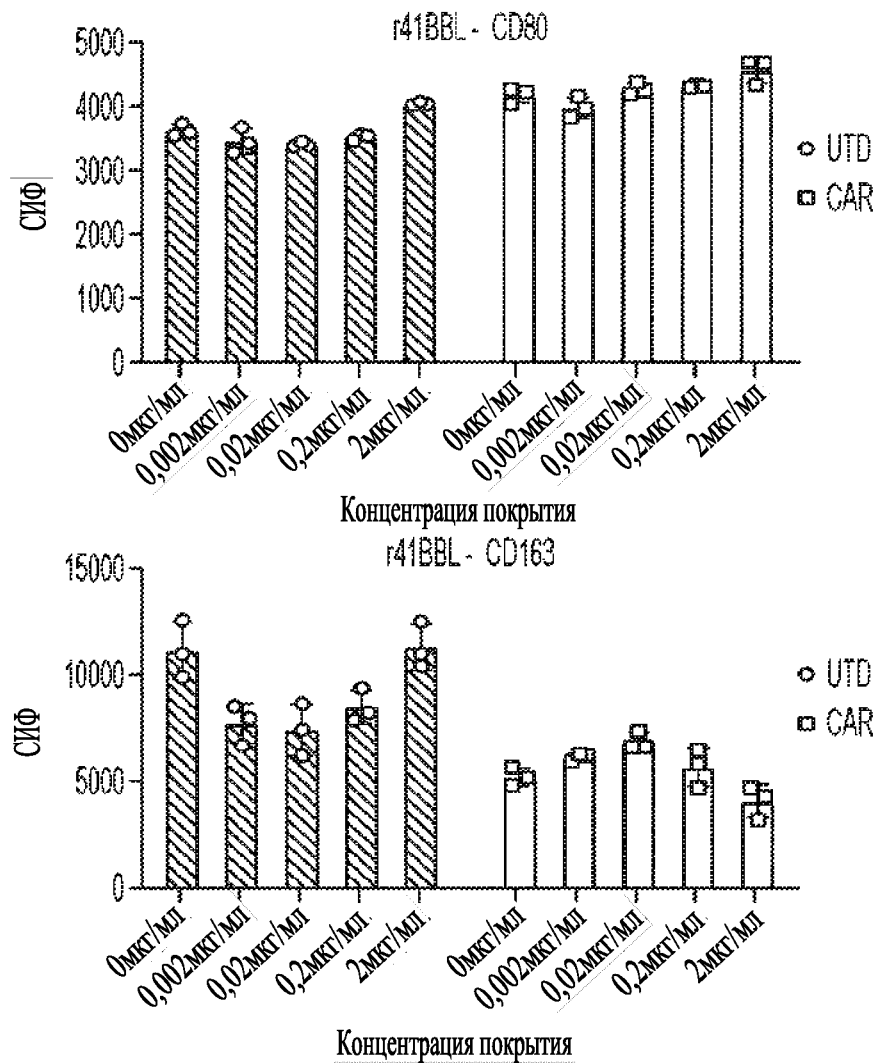


ФИГ. 6В

17/204

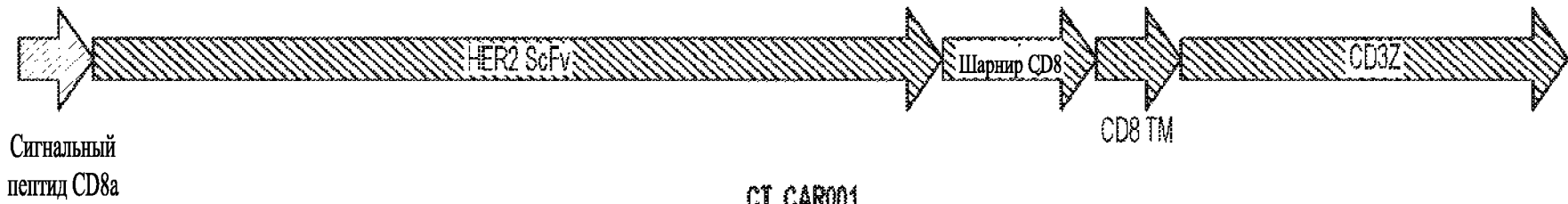


ФИГ. 7А



ФИГ. 7В

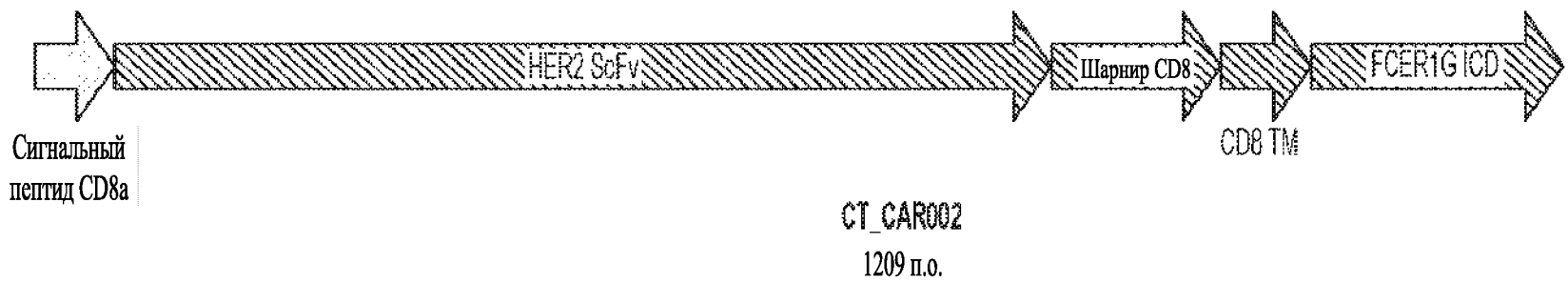
19/204



CT_CAR001
1347 п.о.

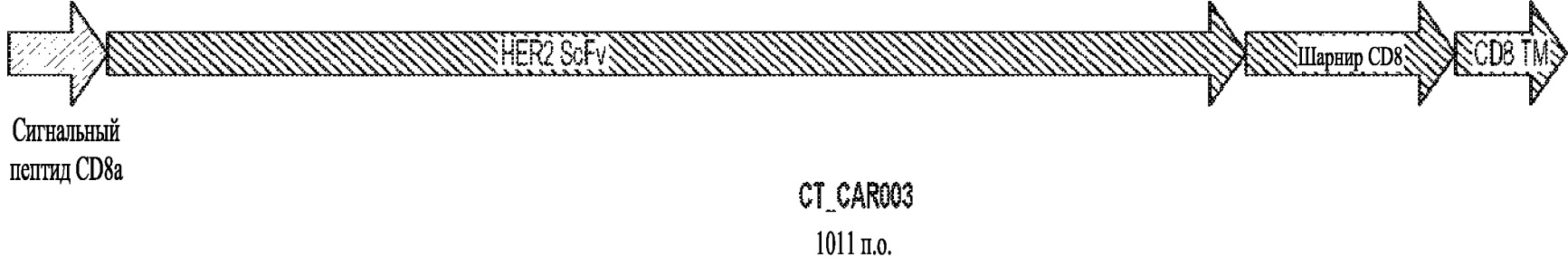
ФИГ. 8

20/204



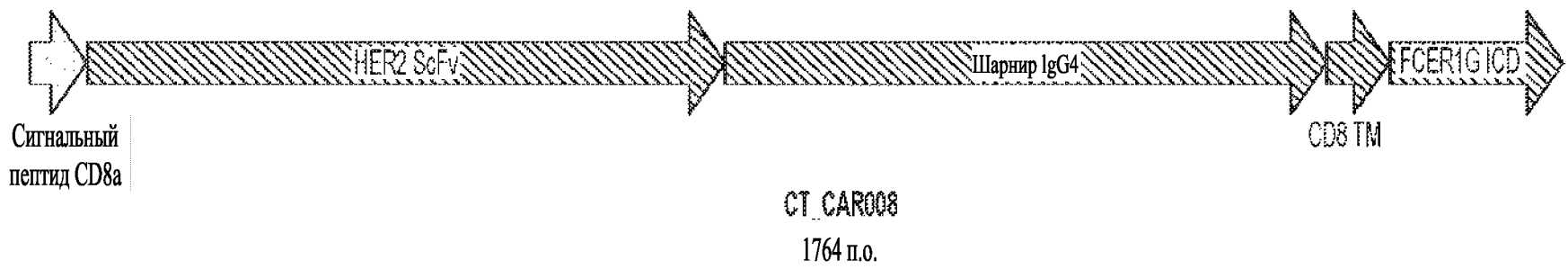
ФИГ. 9

21/204

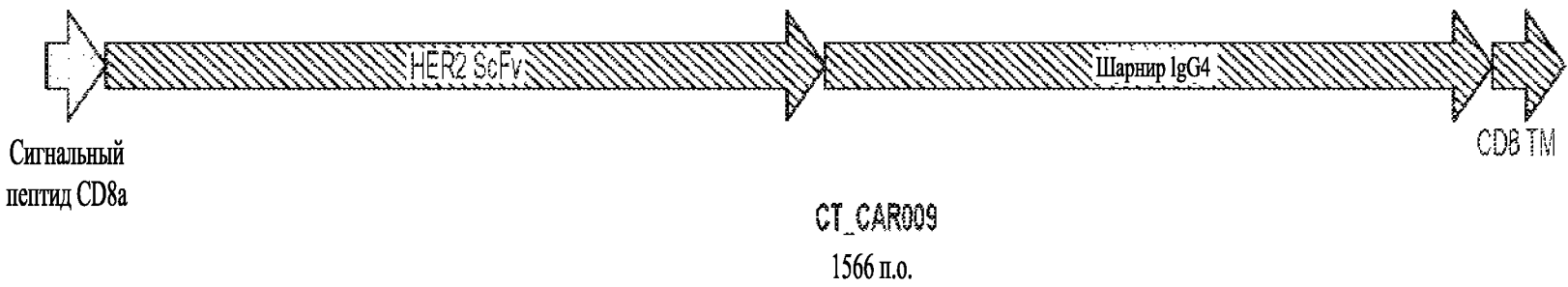


ФИГ. 10

22/204

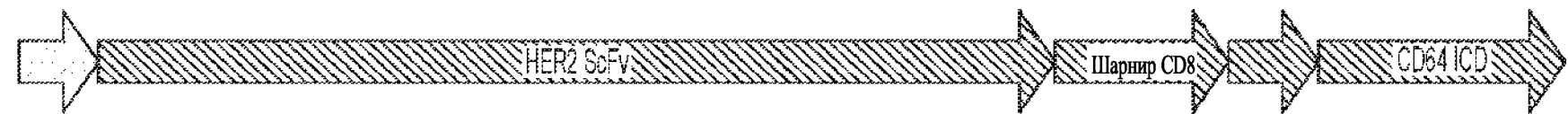


ФИГ. 11



ФИГ. 12

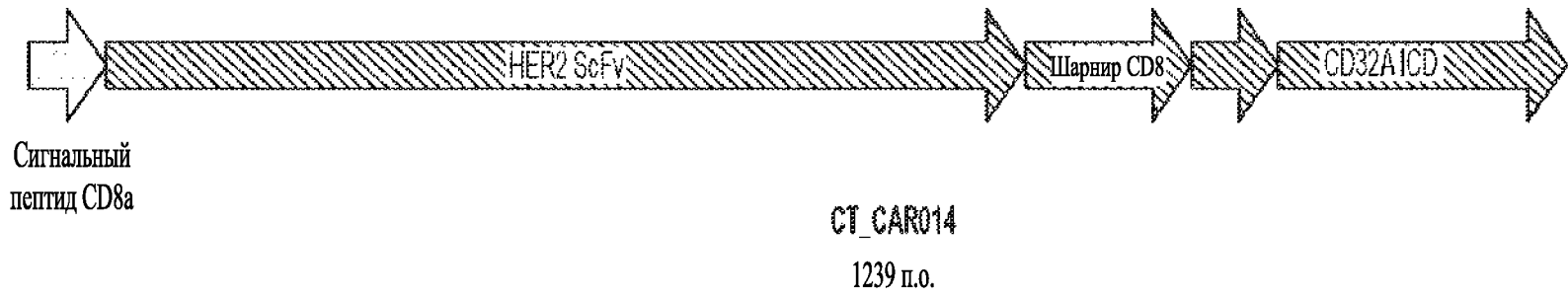
24/204



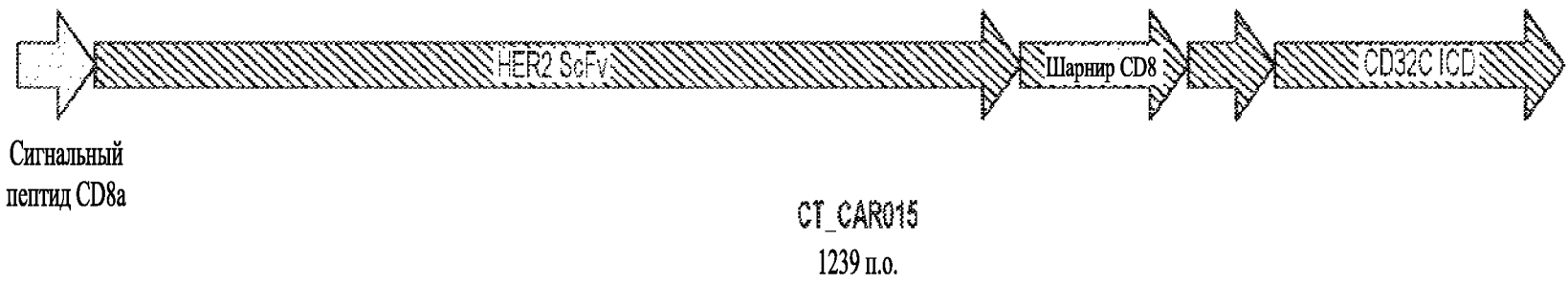
CT_CAR013
1197 п.о.

ФИГ. 13

25/204

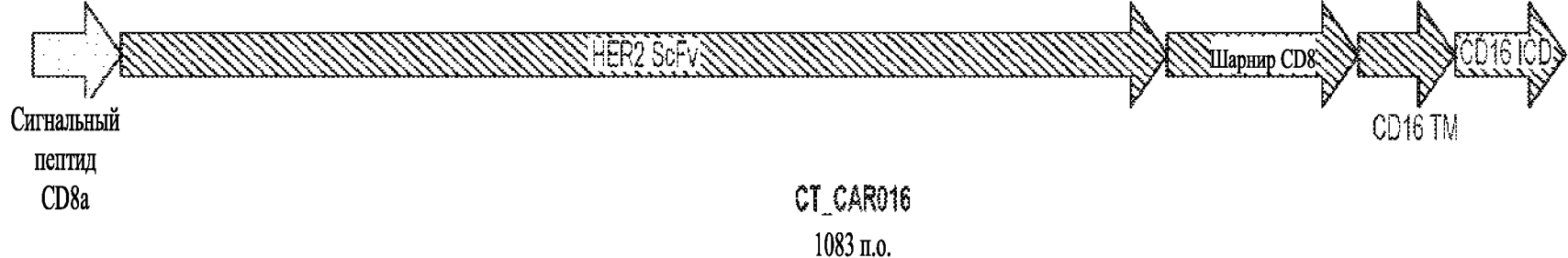


ФИГ. 14



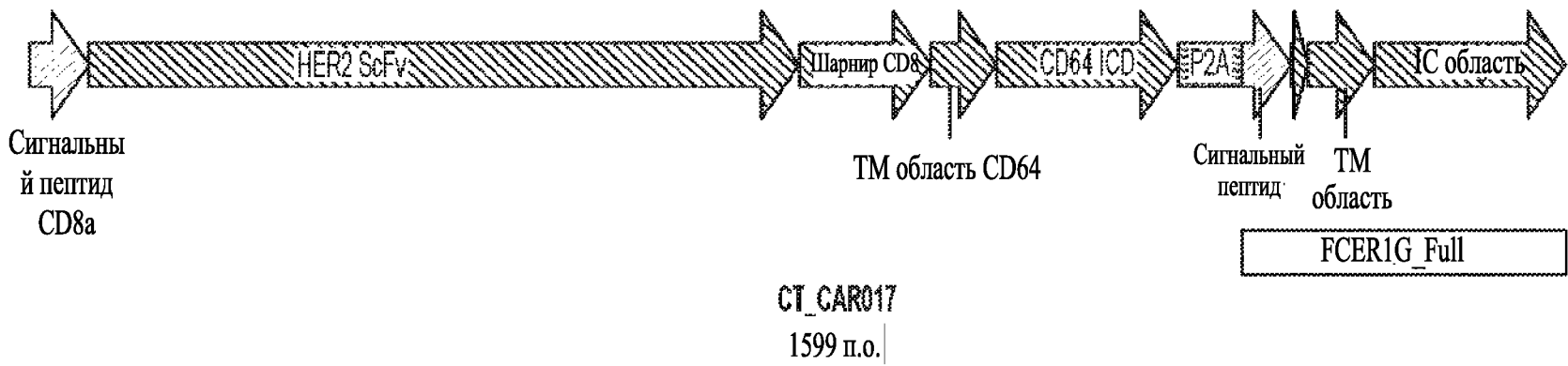
ФИГ. 15

27/204



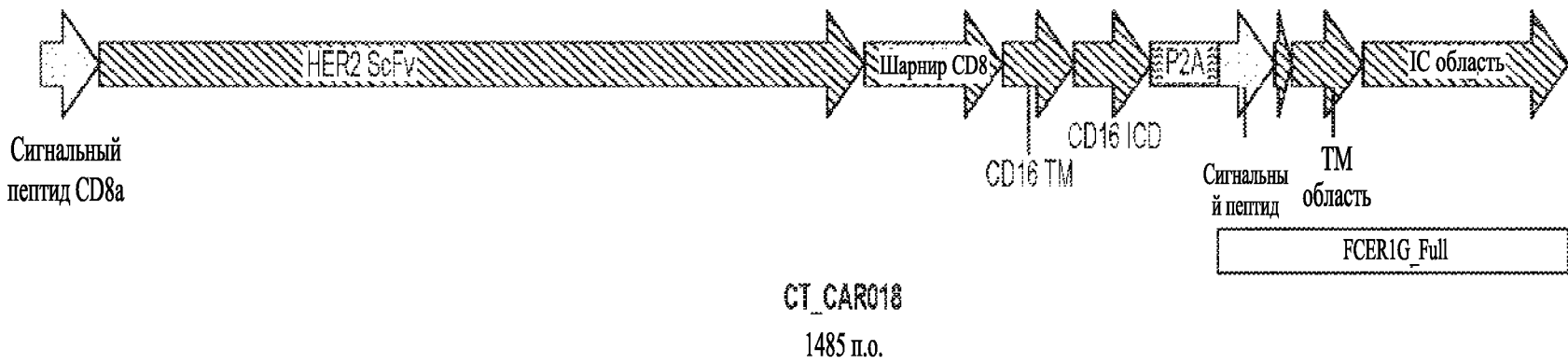
ФИГ. 16

28/204



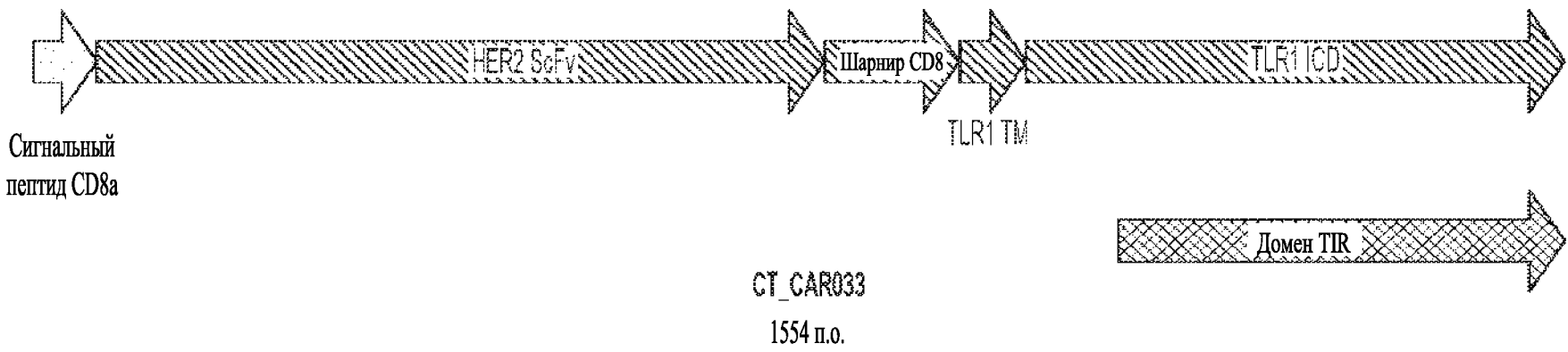
ФИГ. 17

29/204

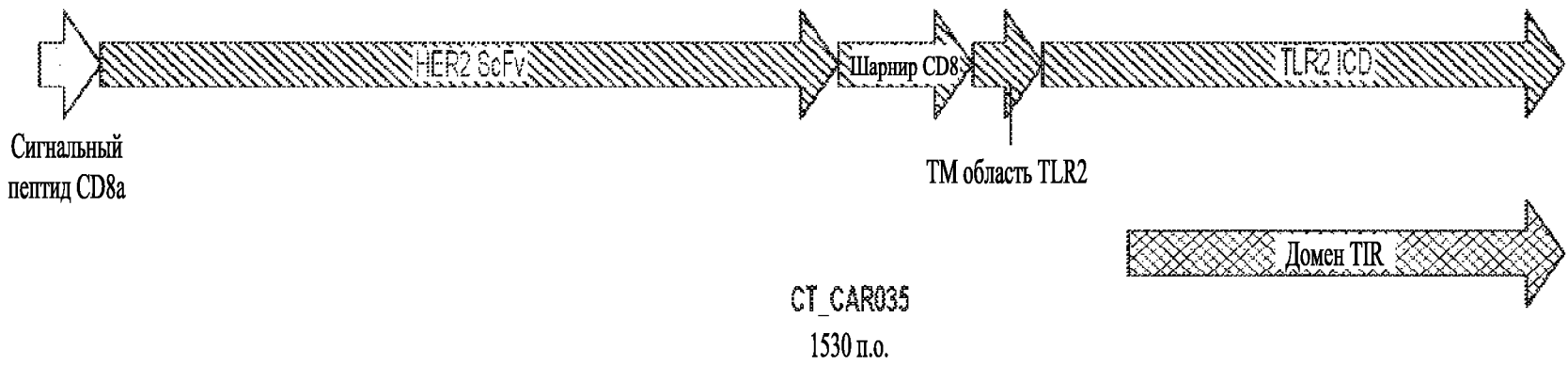


ФИГ. 18

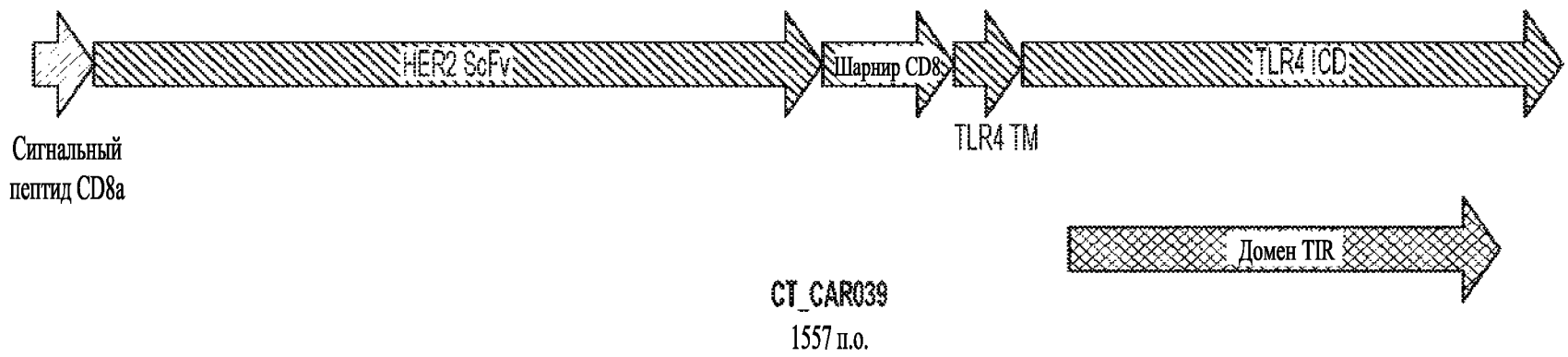
30/204



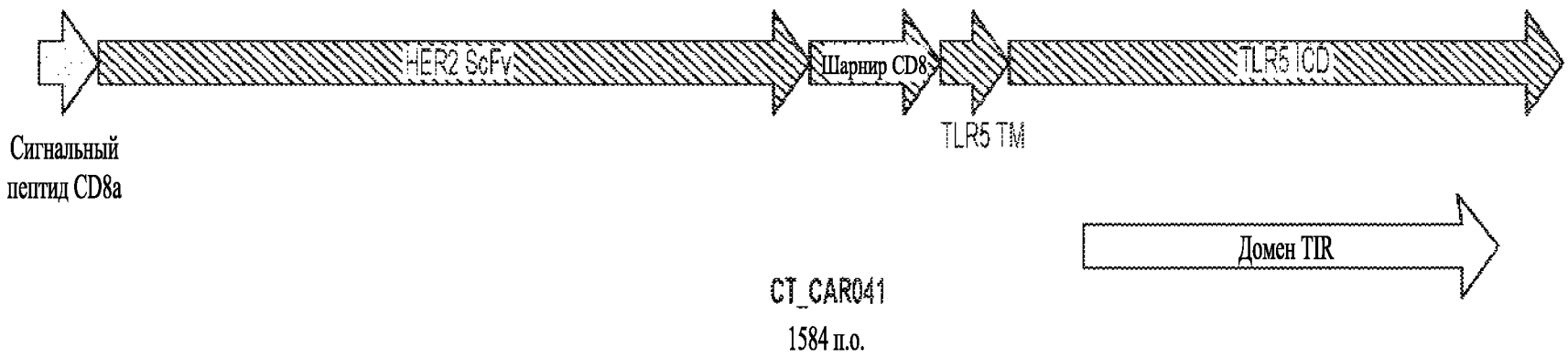
ФИГ. 19



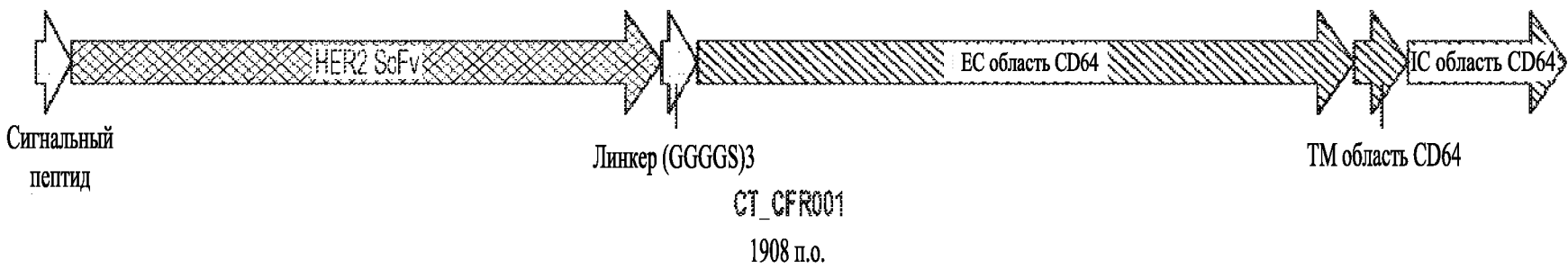
ФИГ. 20



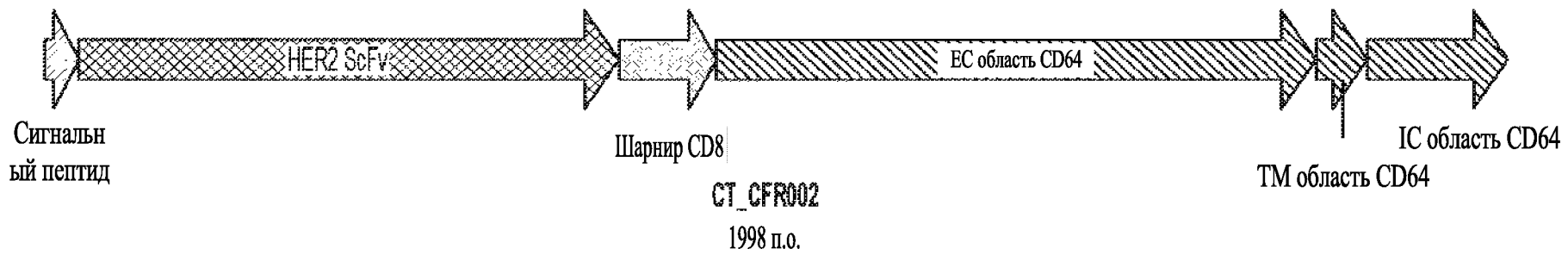
ФИГ. 21



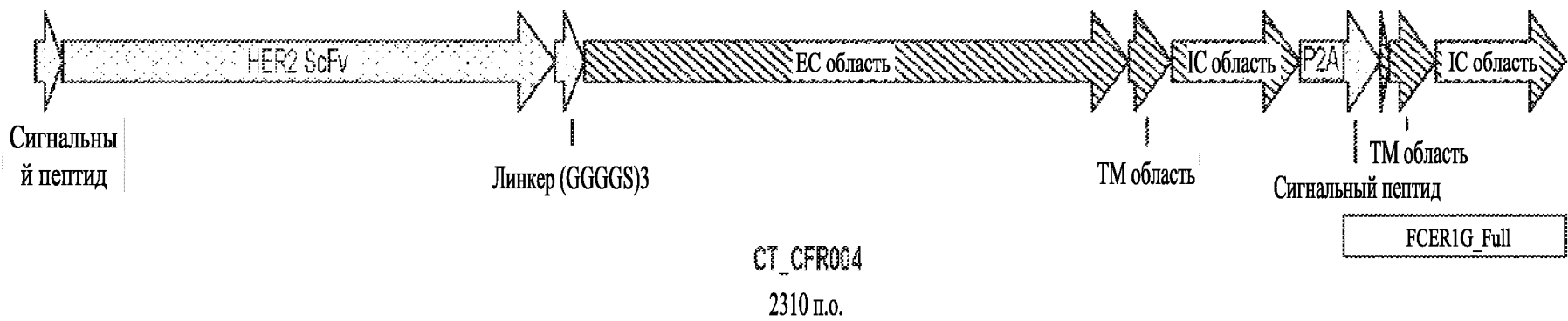
ФИГ. 22



ФИГ. 23



ФИГ. 24



ФИГ. 25

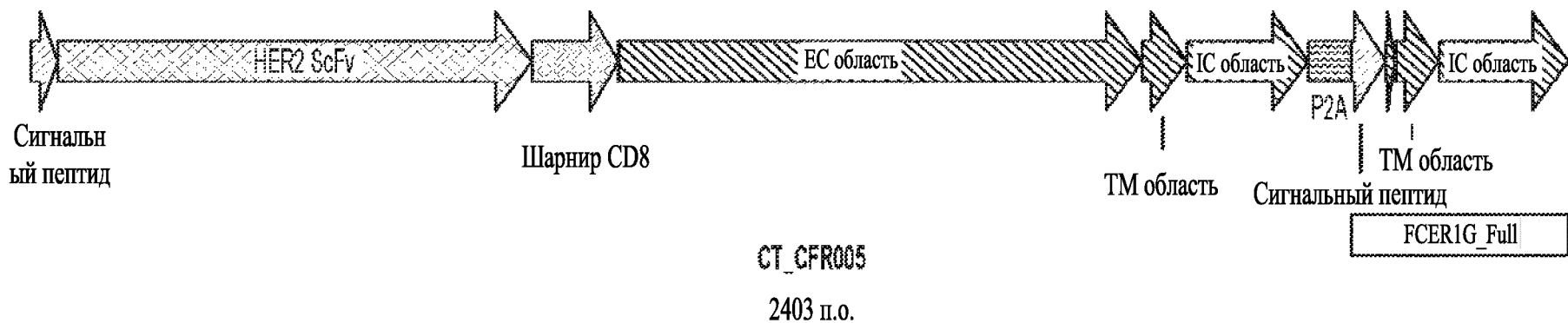
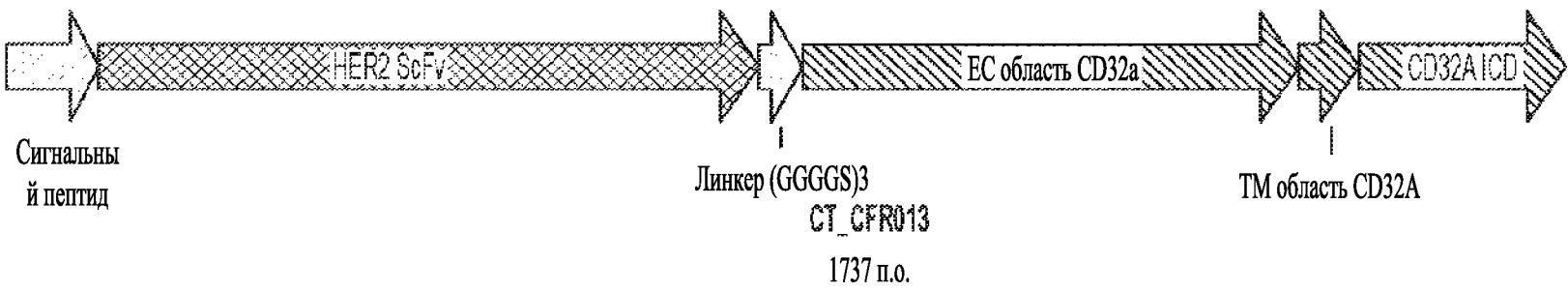
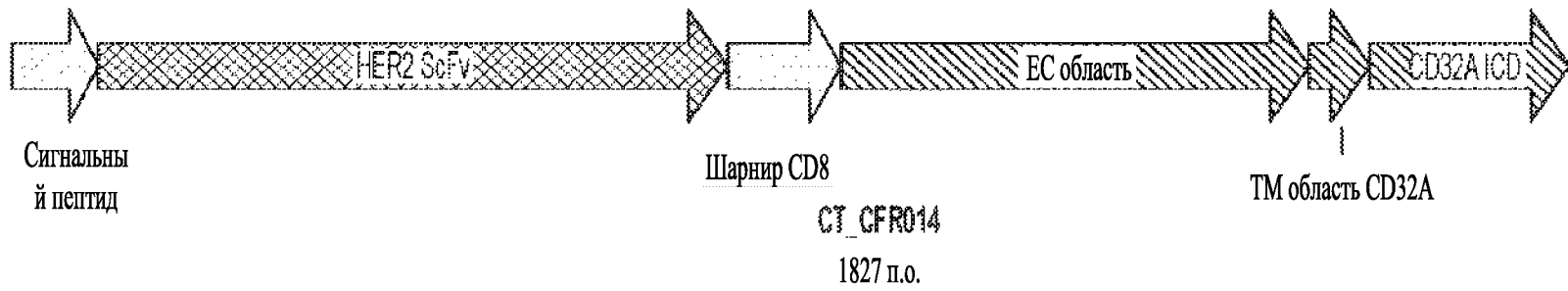


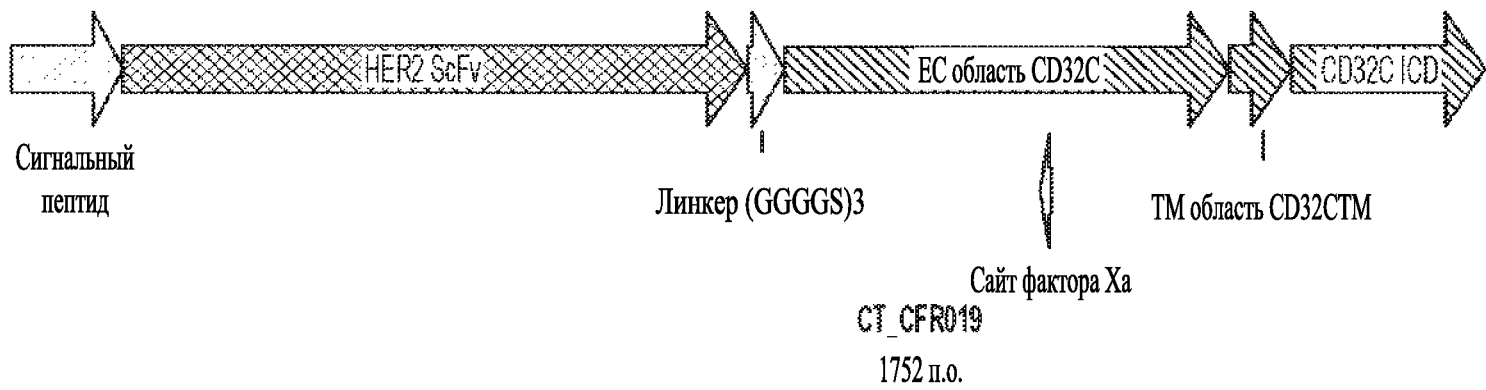
FIG.26



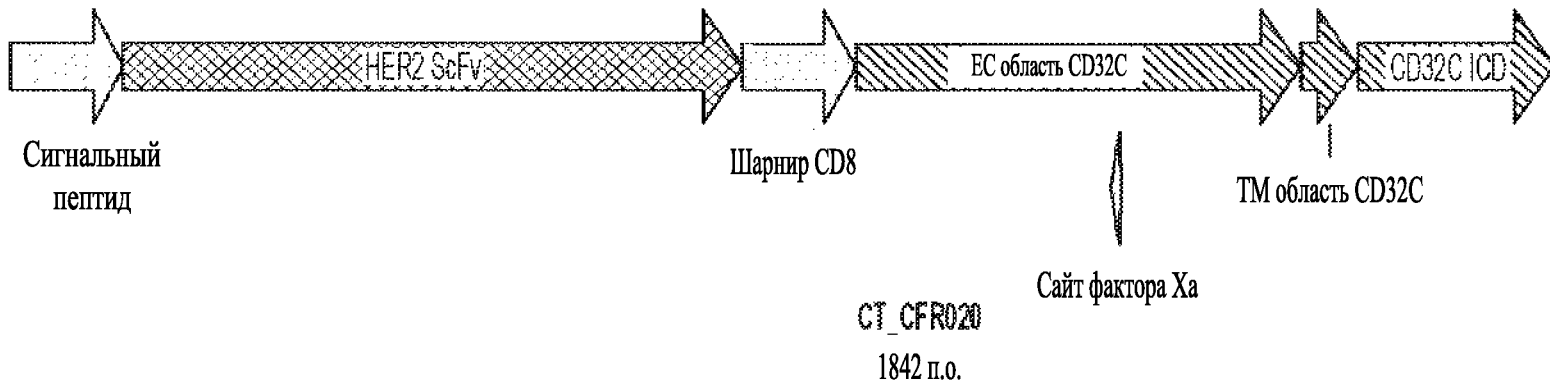
ФИГ. 27



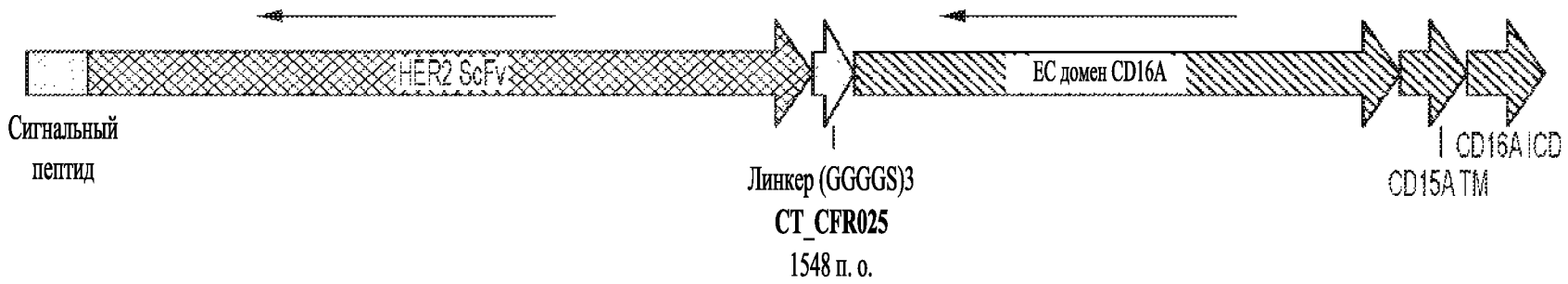
ФИГ. 28



ФИГ. 29



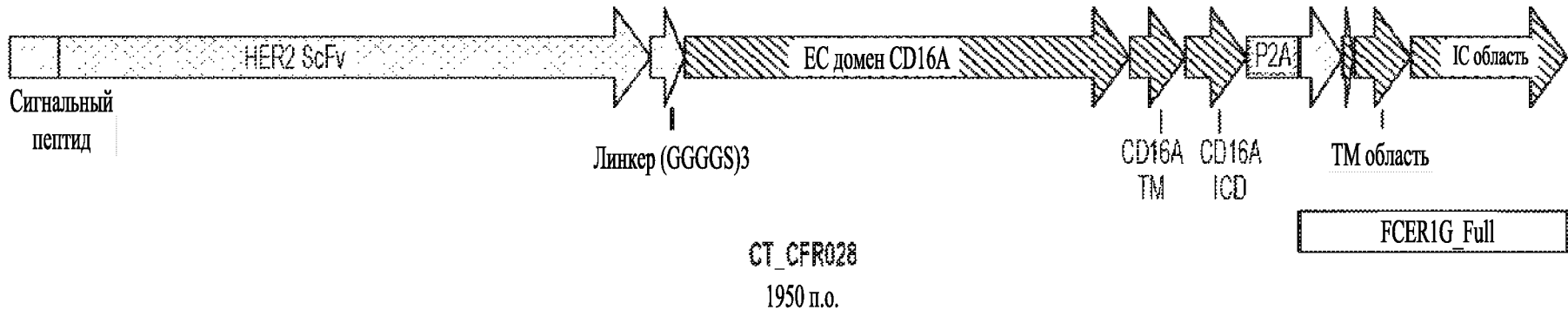
ФИГ. 30



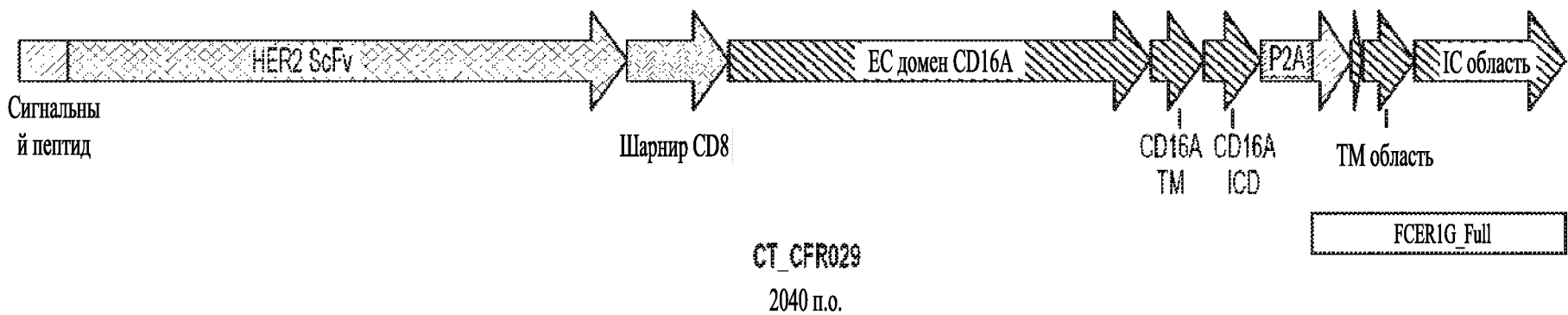
ФИГ. 31



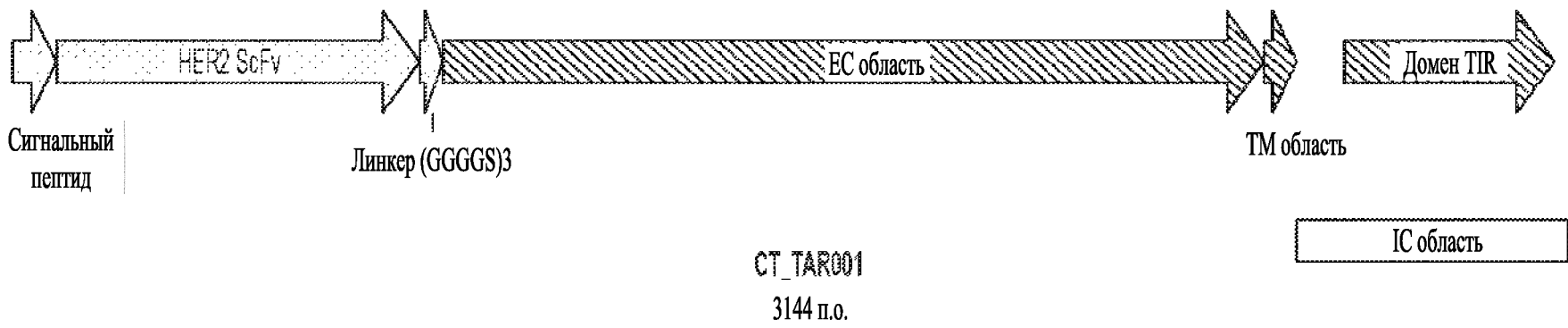
ФИГ. 32



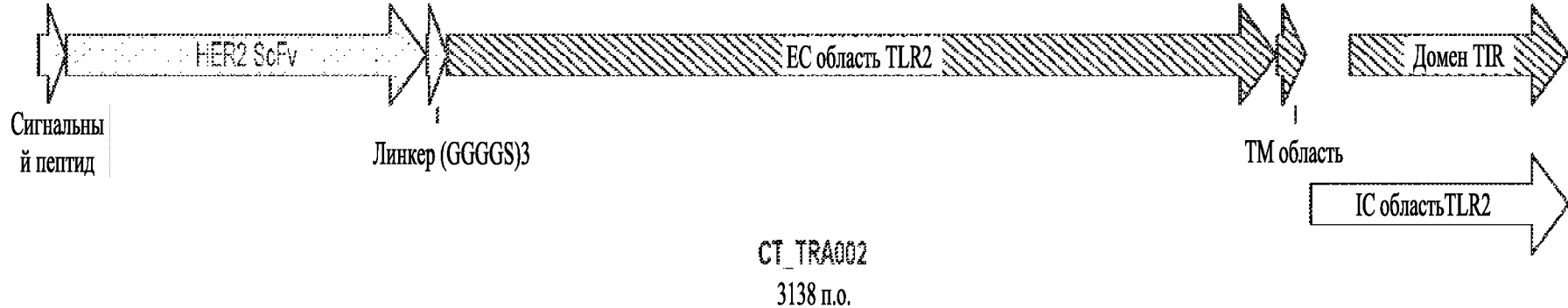
ФИГ. 33



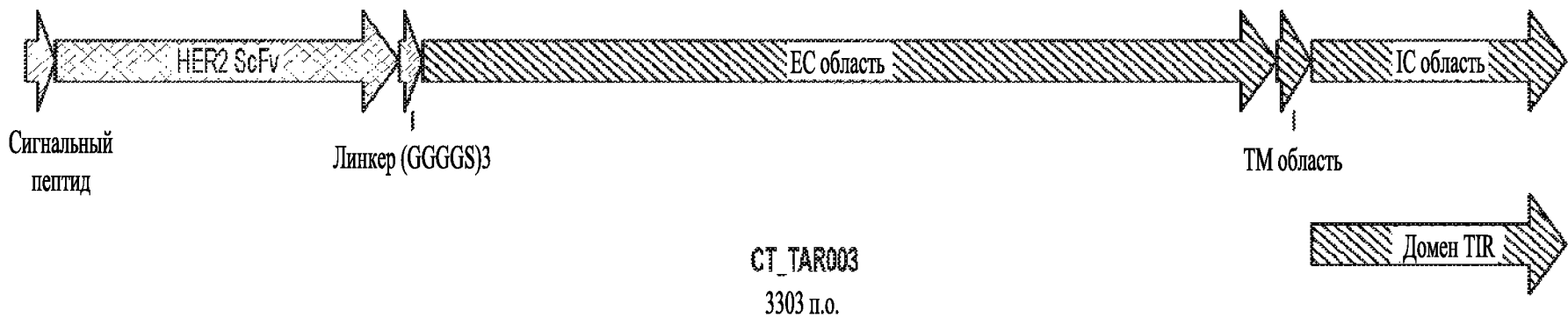
ФИГ. 34



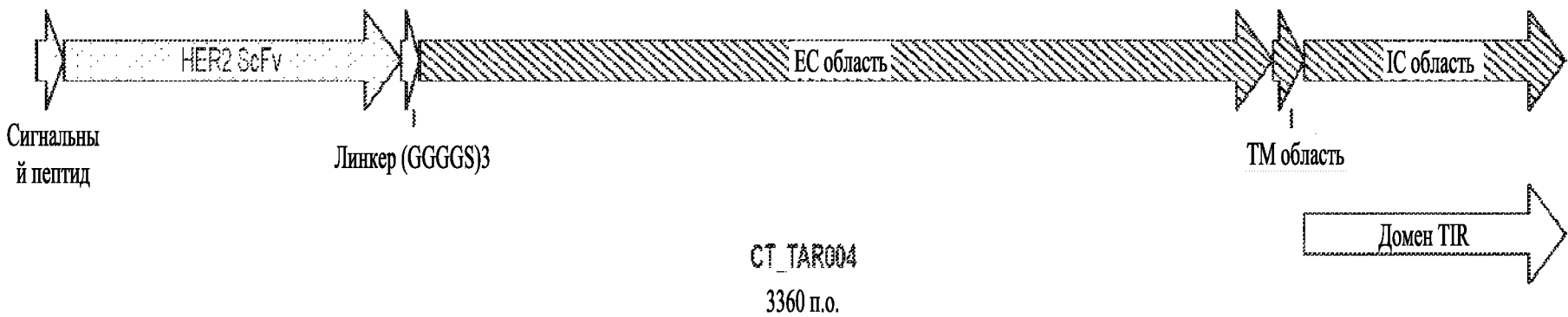
ФИГ. 35



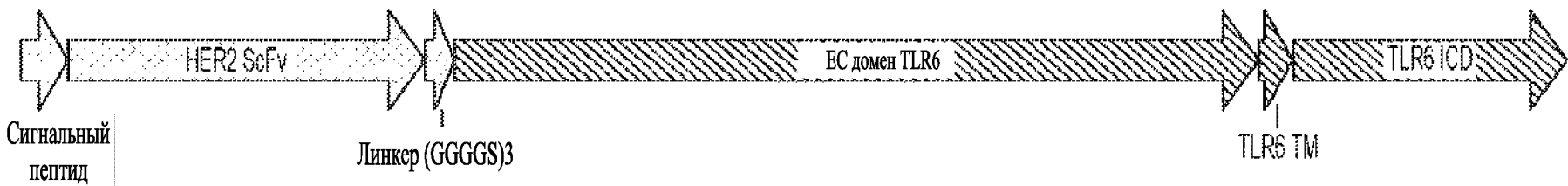
ФИГ. 36



ФИГ. 37

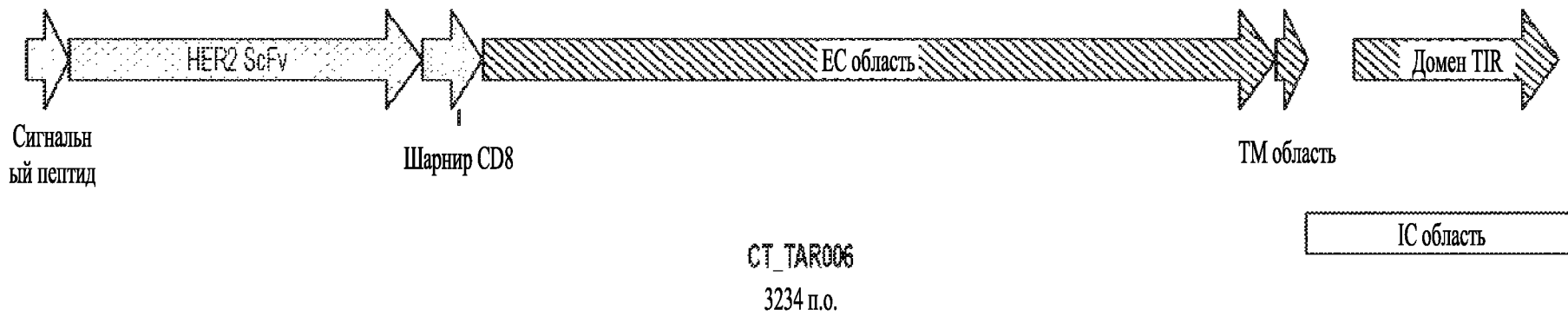


ФИГ. 38

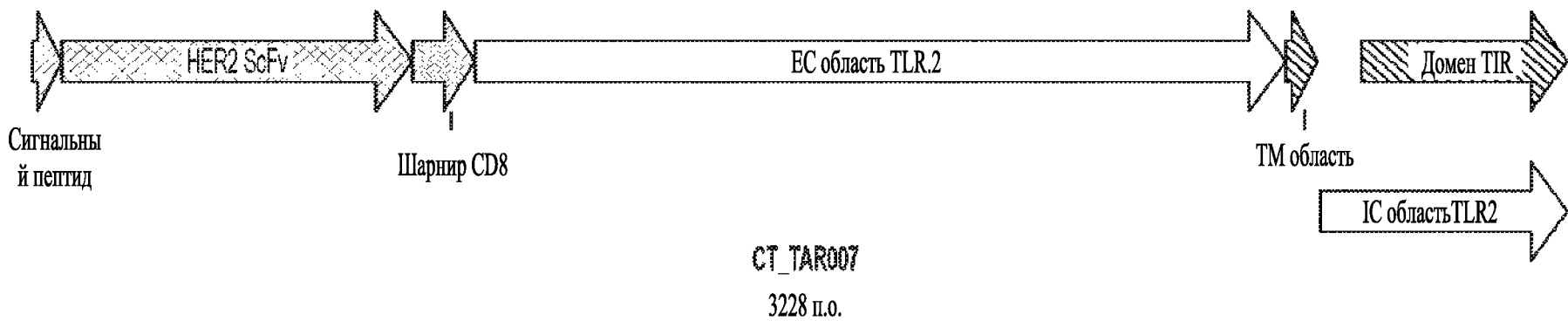


CT_TAR005
3174 п.о.

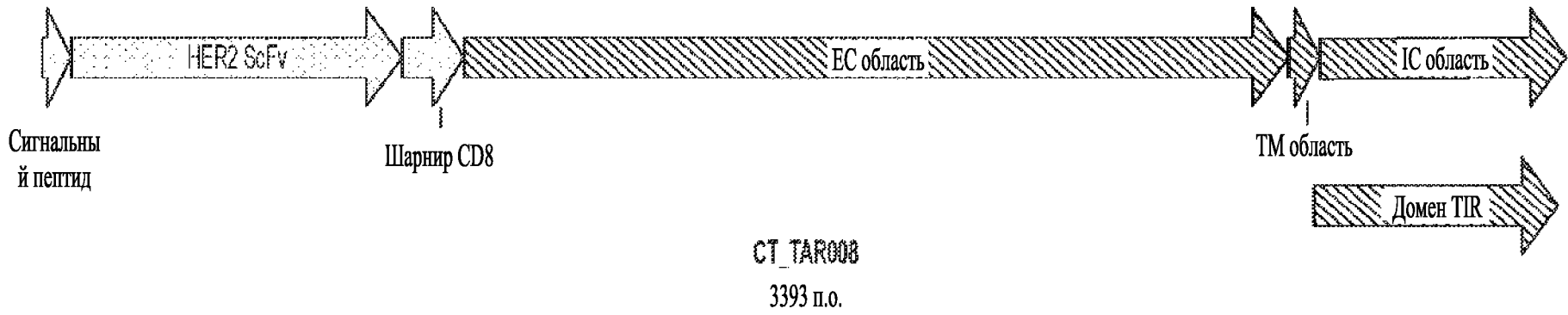
ФИГ. 39



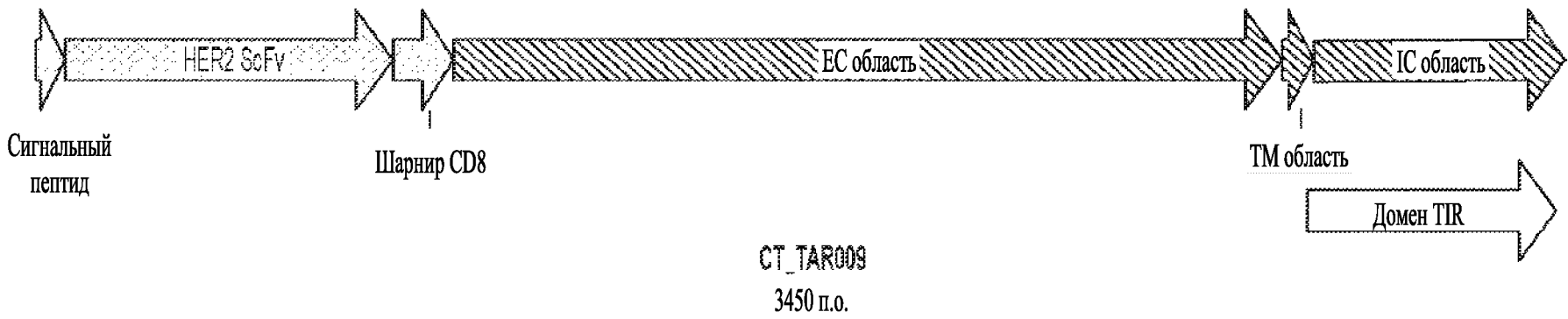
ФИГ. 40



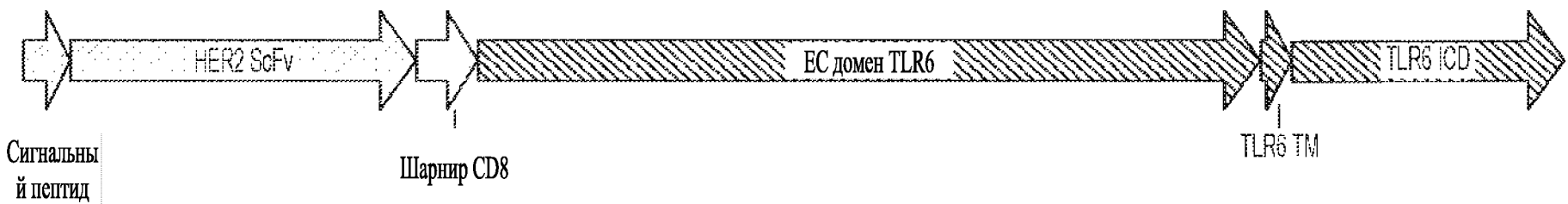
ФИГ. 41



ФИГ. 42

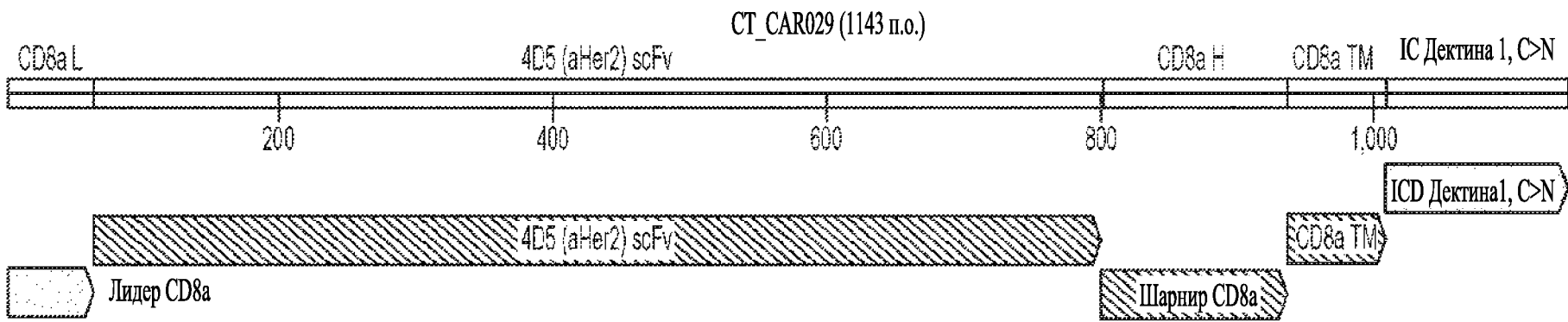


ФИГ. 43

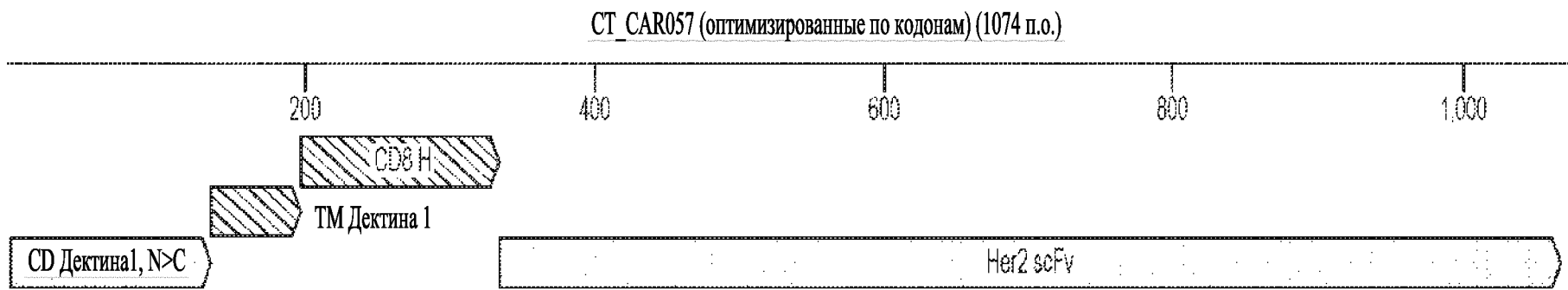


CT_TAR010
3264 п.о.

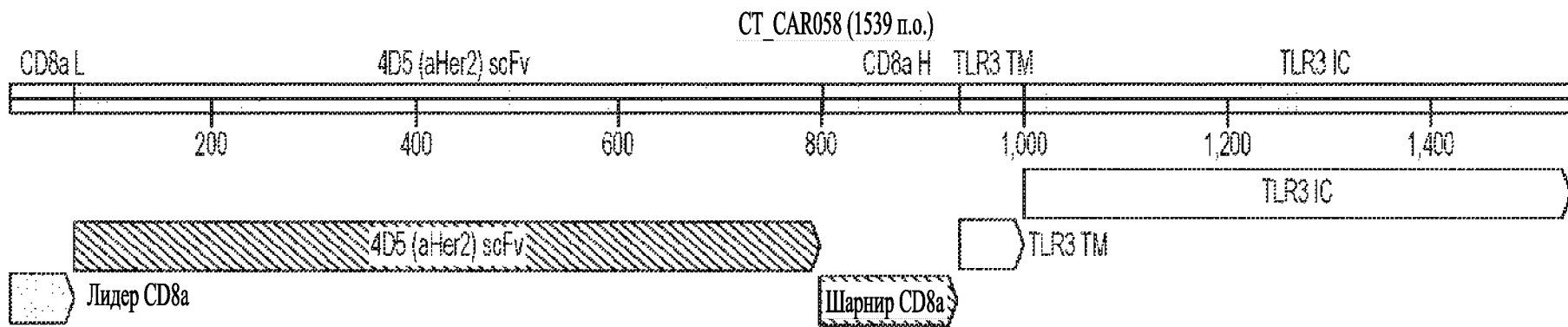
ФИГ. 44



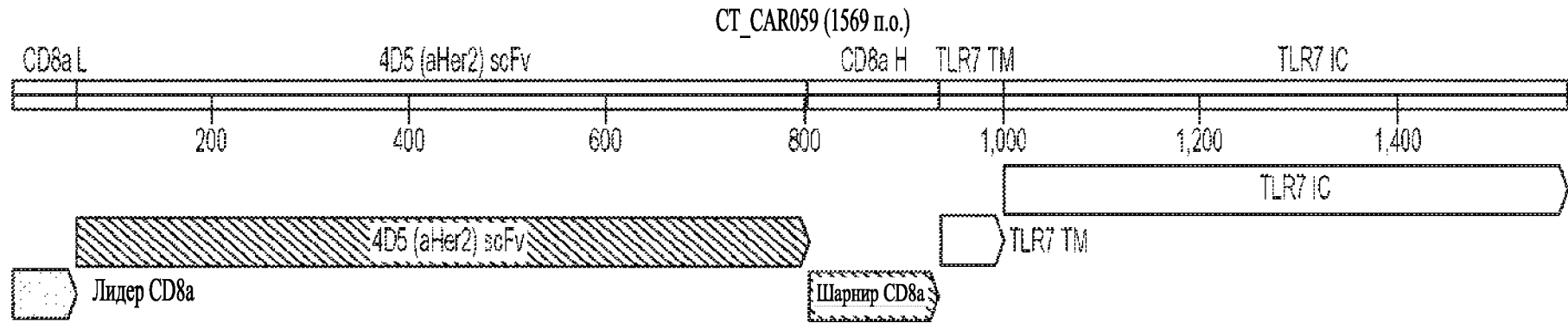
ФИГ. 45



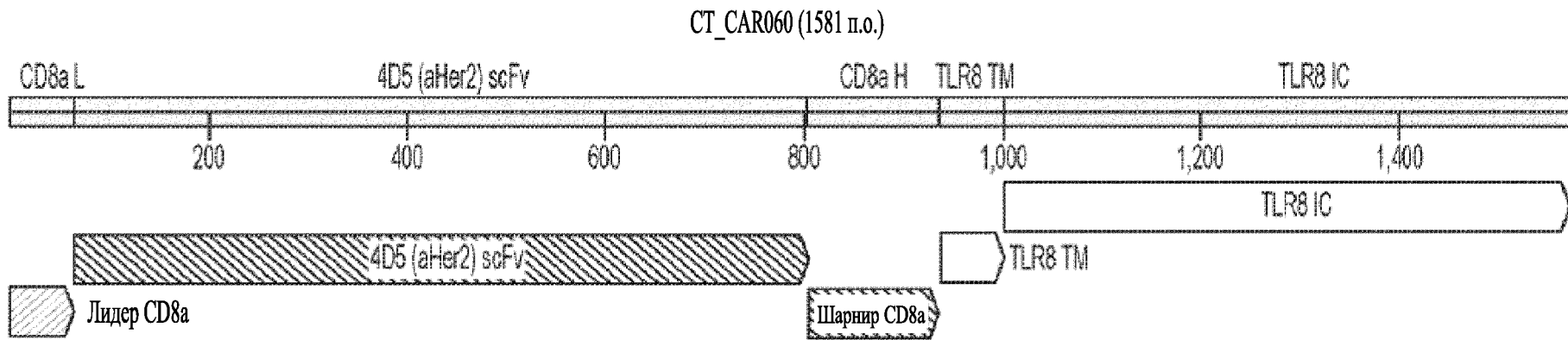
ФИГ. 46



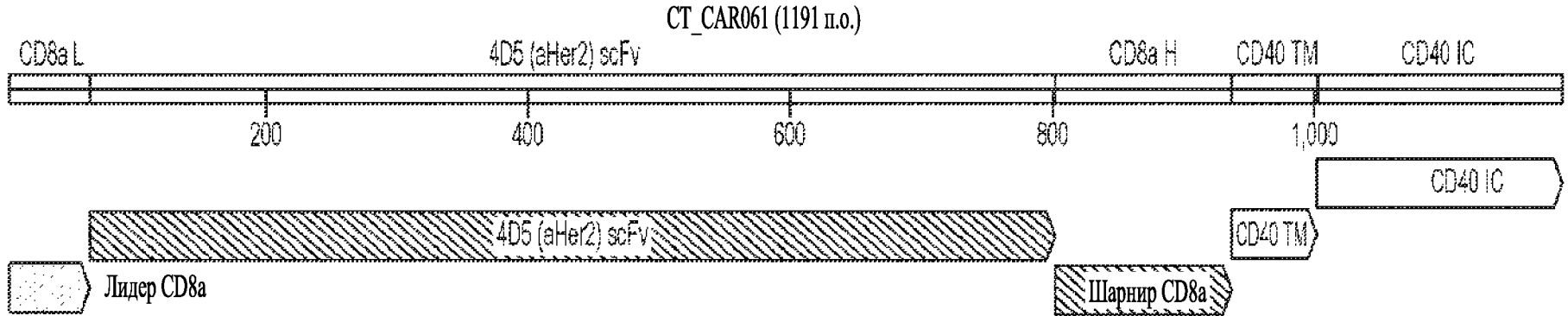
ФИГ. 47



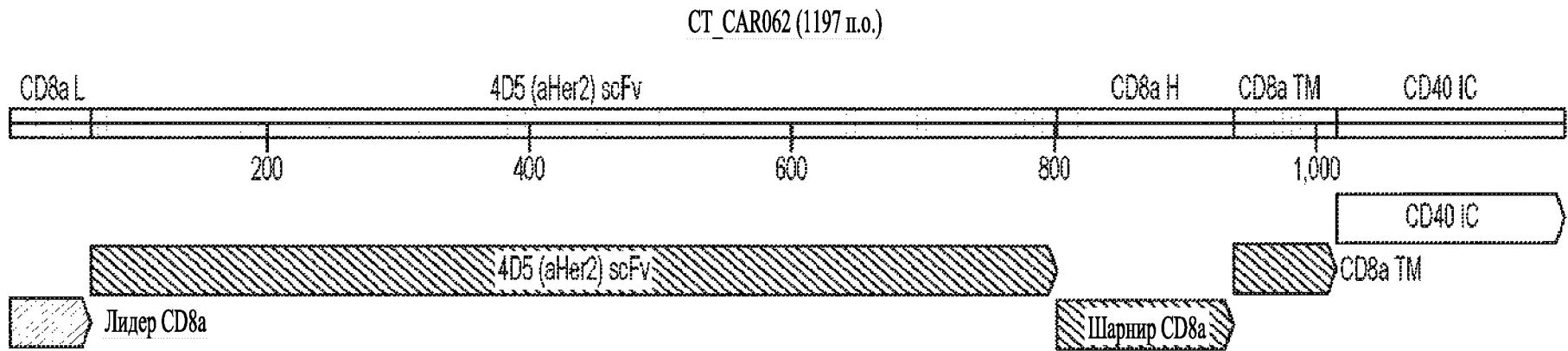
ФИГ. 48



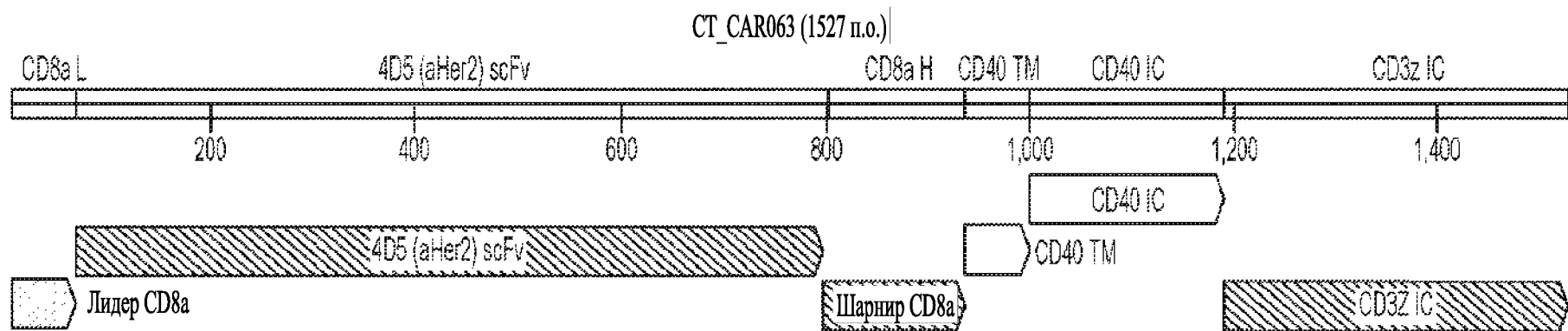
ФИГ. 49



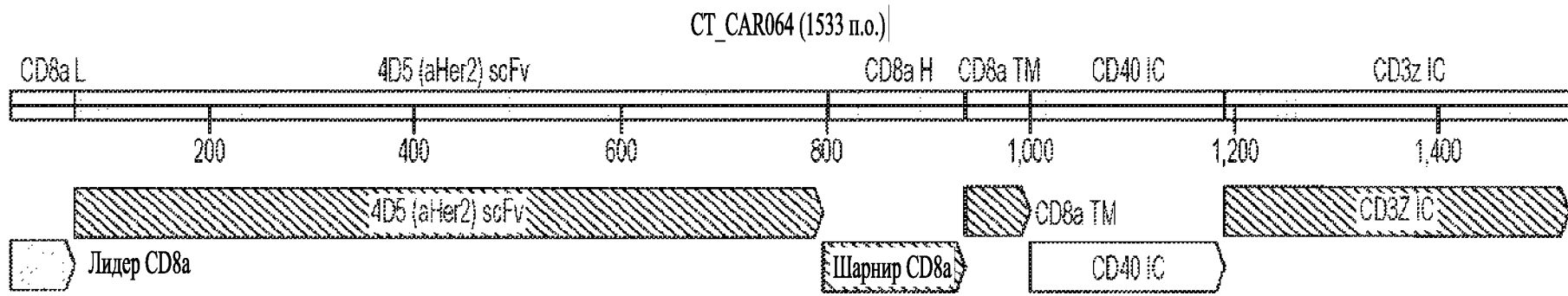
ФИГ. 50



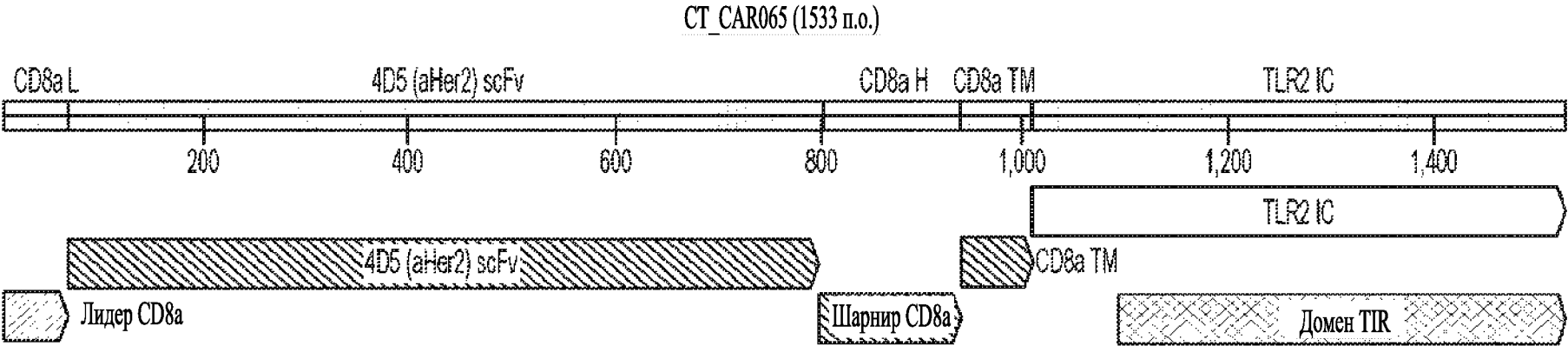
ФИГ. 51



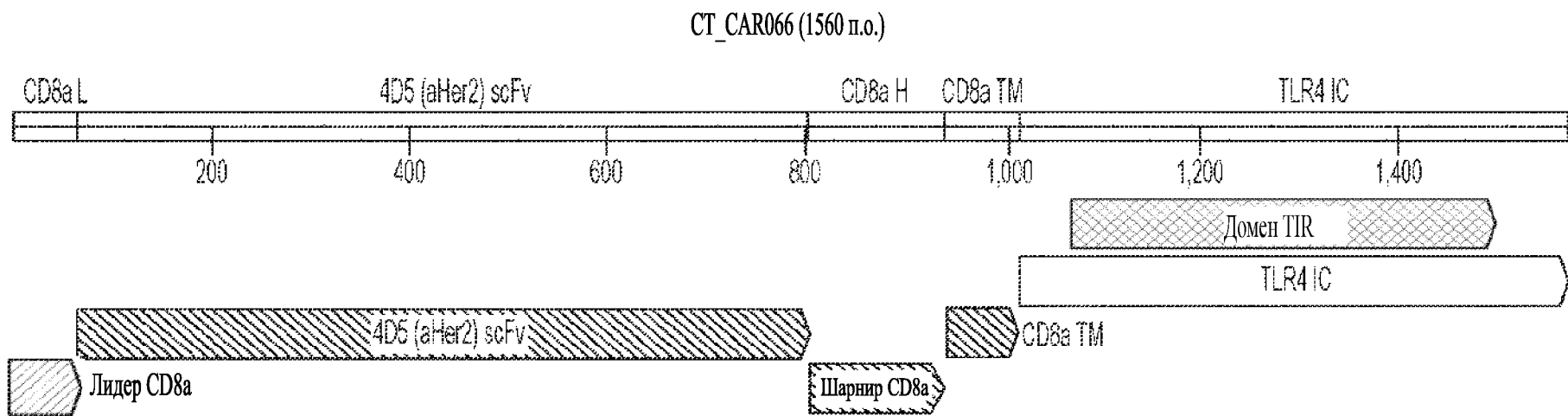
ФИГ. 52



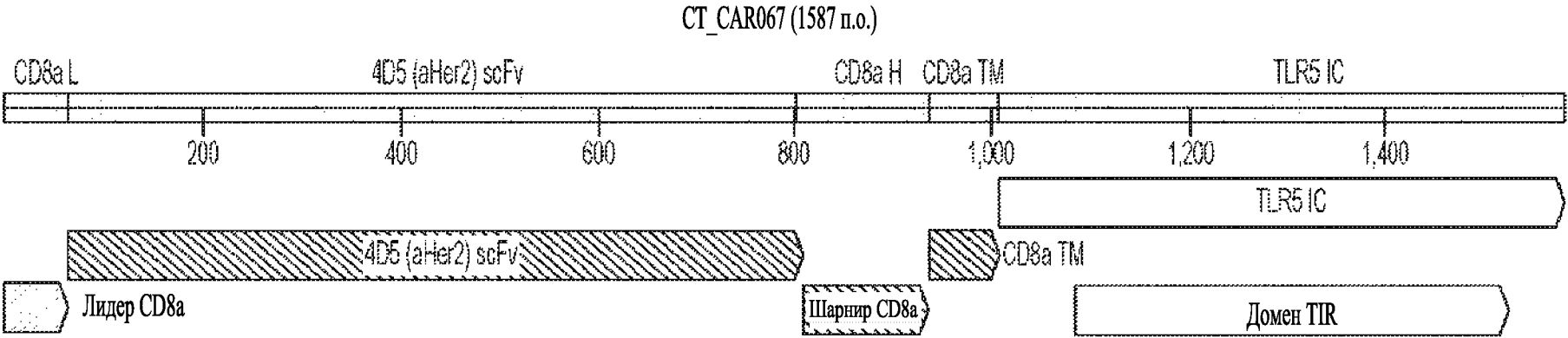
ФИГ. 53



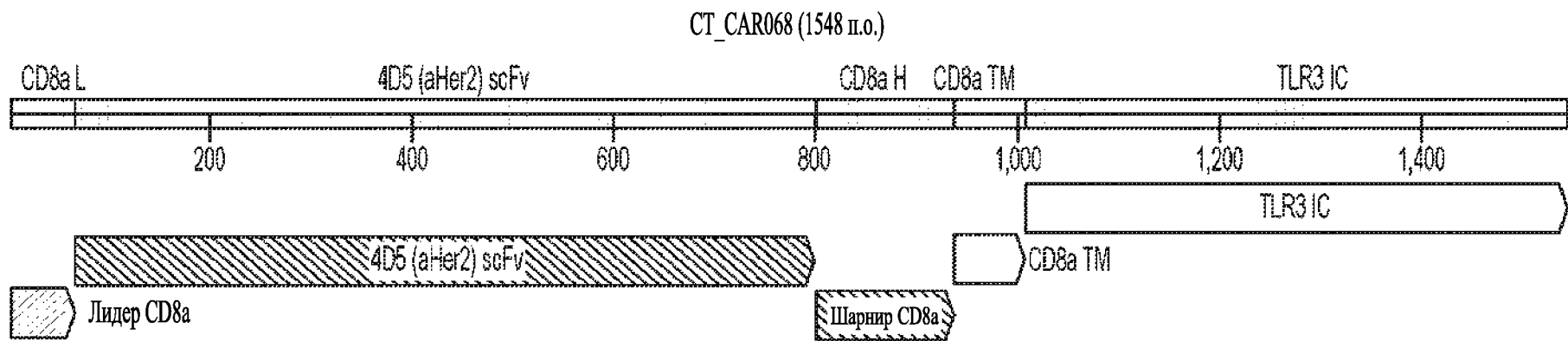
ФИГ. 54



ФИГ. 55

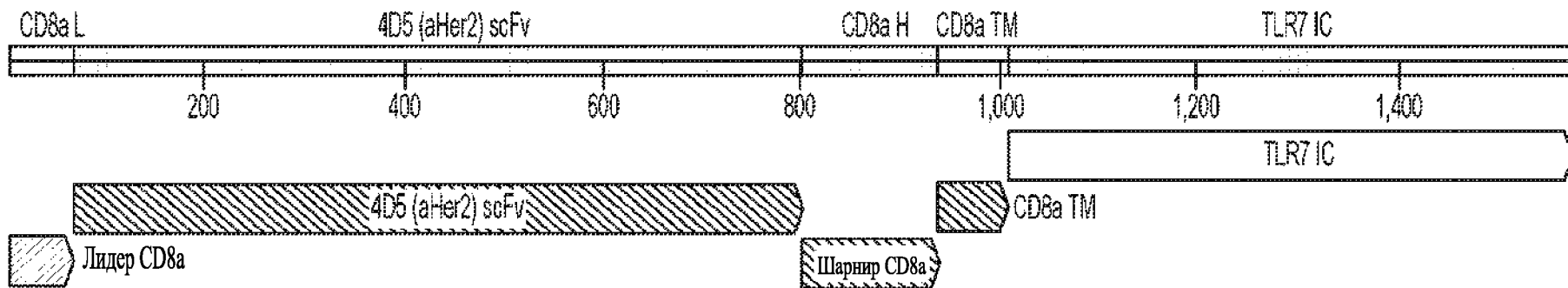


ФИГ. 56



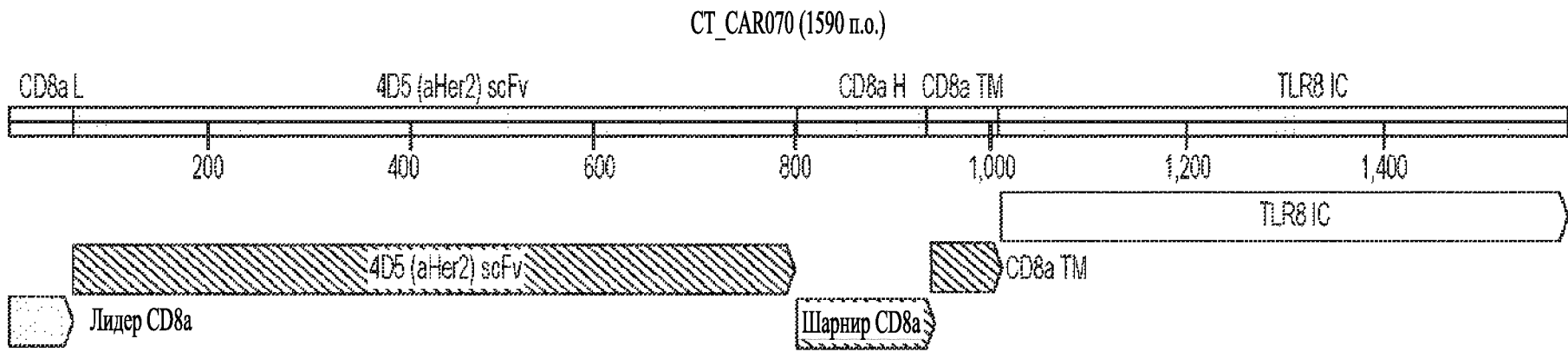
ФИГ. 57

CT_CAR069 (1578 п.о.)

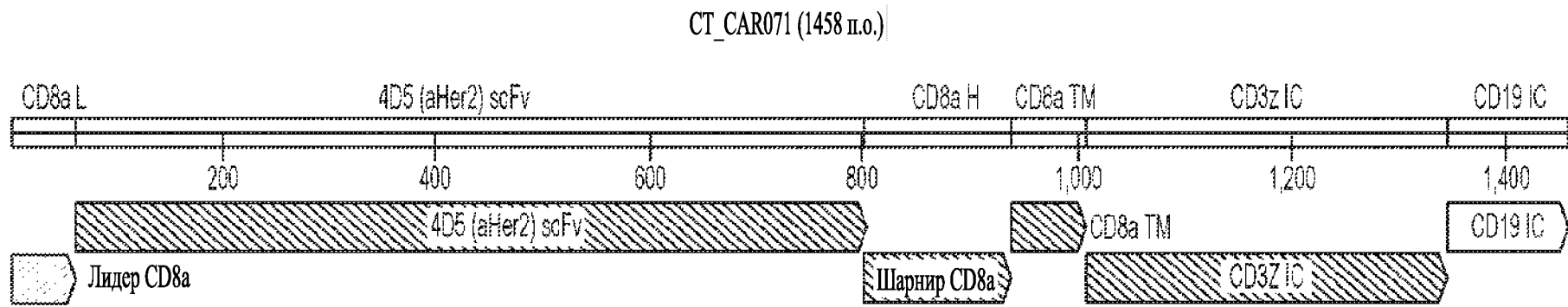


ФИГ. 58

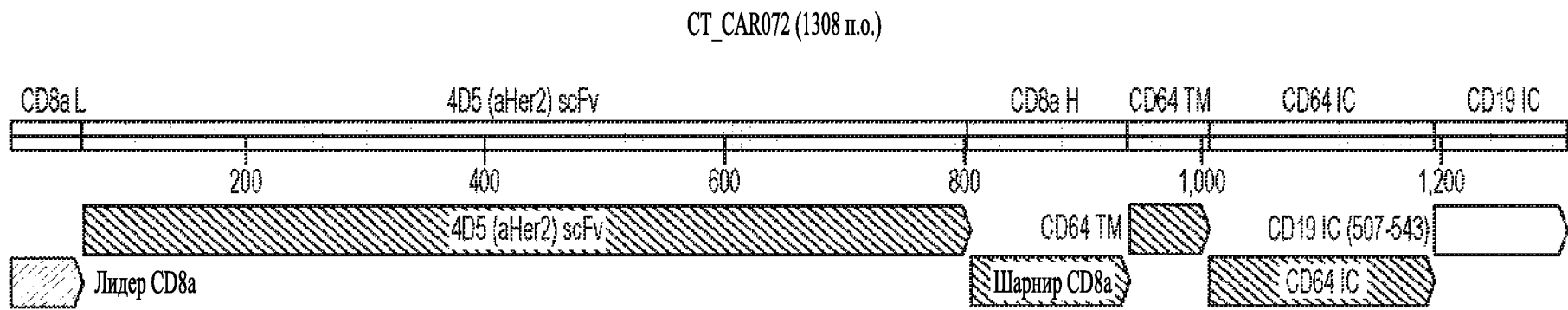
70/204



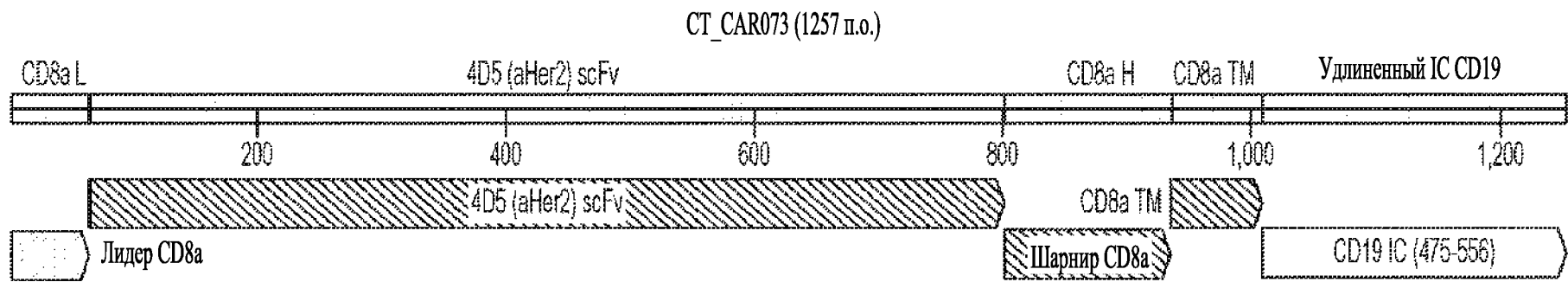
ФИГ. 59



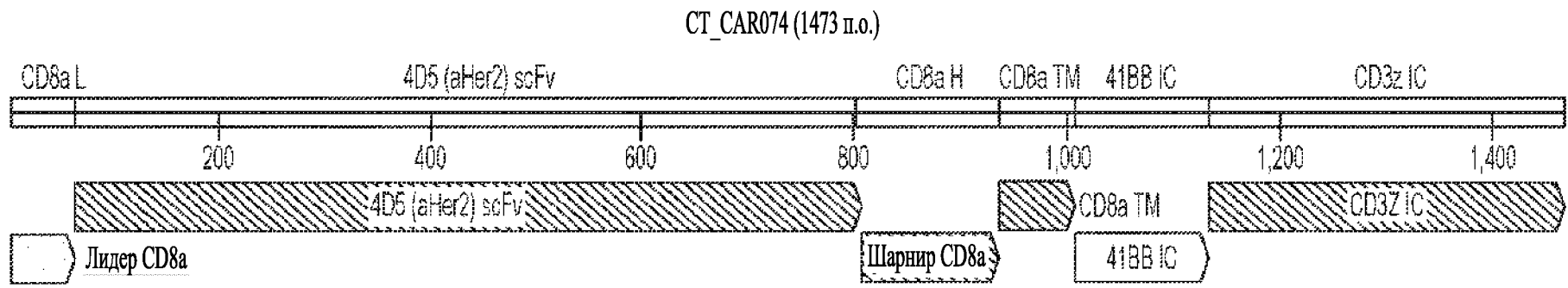
ФИГ. 60



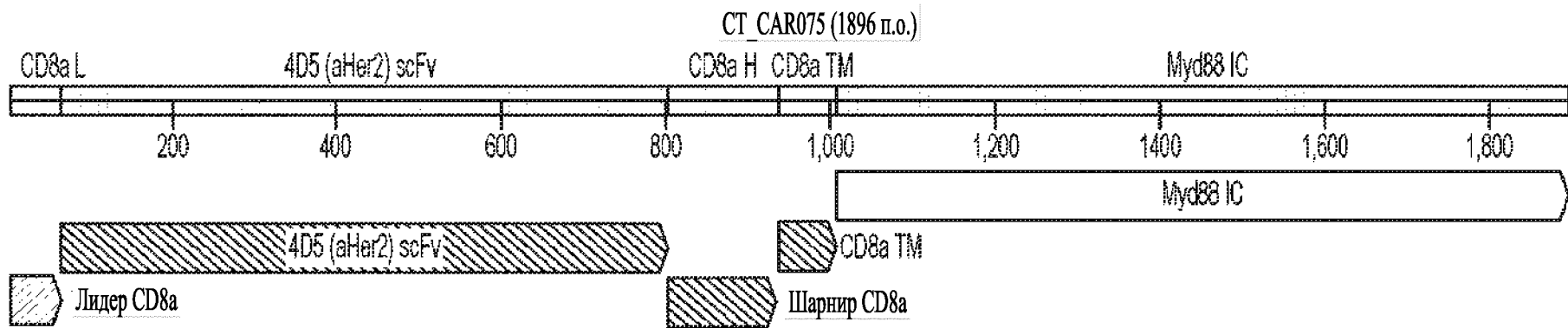
ФИГ. 61



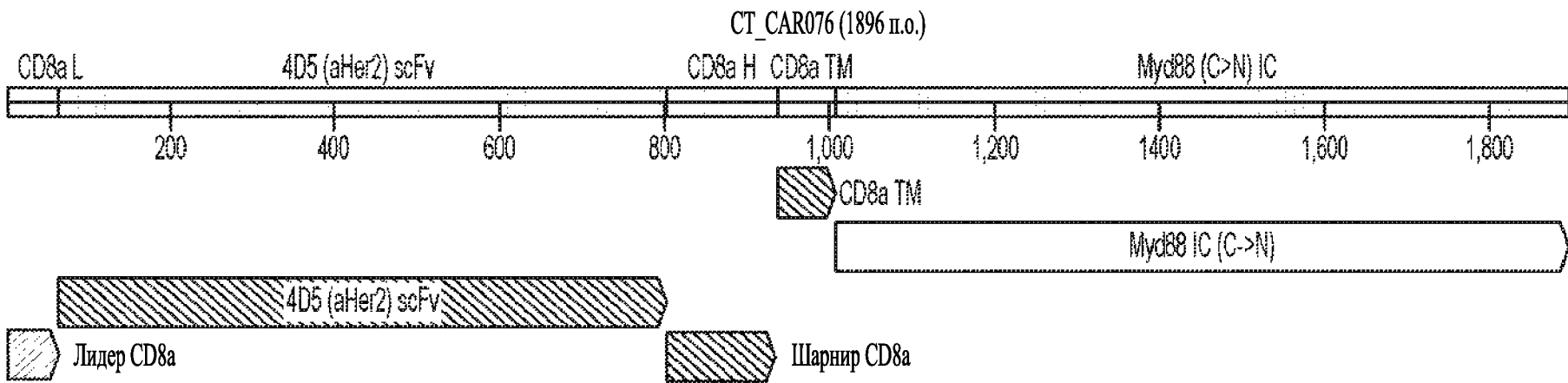
ФИГ. 62



ФИГ. 63

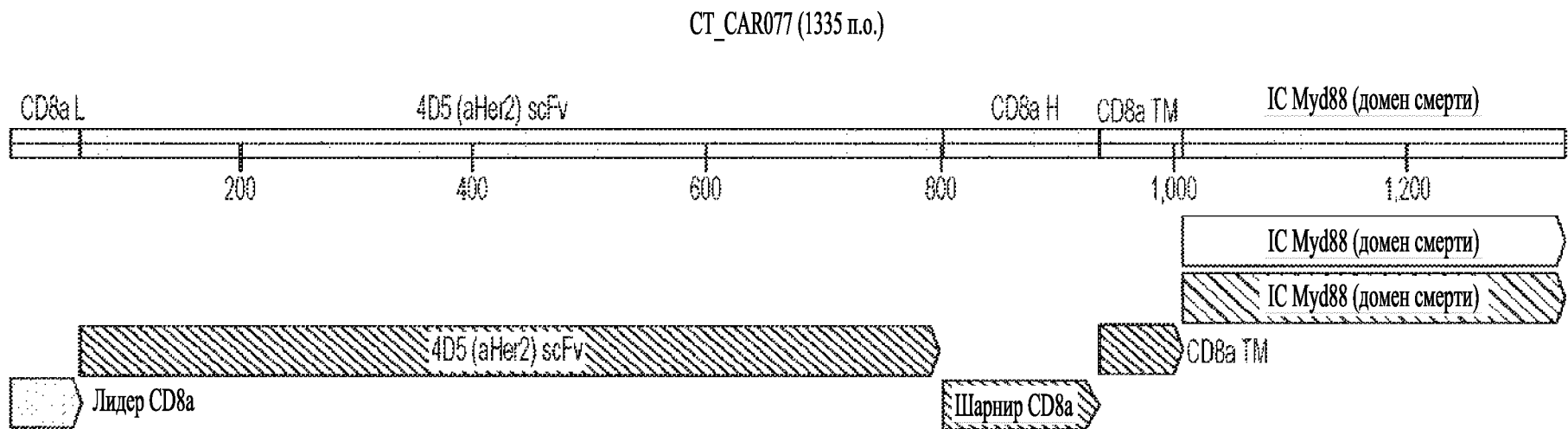


ФИГ. 64



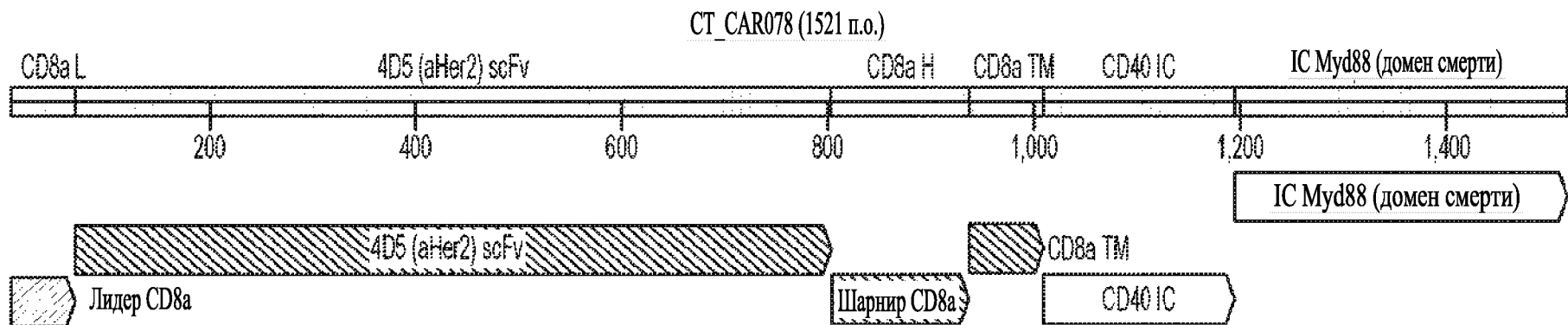
76/204

ФИГ. 65



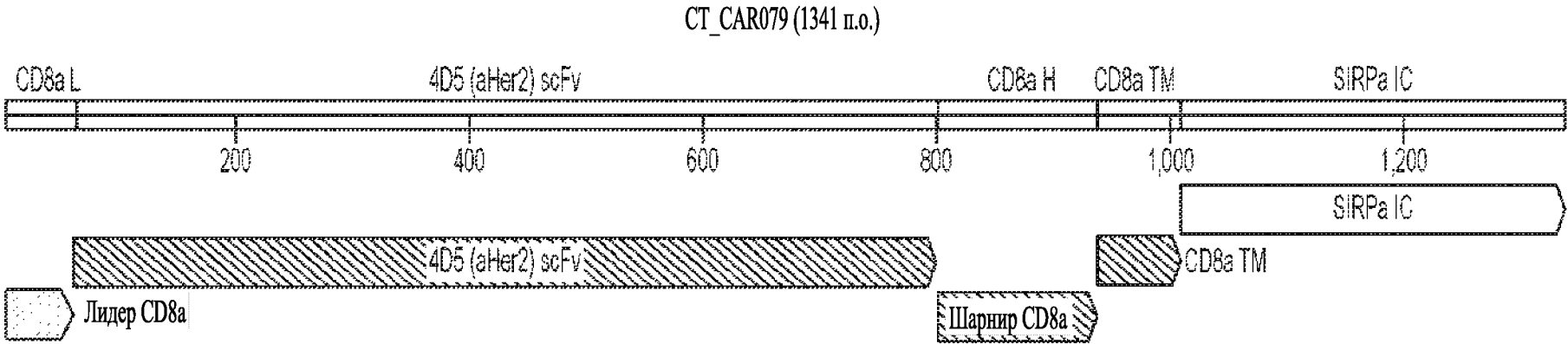
ФИГ. 66

78/204

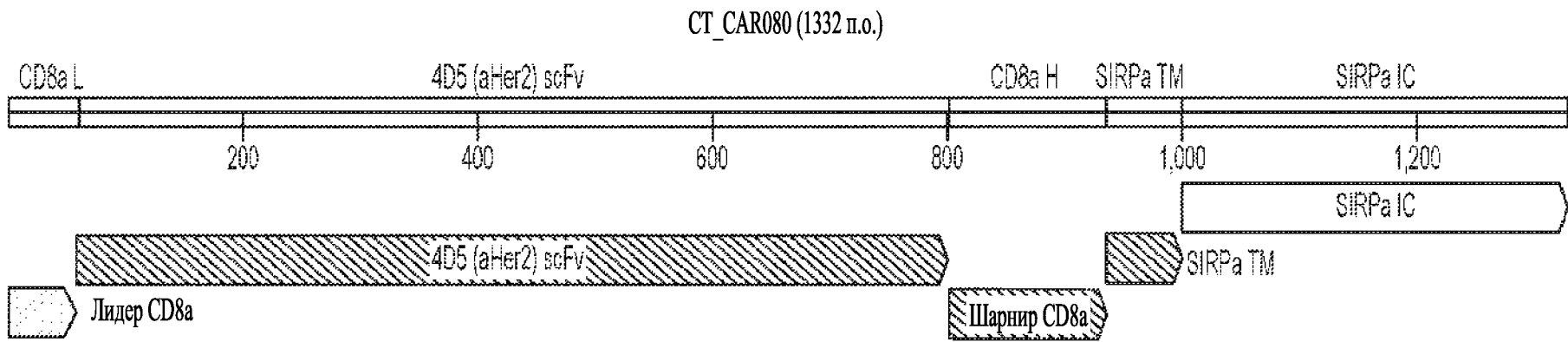


ФИГ. 67

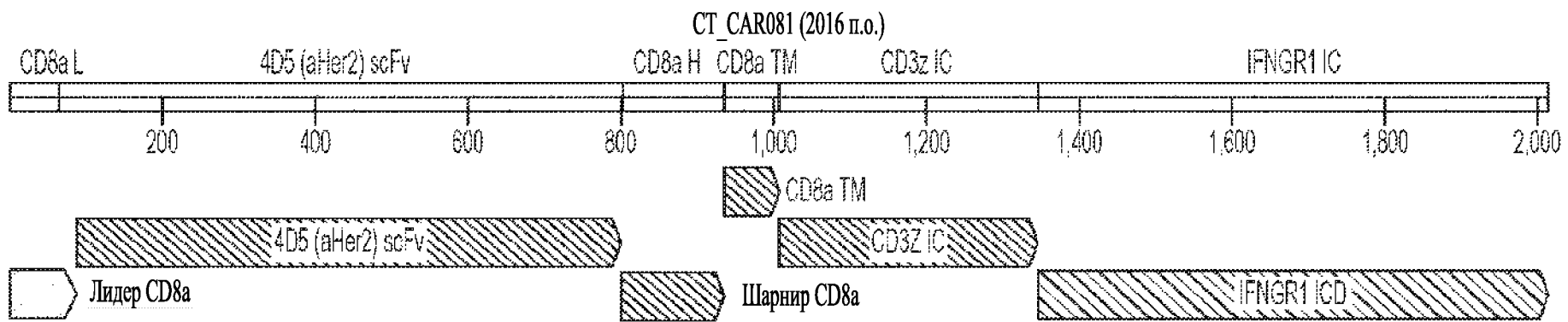
79/204



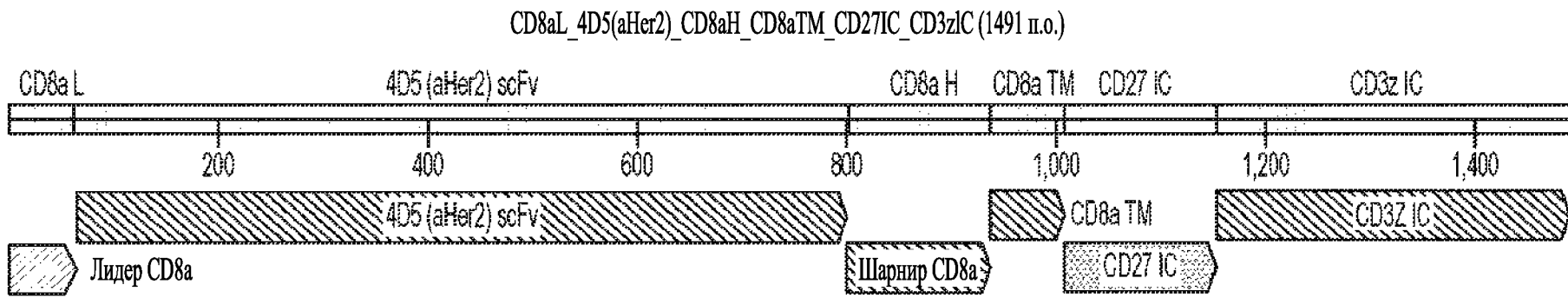
ФИГ. 68



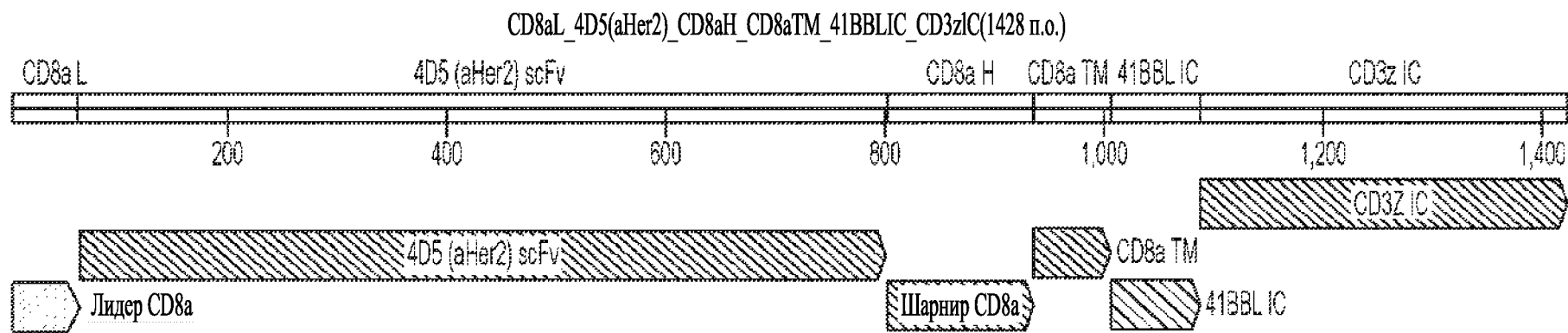
ФИГ. 69



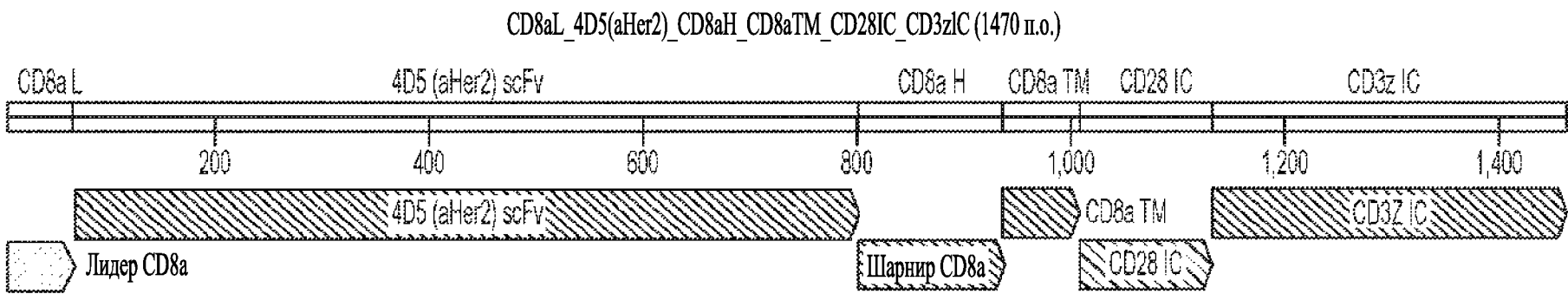
ФИГ. 70



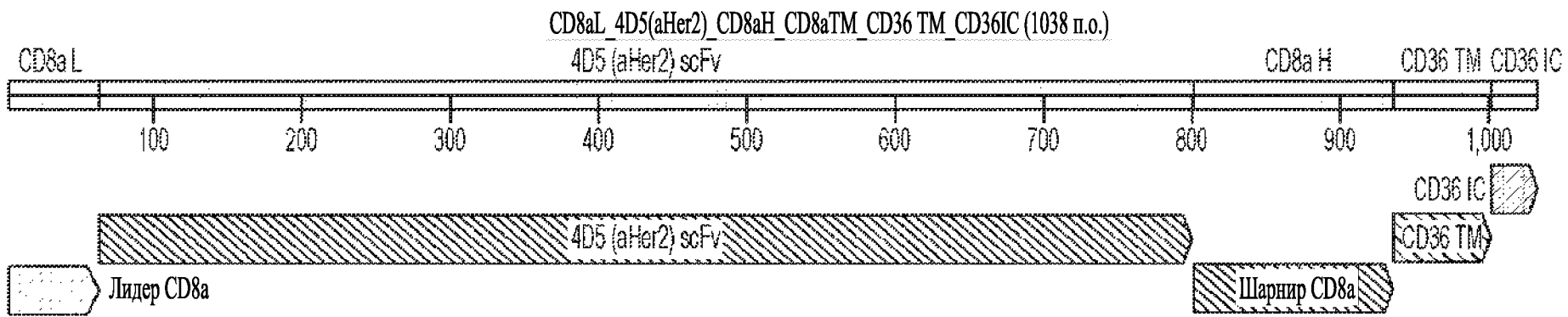
ФИГ. 71



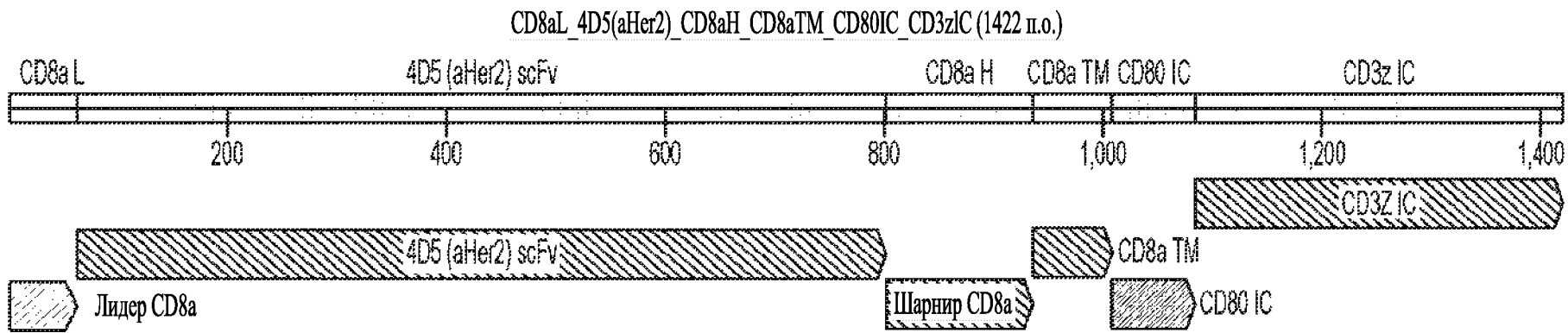
ФИГ. 72



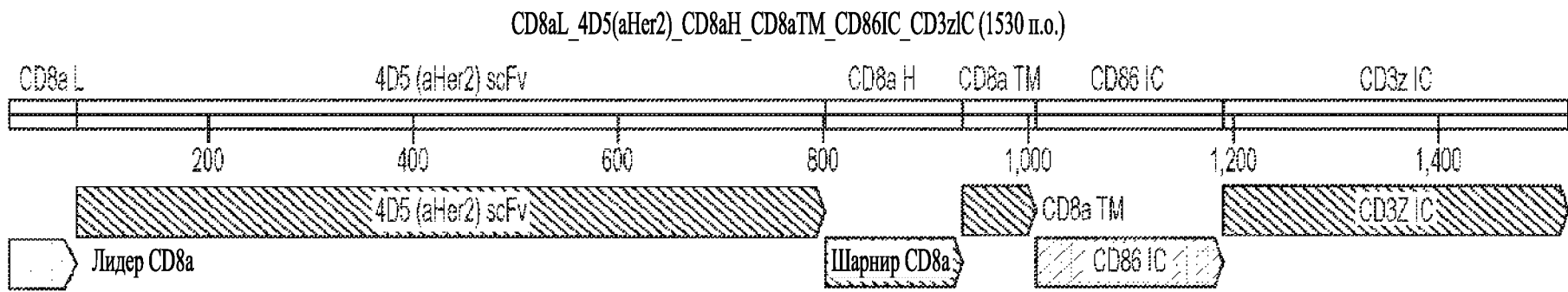
ФИГ. 73



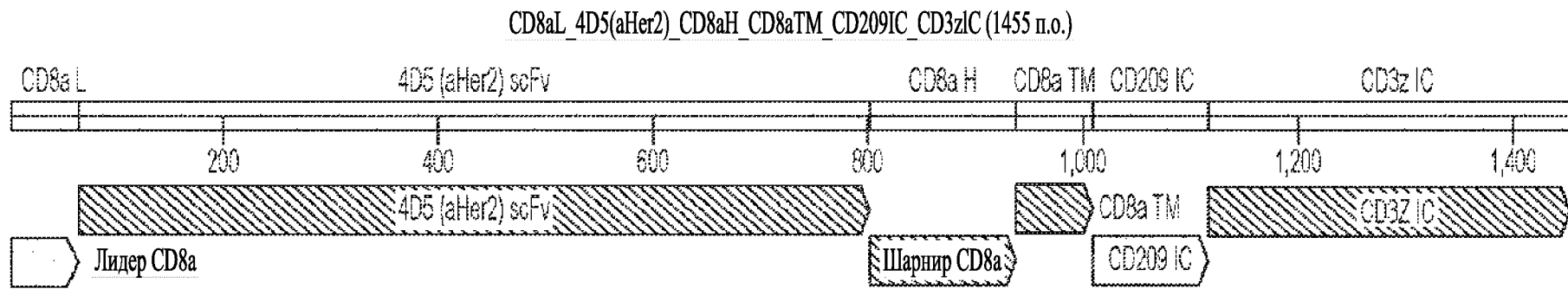
ФИГ. 74



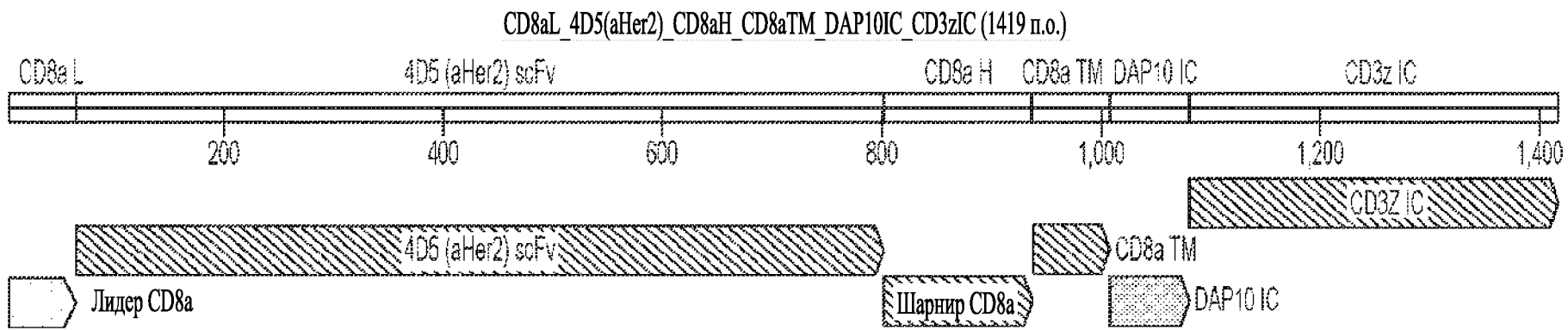
ФИГ. 75



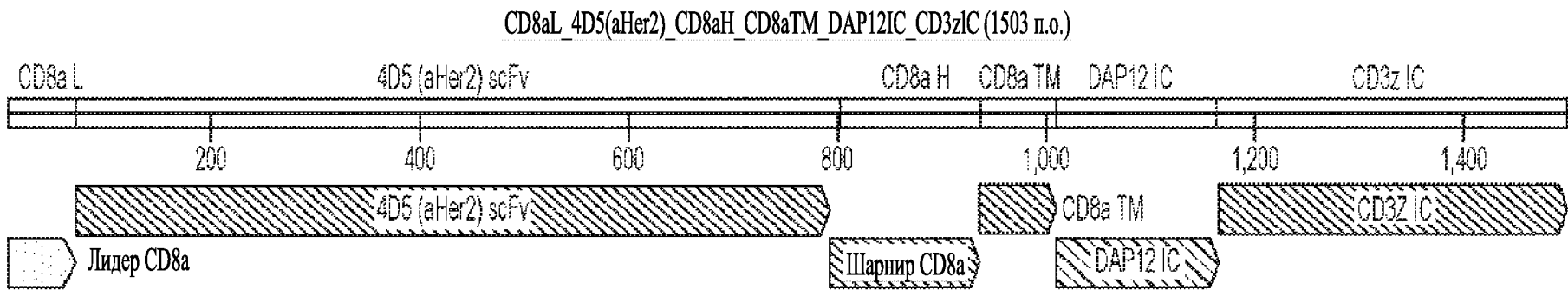
ФИГ. 76



ФИГ. 77

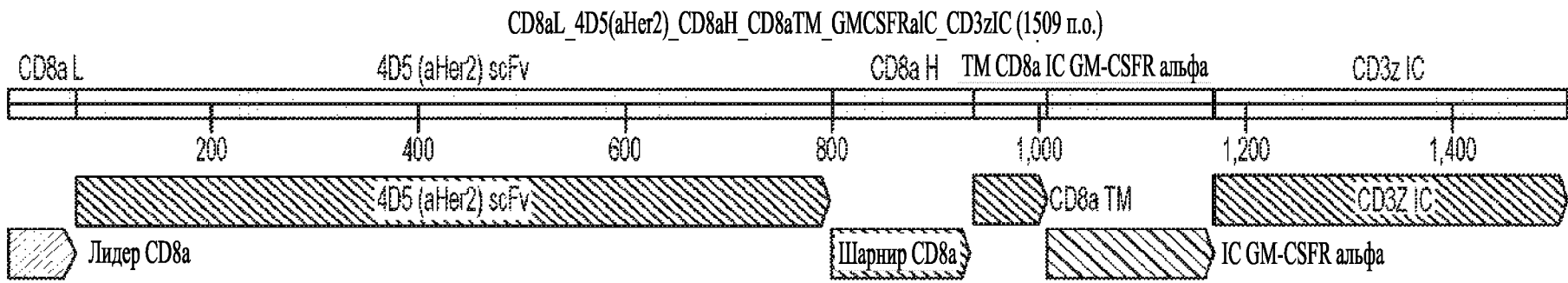


ФИГ. 78

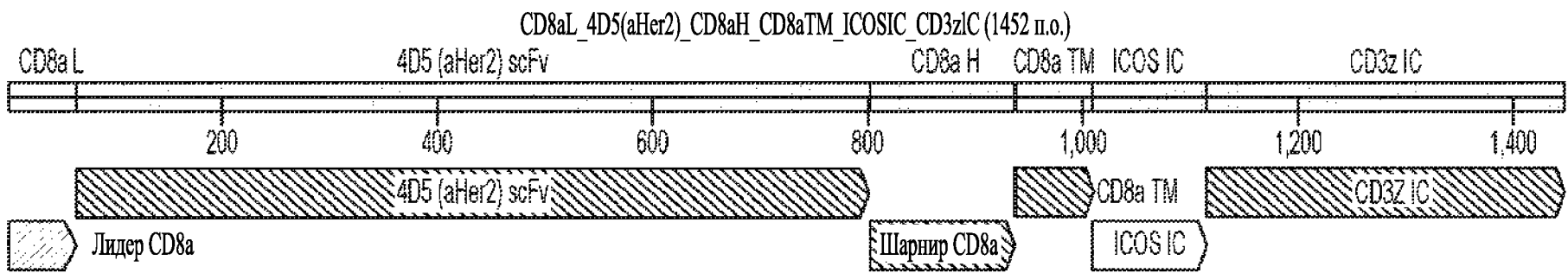


ФИГ. 79

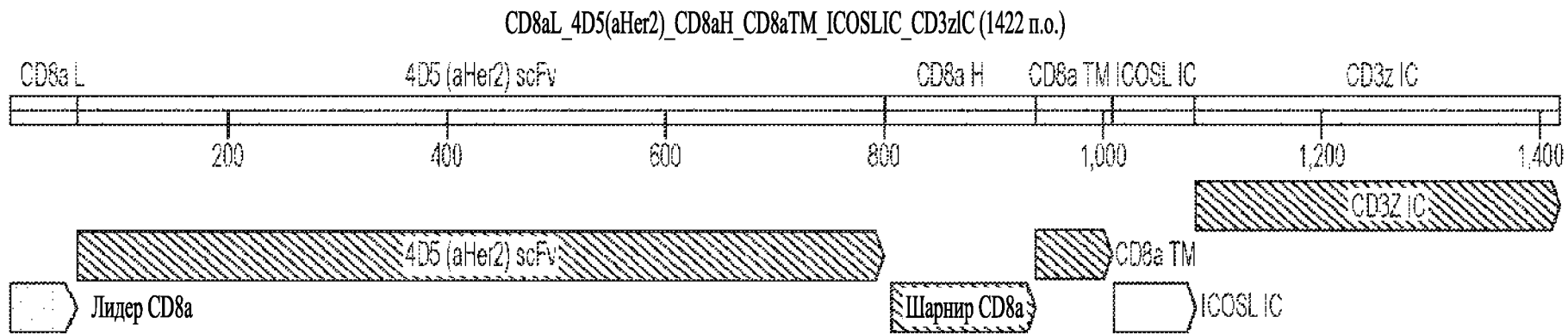




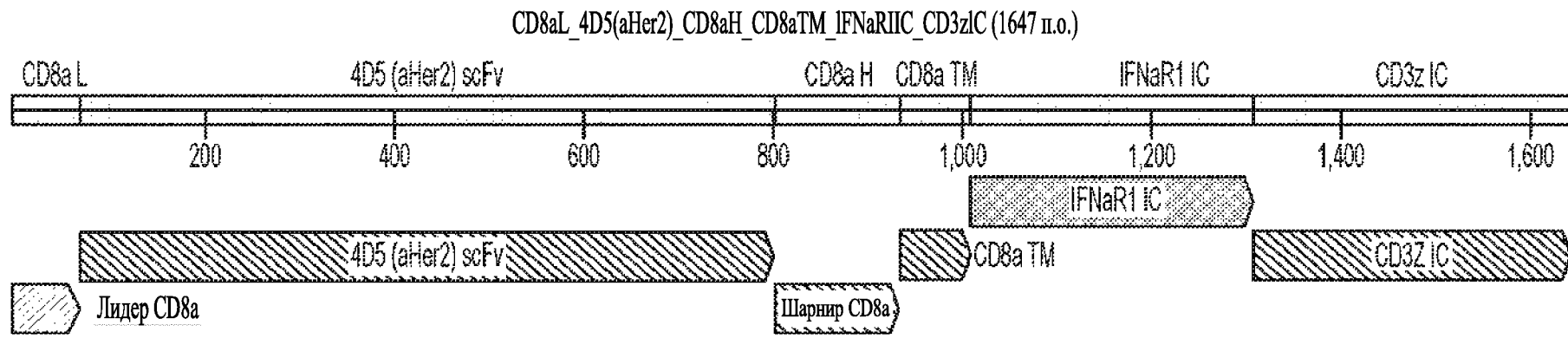
ФИГ. 81



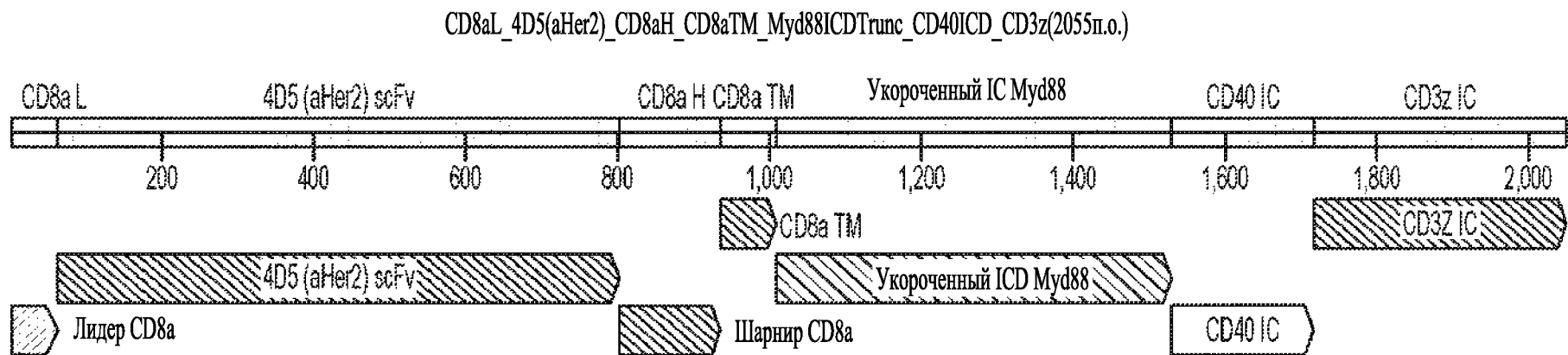
ФИГ. 82



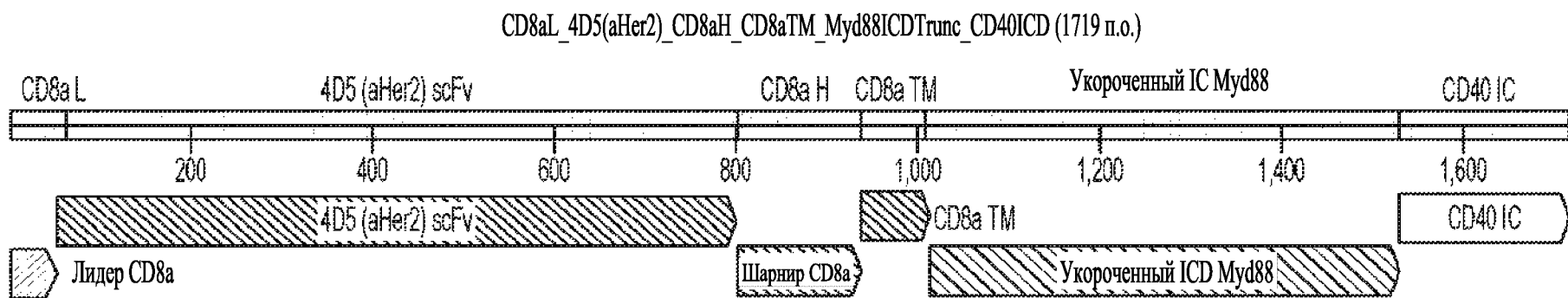
ФИГ. 83



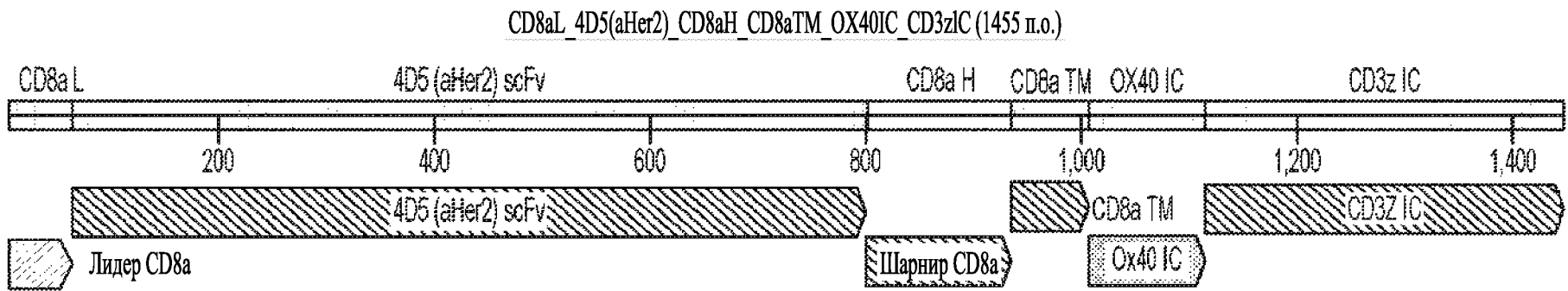
ФИГ. 84



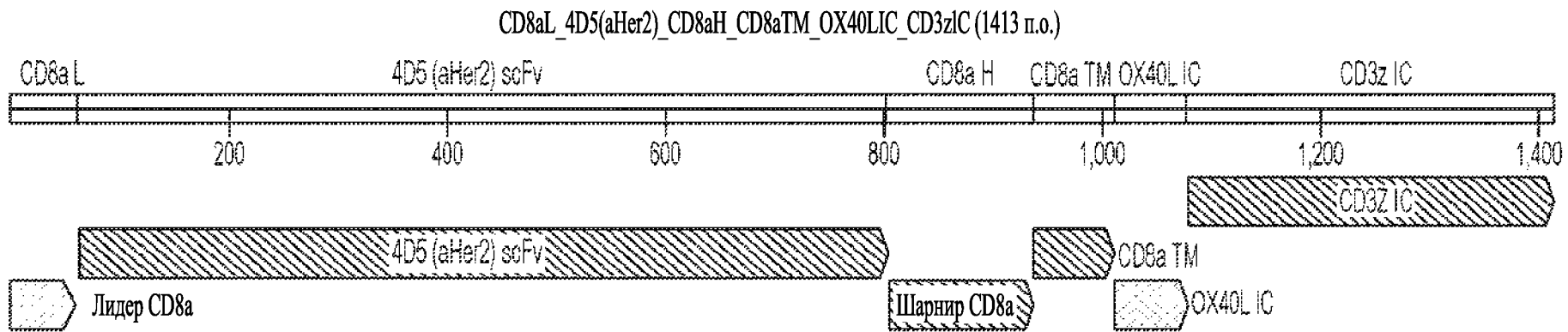
ФИГ. 85



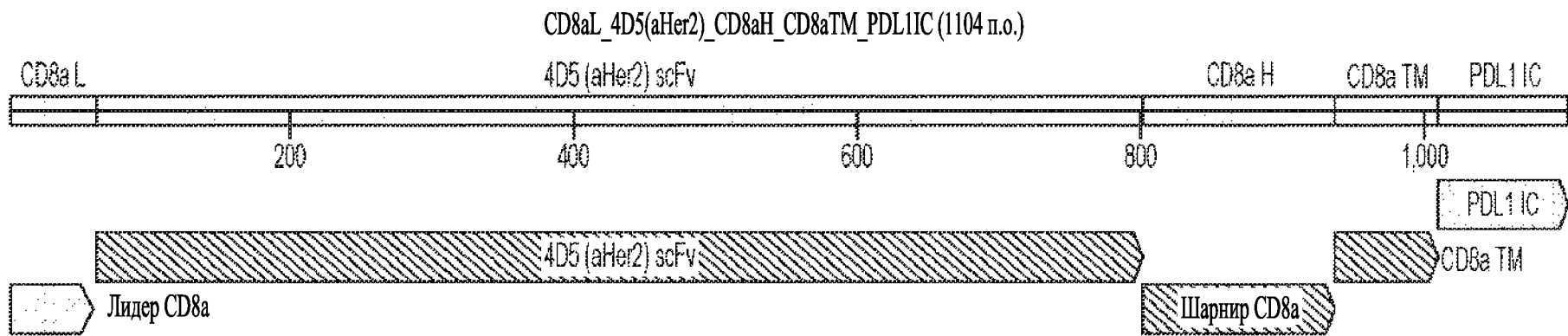
ФИГ. 86



ФИГ. 87

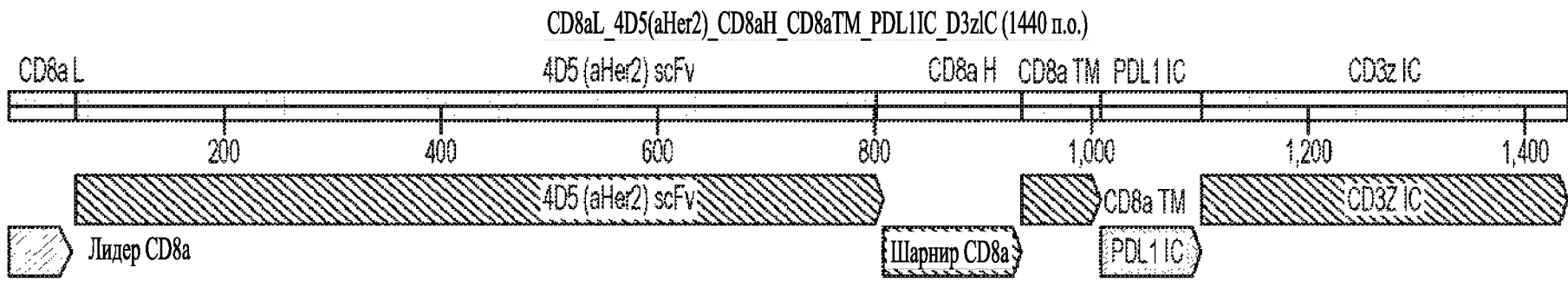


ФИГ. 88



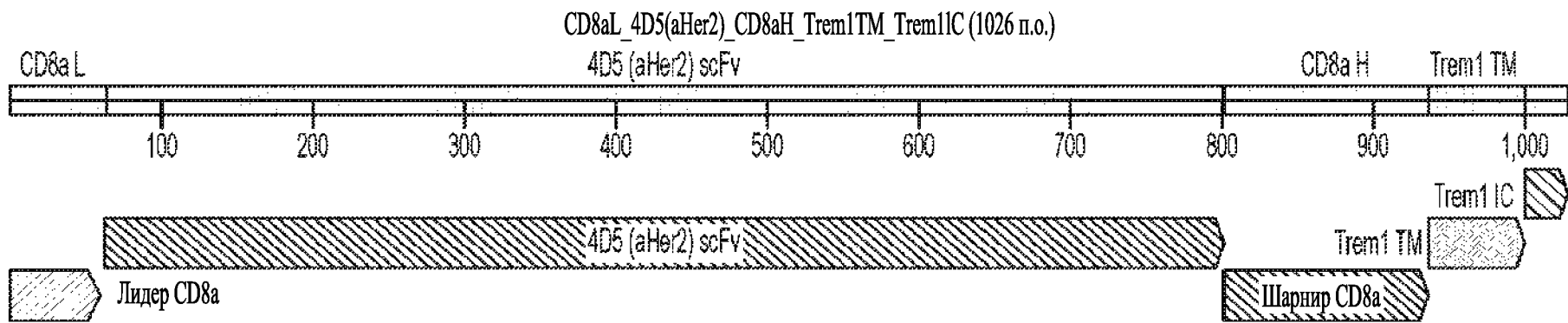
ФИГ. 89

101/204

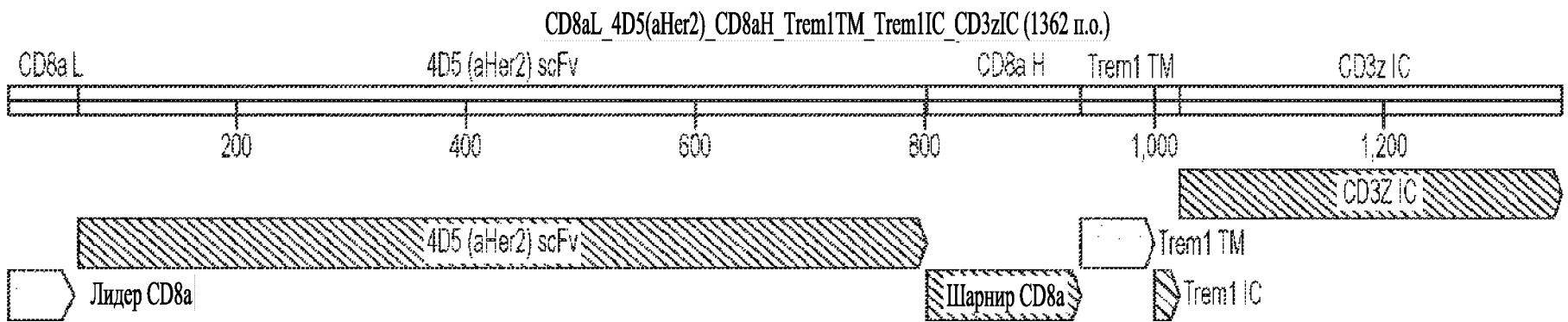


ФИГ. 90

102/204

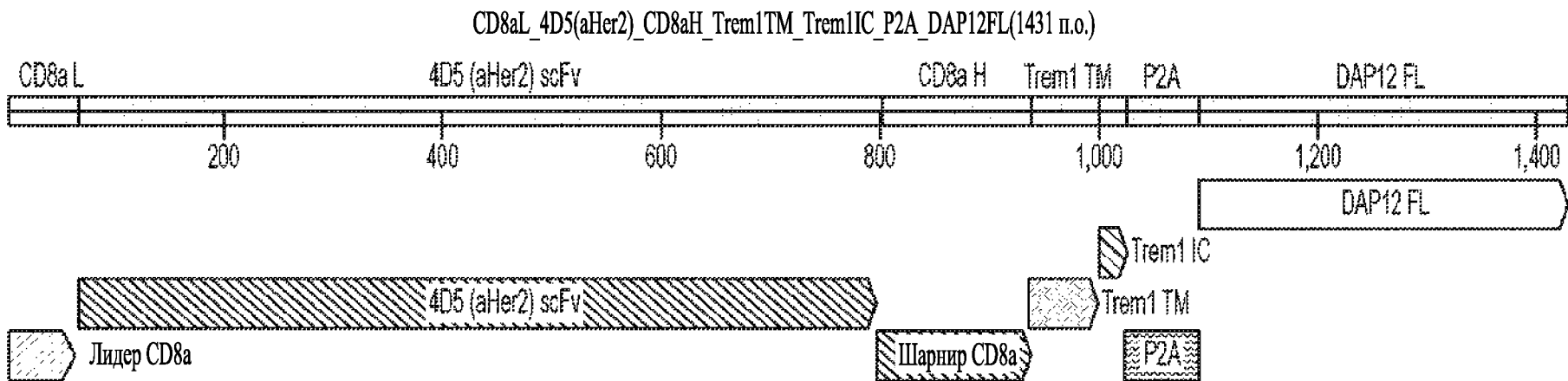


ФИГ. 91

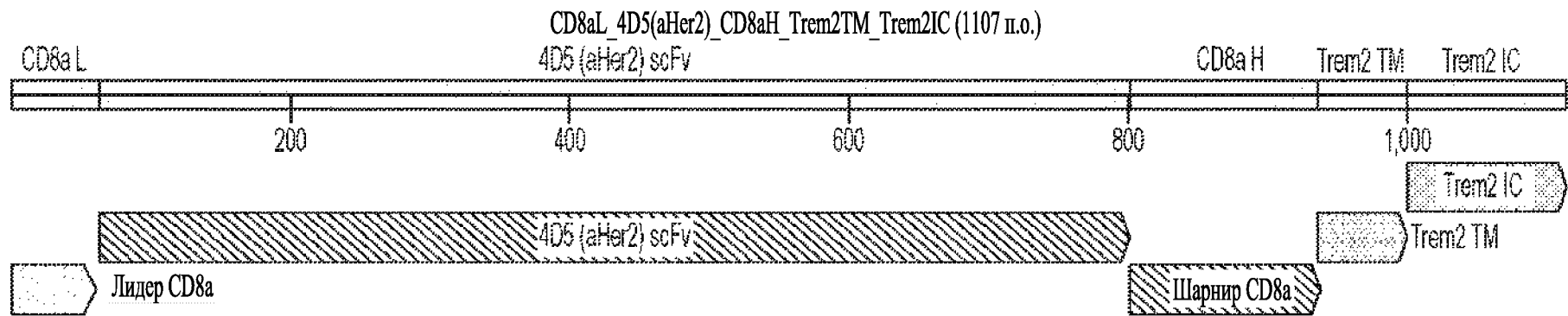


ФИГ. 92

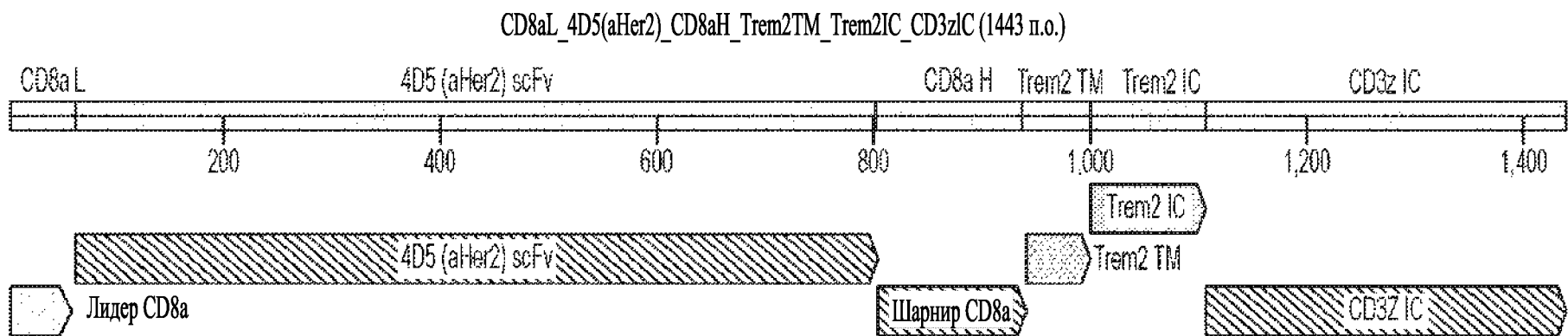
104/204



ФИГ. 93



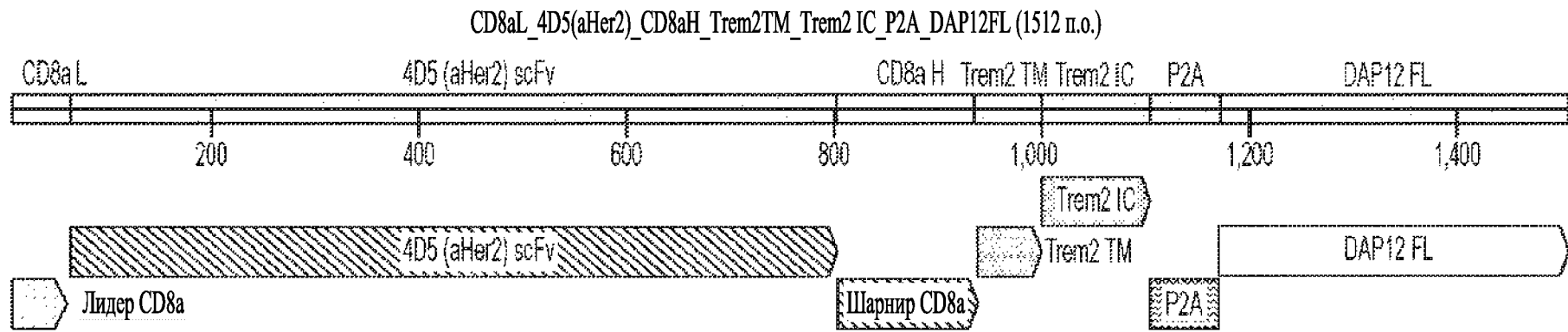
ФИГ. 94



106/204

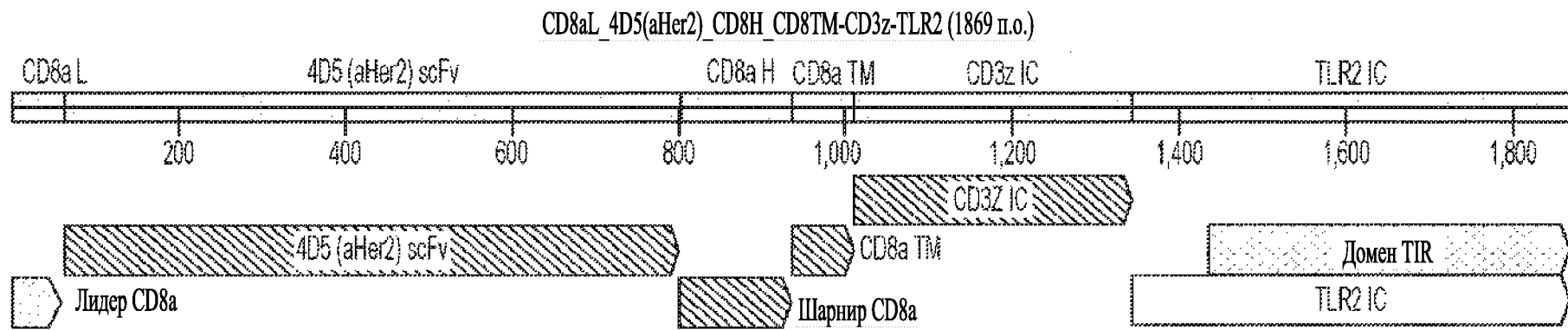
ФИГ. 95

107/204

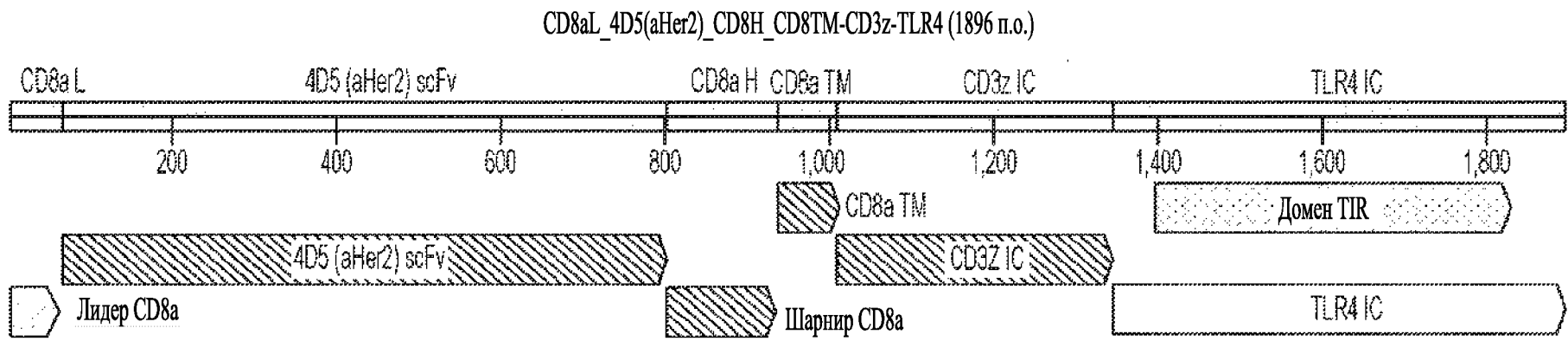


ФИГ. 96

108/204

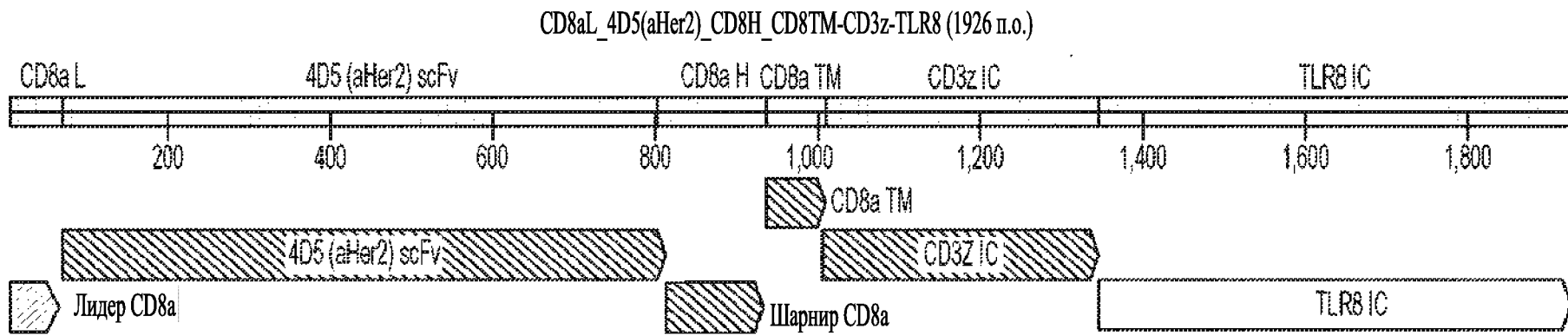


ФИГ. 97



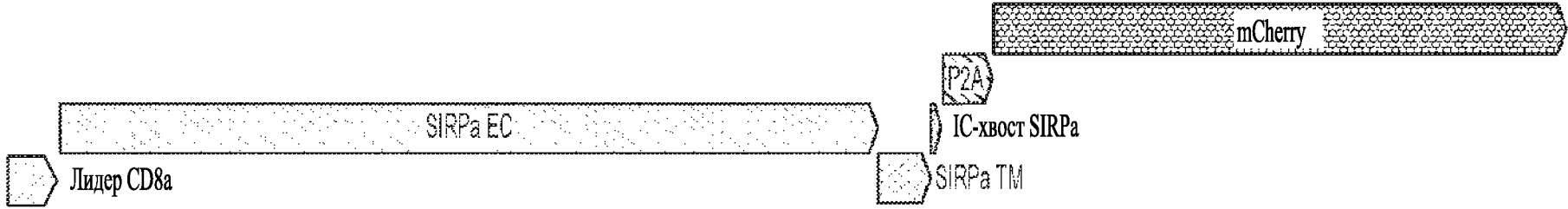
ФИГ. 98

110/204



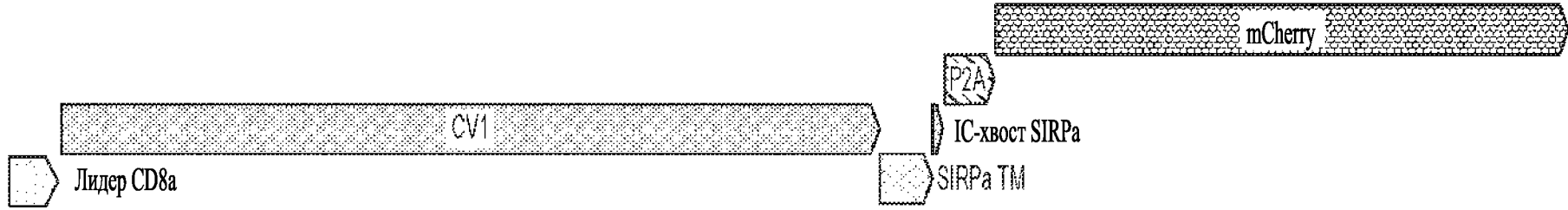
ФИГ. 99

111/204

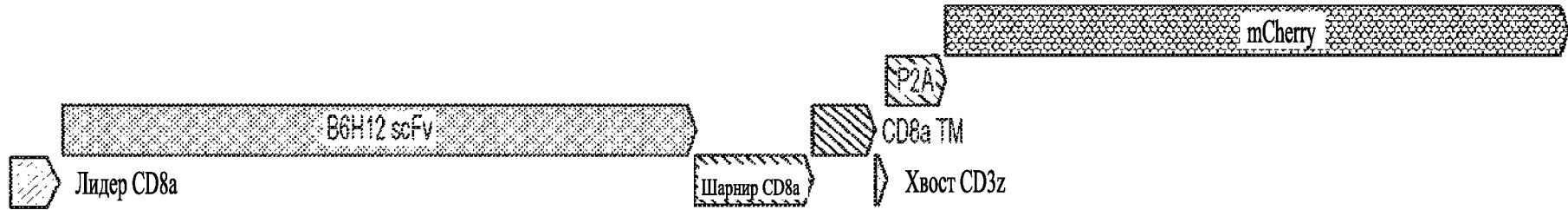


ФИГ. 100

112/204

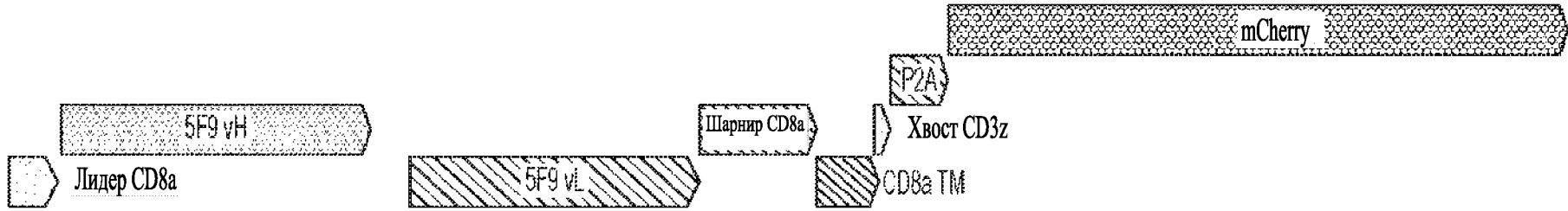


ФИГ. 101

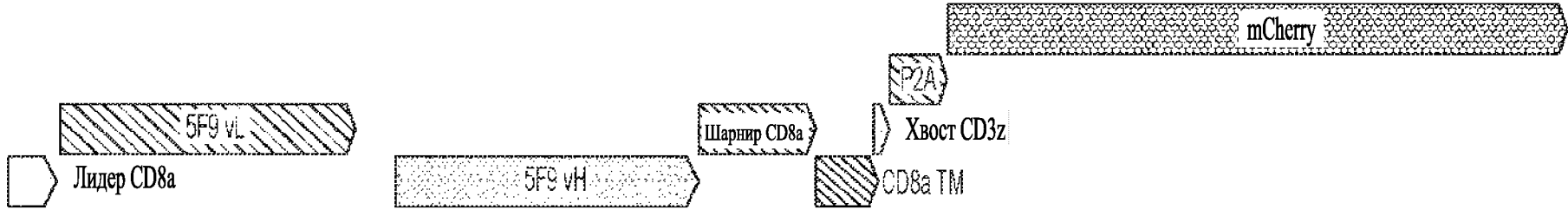


ФИГ. 102

11/4/204

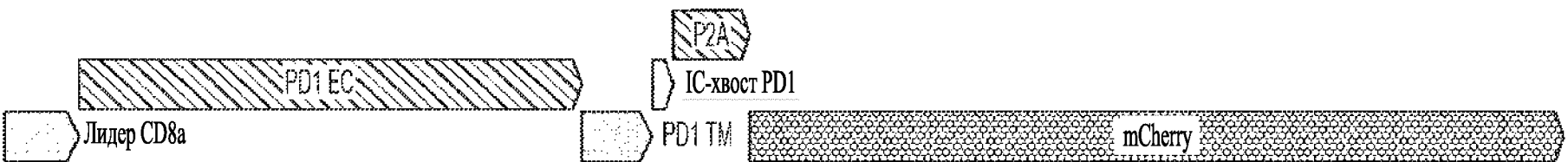


ФИГ. 103



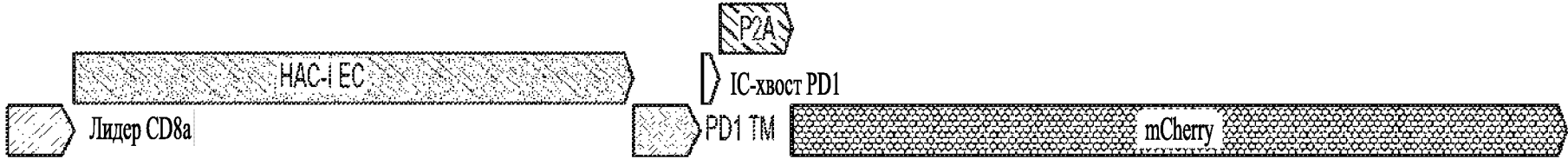
ФИГ. 104

116/204

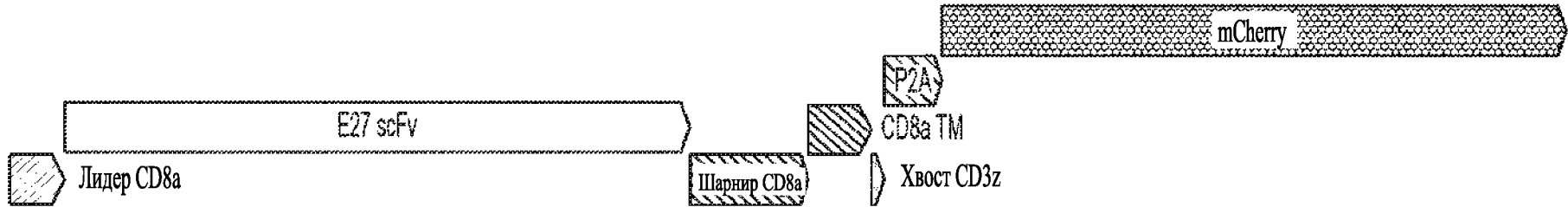


ФИГ. 105

117/204



ФИГ. 106



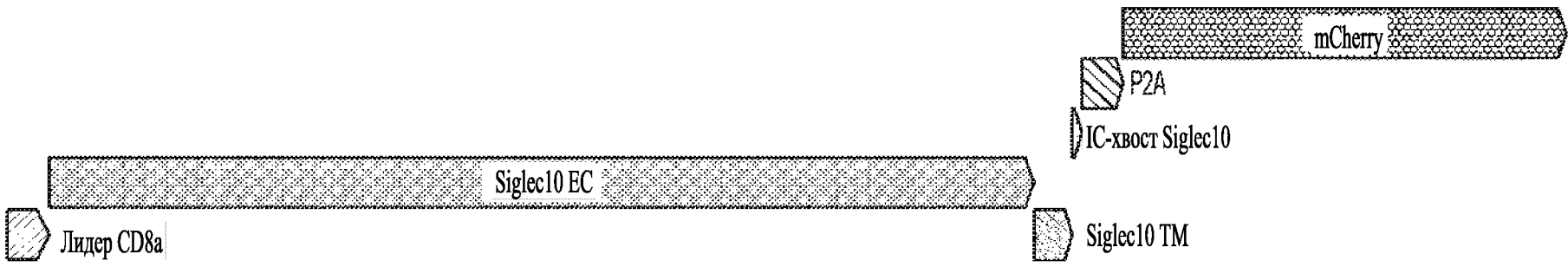
ФИГ. 107

119/204



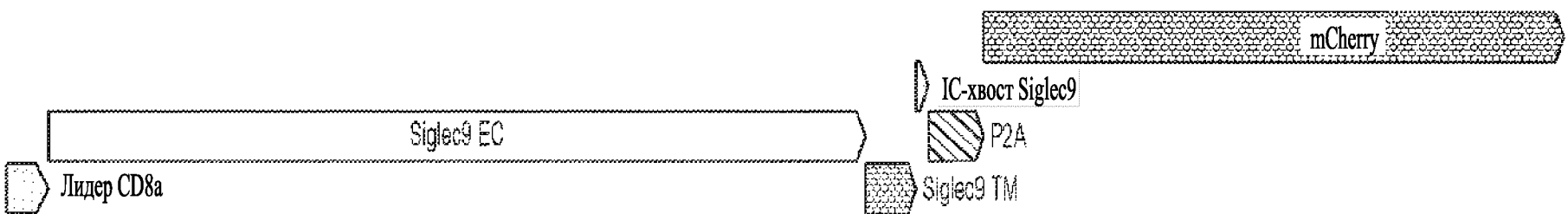
ФИГ. 108

120/204



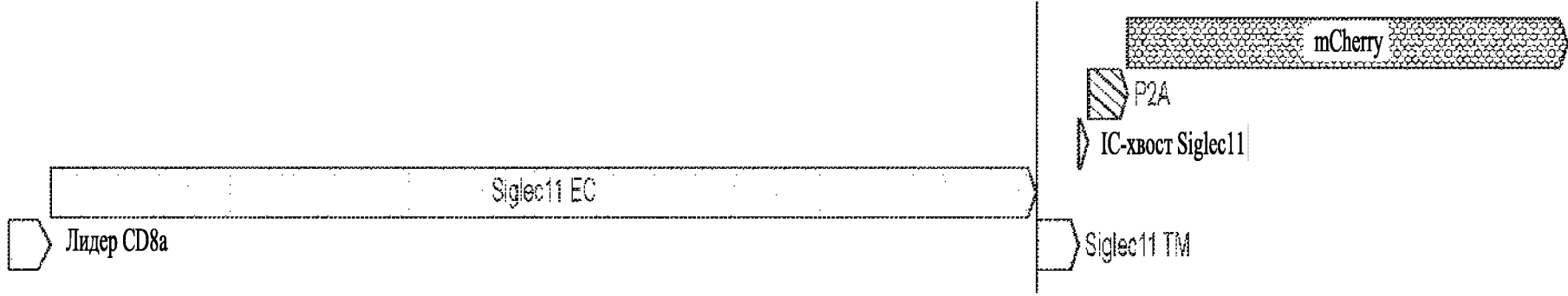
ФИГ. 109

121/204

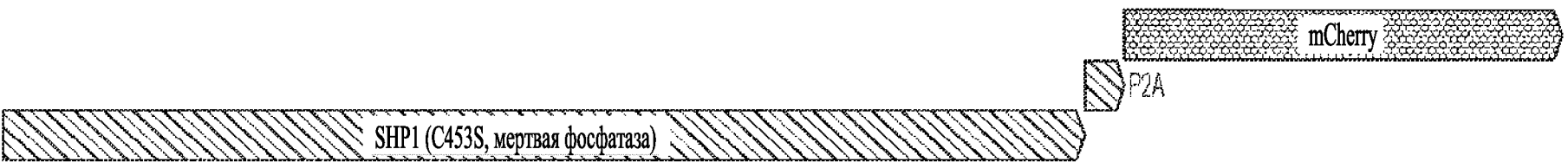


ФИГ. 110

122/204

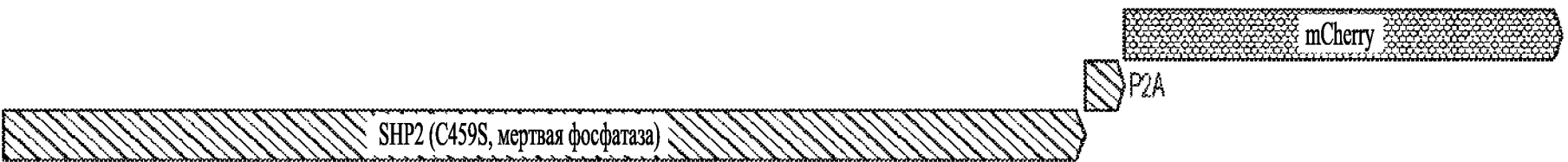


ФИГ. 111



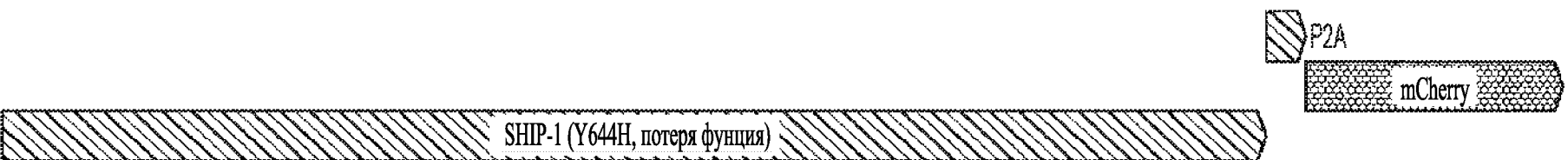
ФИГ. 112

124/204



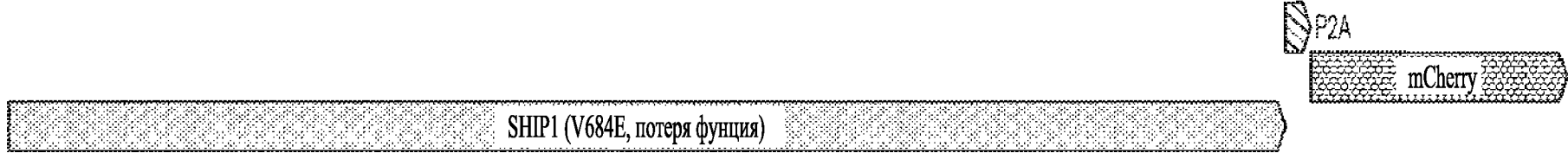
ФИГ. 113

125/204

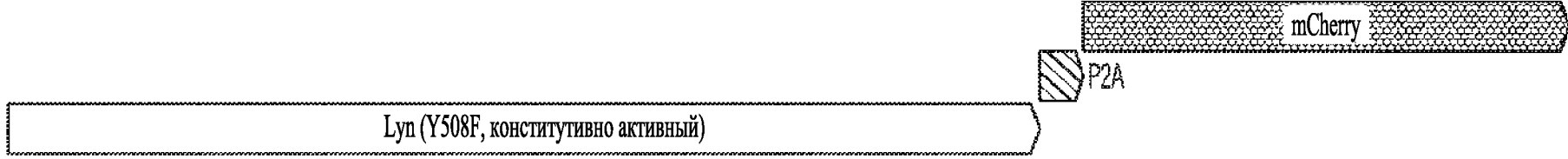


ФИГ. 114

126/204

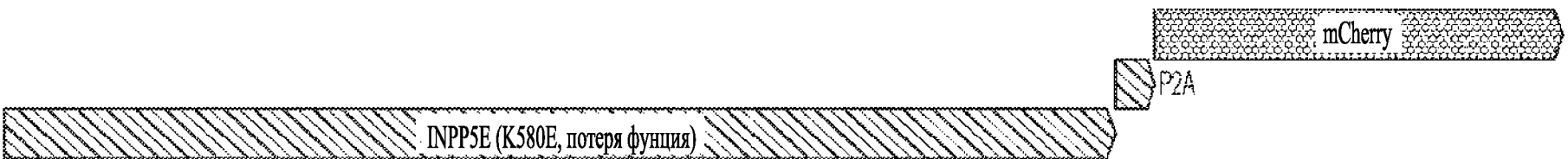


ФИГ. 115



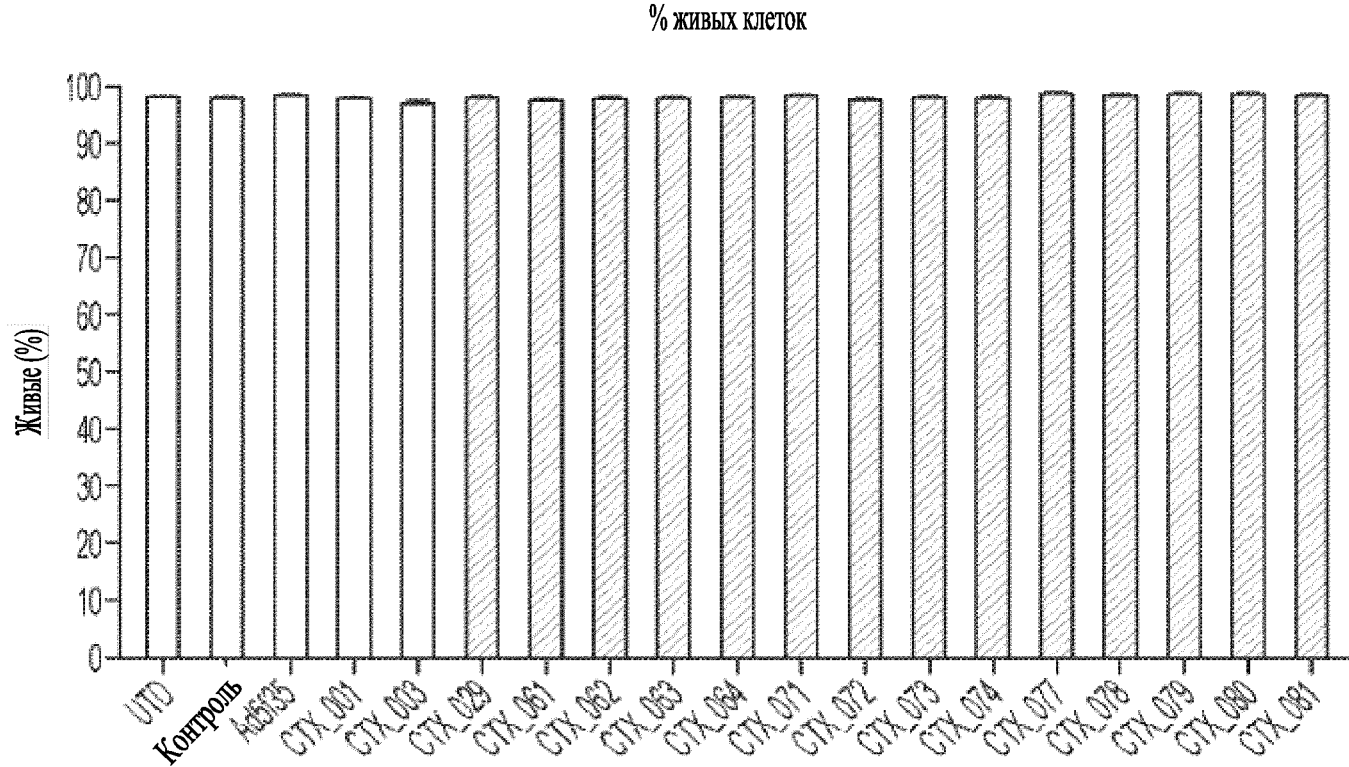
ФИГ. 116

128/204



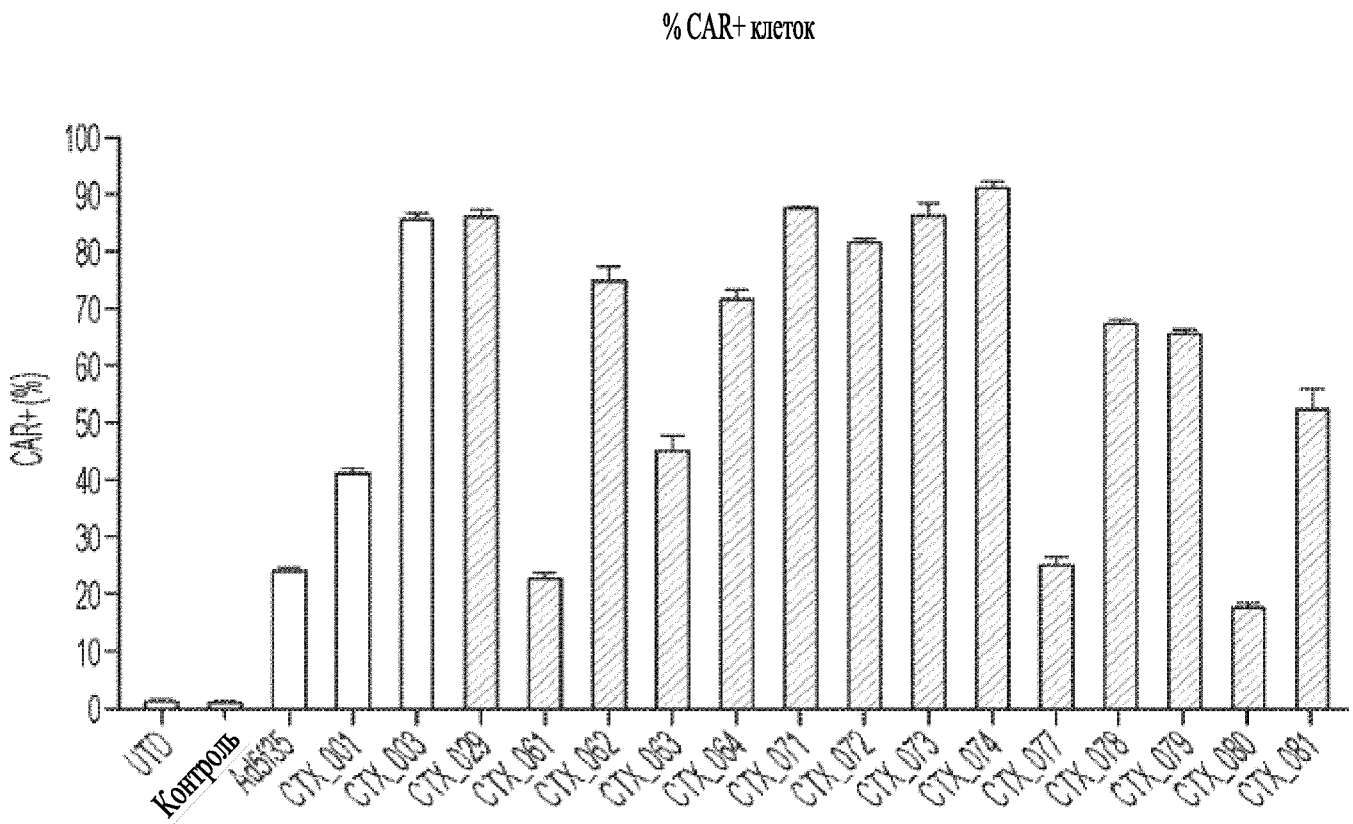
ФИГ. 117

129/204



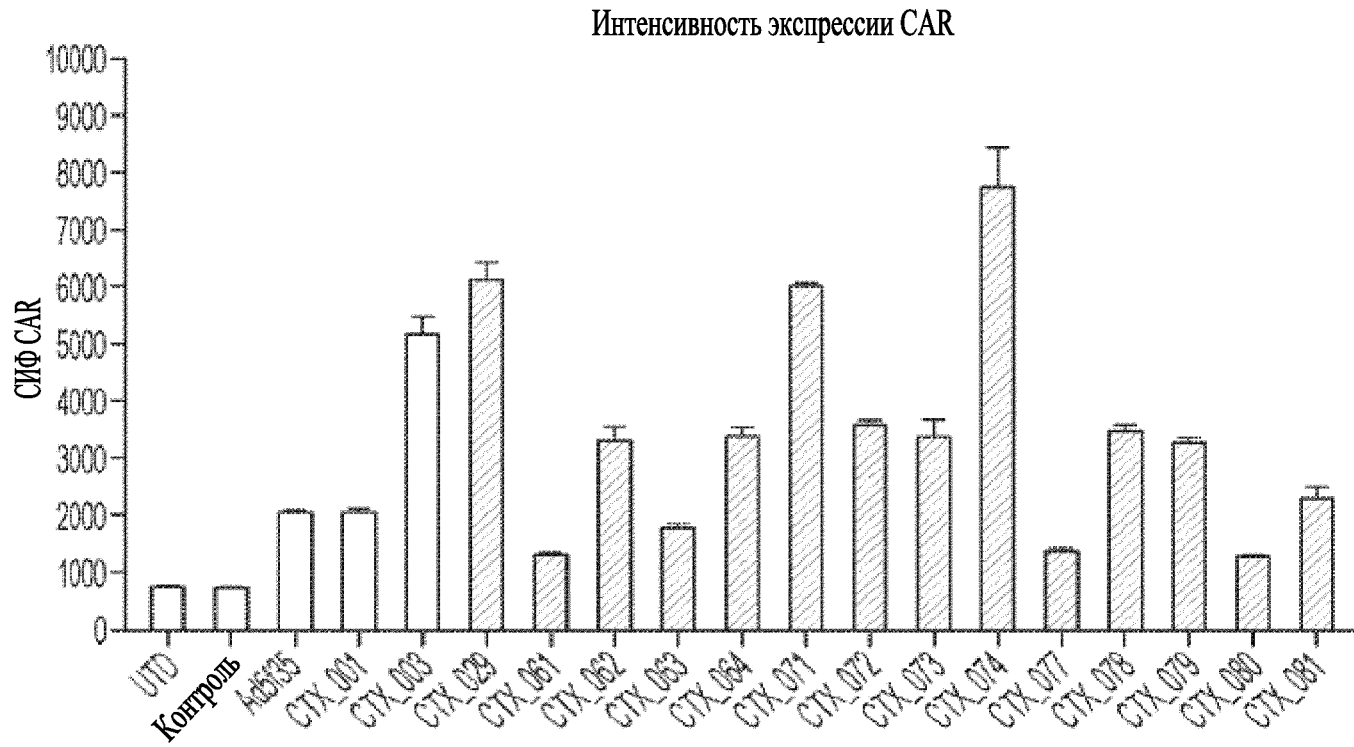
ФИГ. 118

130/204



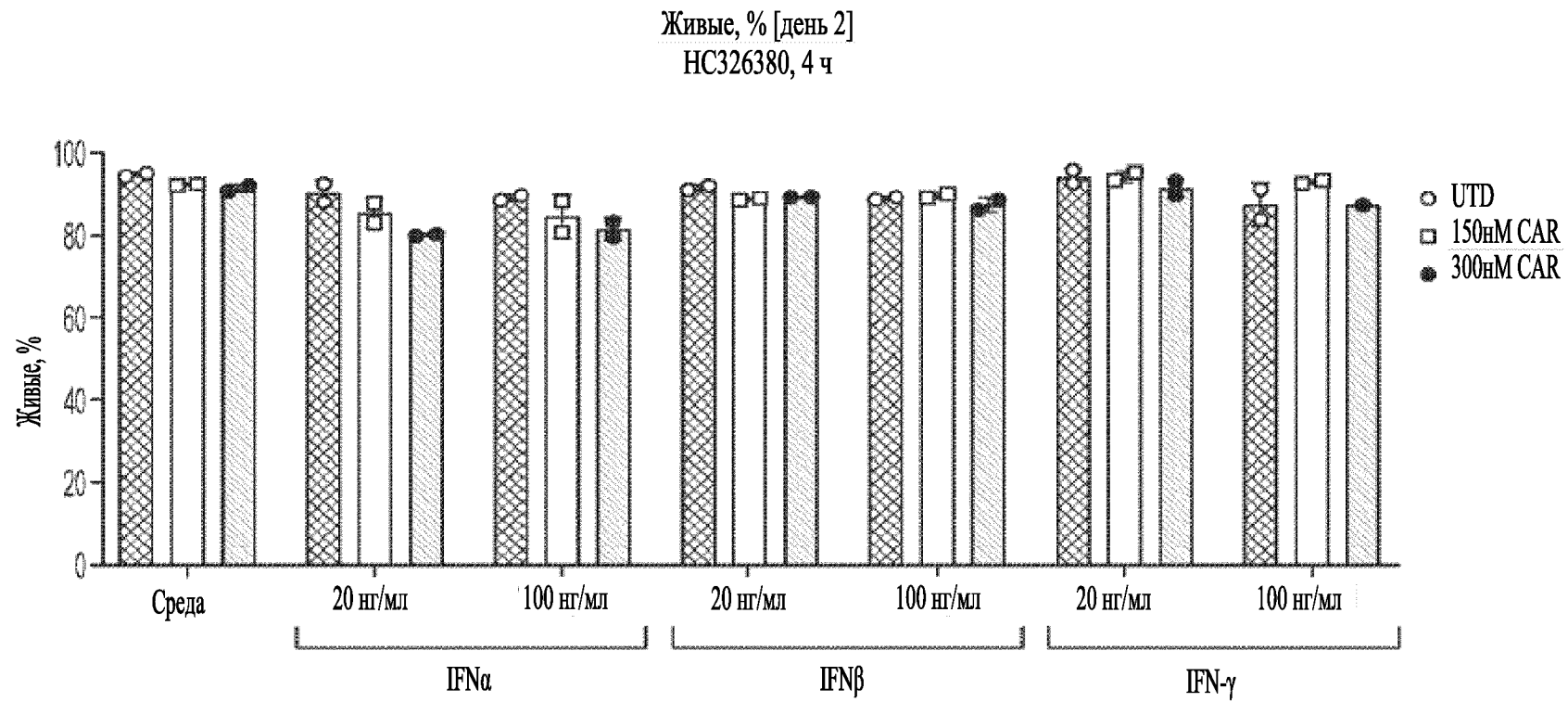
ФИГ. 119

131/204

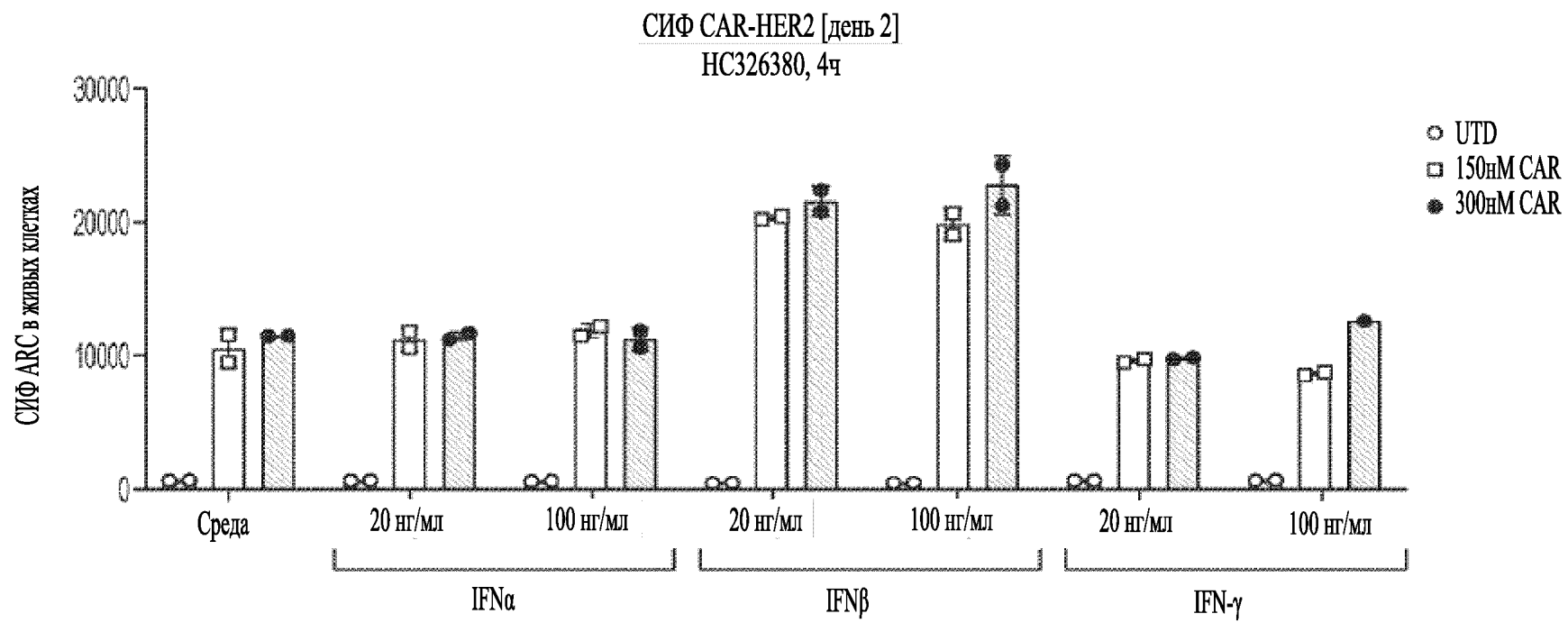


ФИГ. 120

132/204

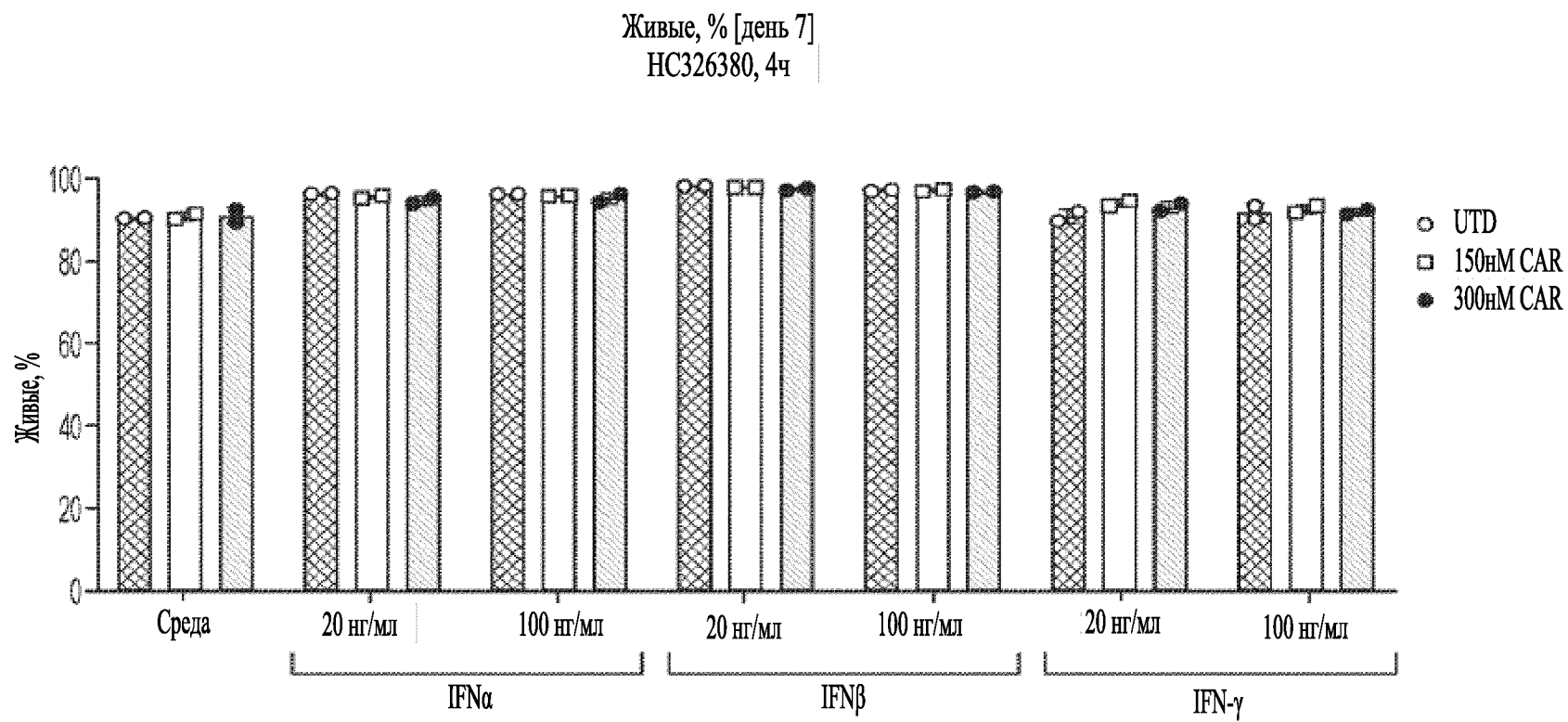


ФИГ. 121А

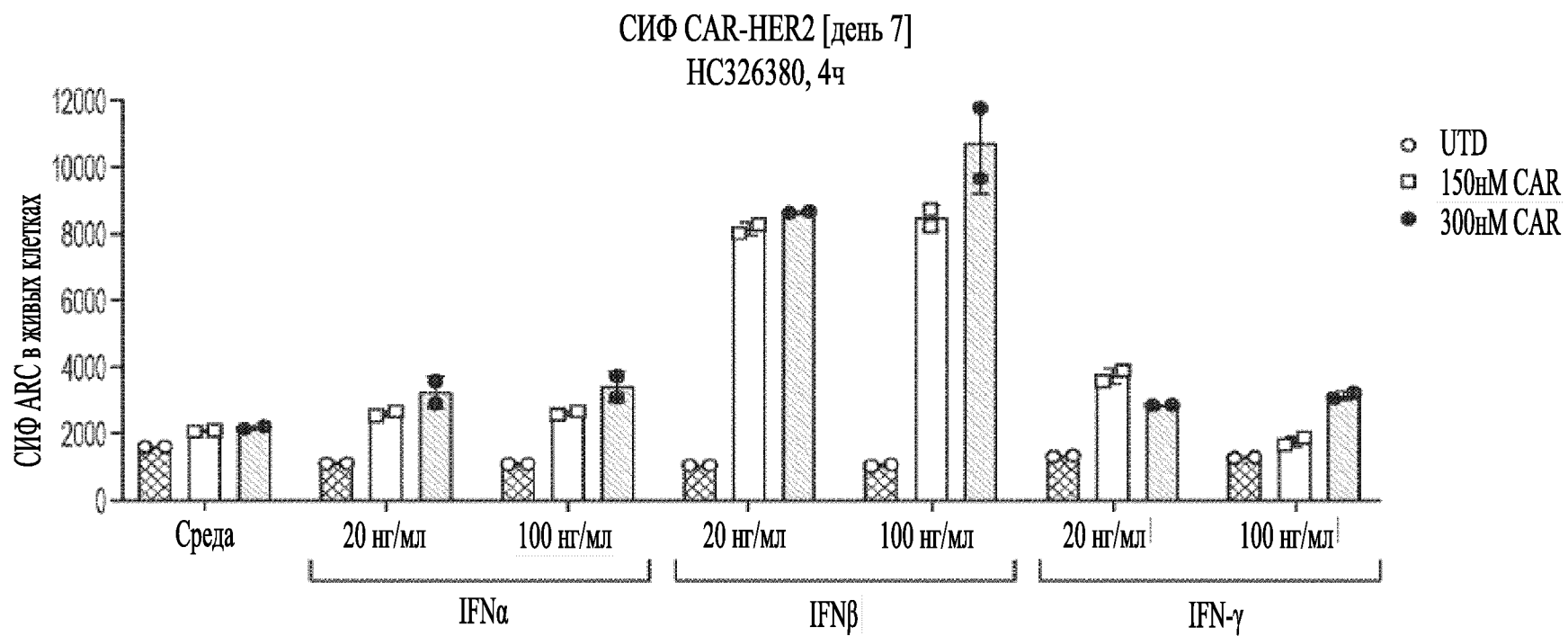


ФИГ. 121В

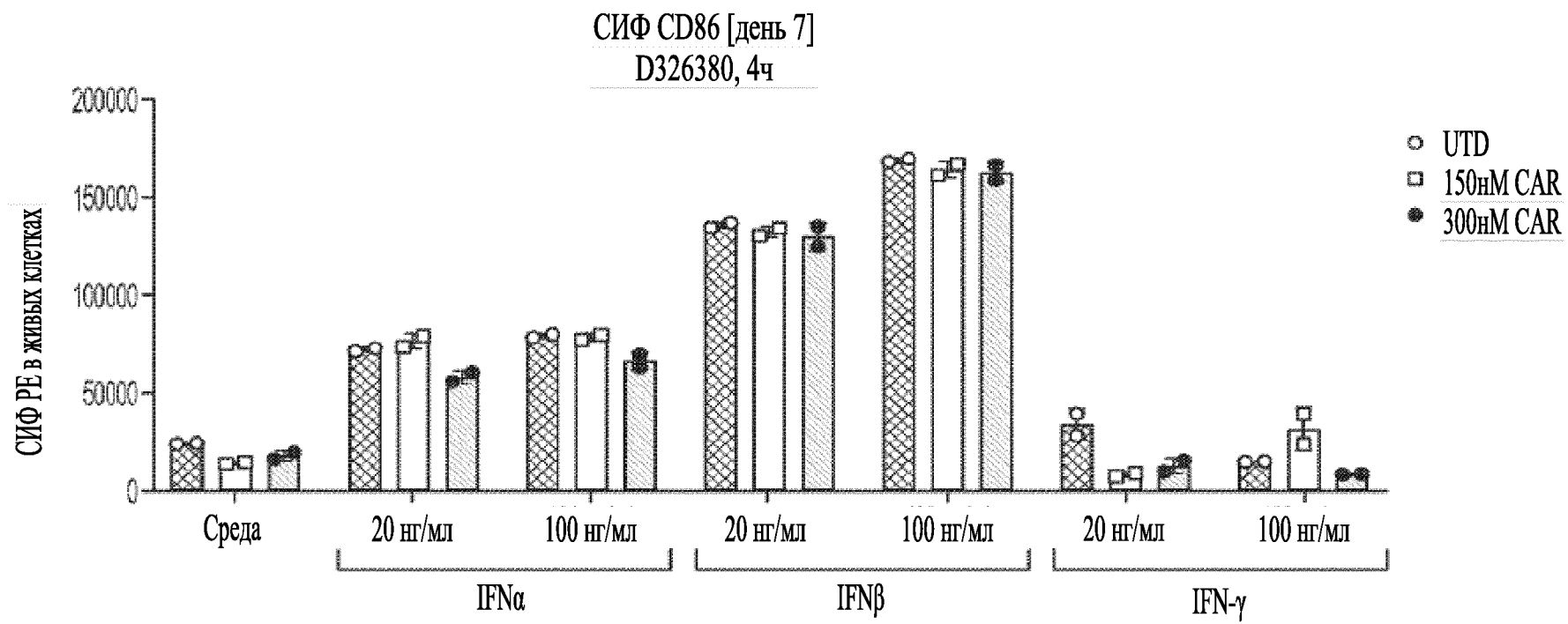
134/204



Фиг. 121С

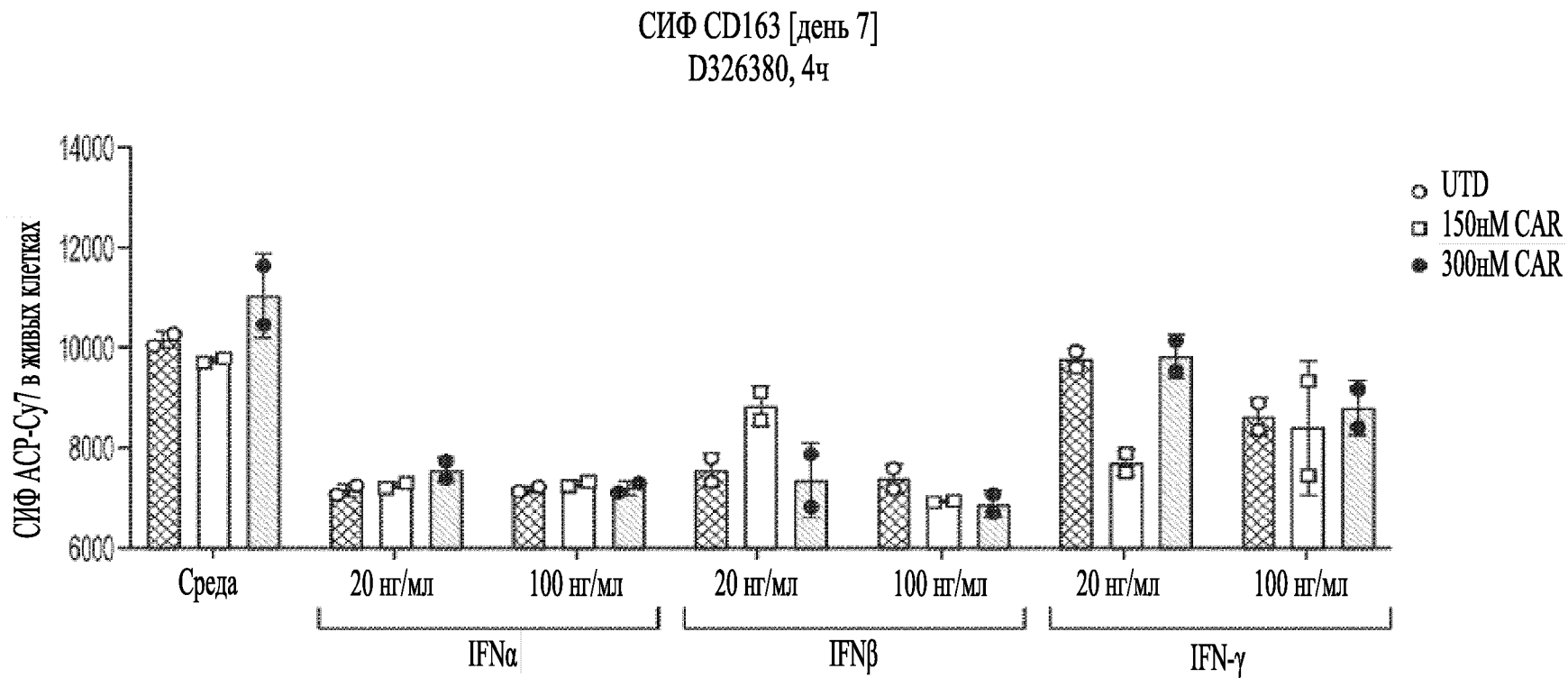


ФИГ. 121D



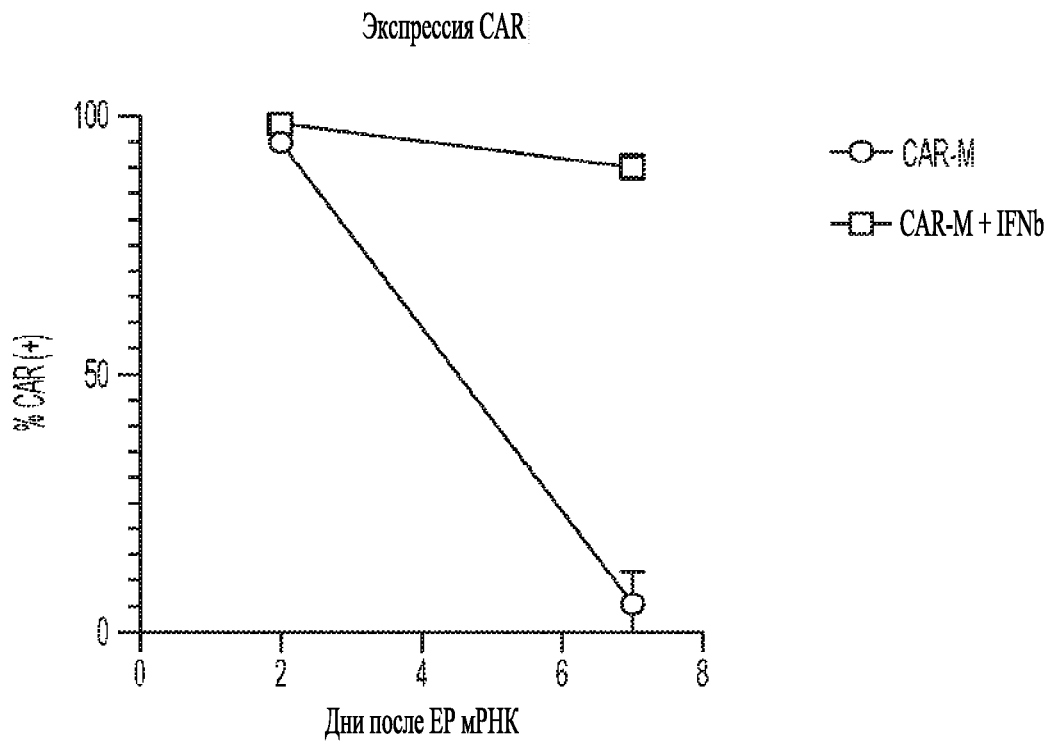
ФИГ. 121E

137/204

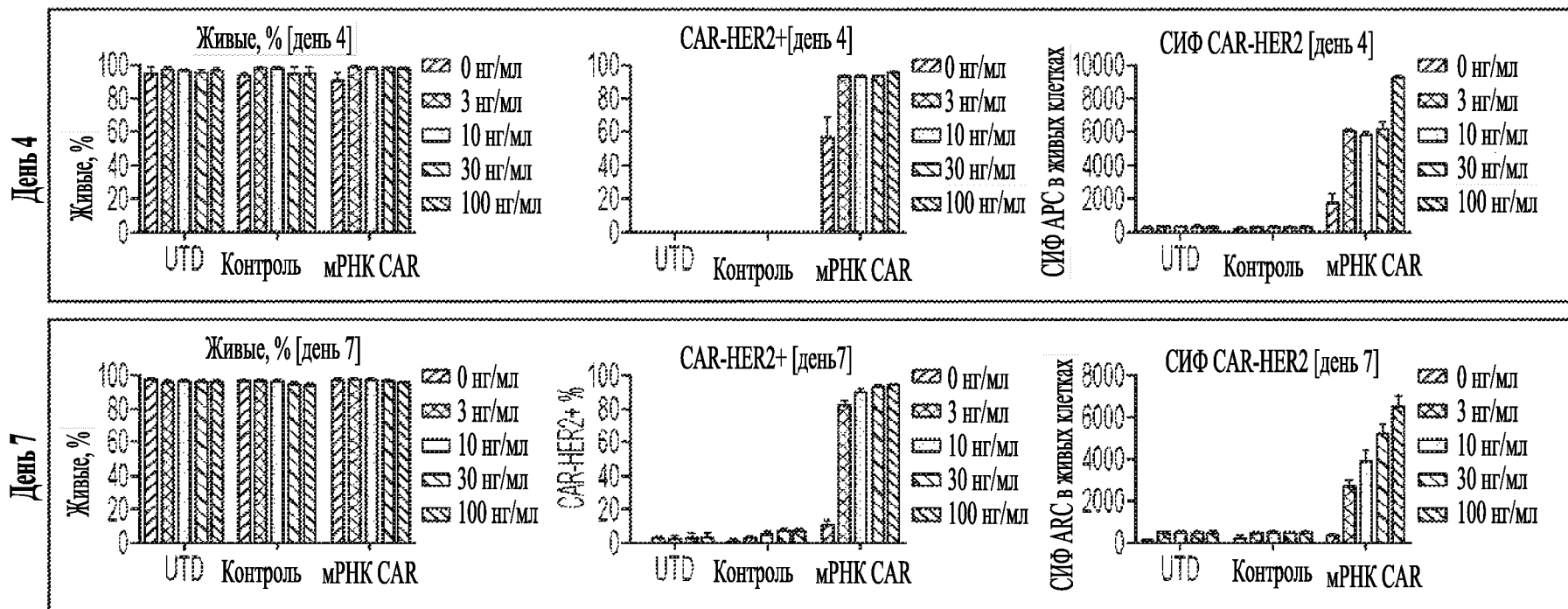


ФИГ. 121F

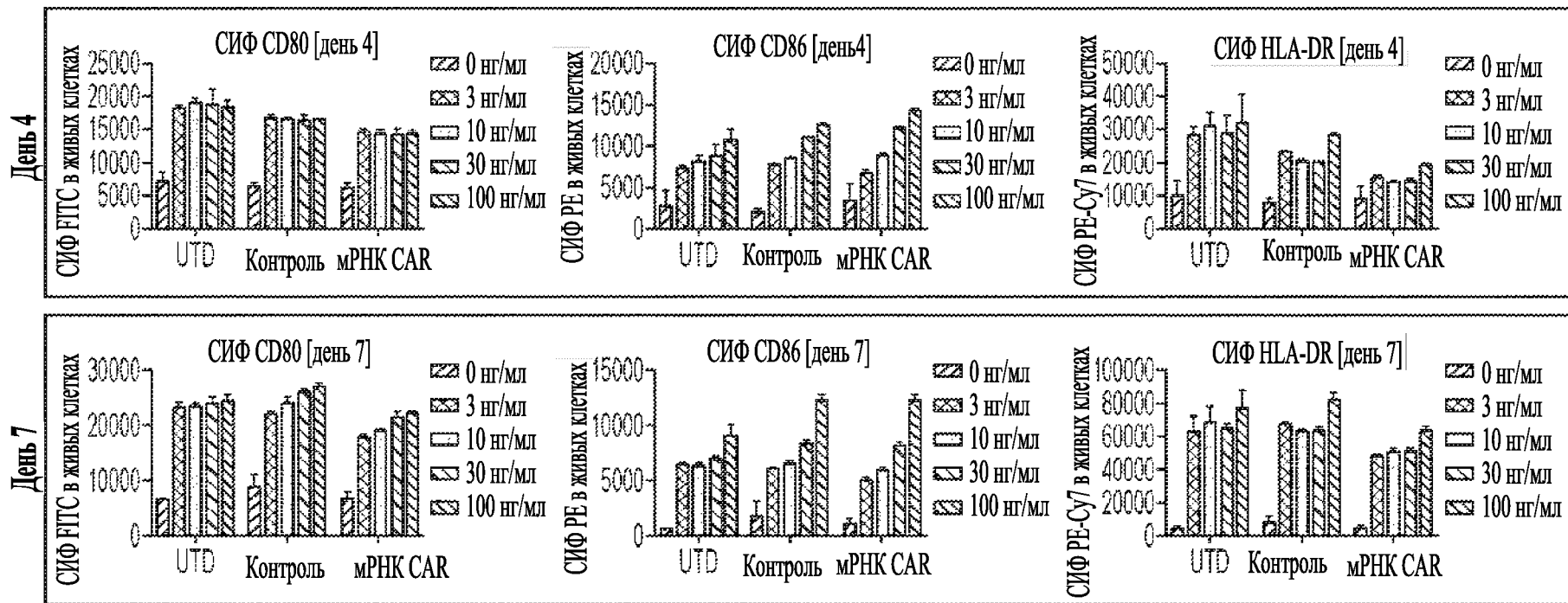
138/204



ФИГ. 122

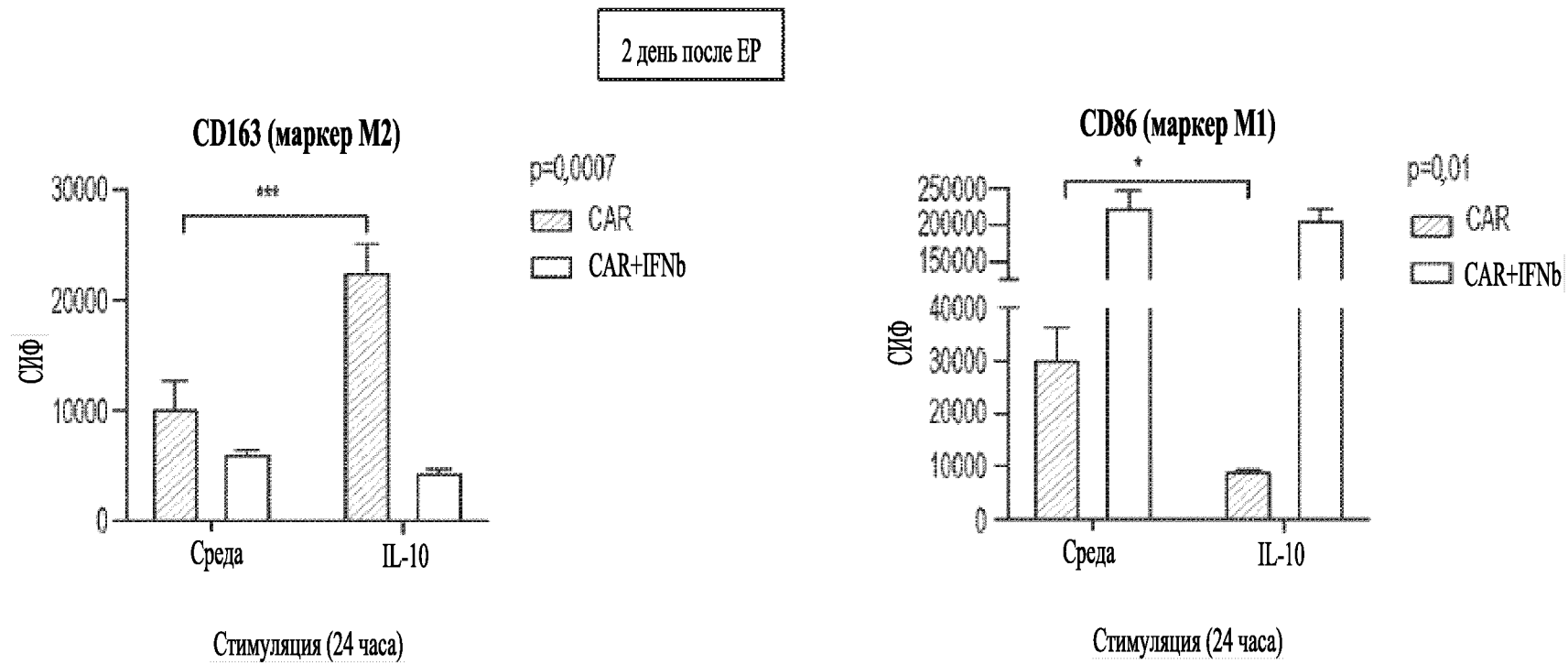


ФИГ. 123А



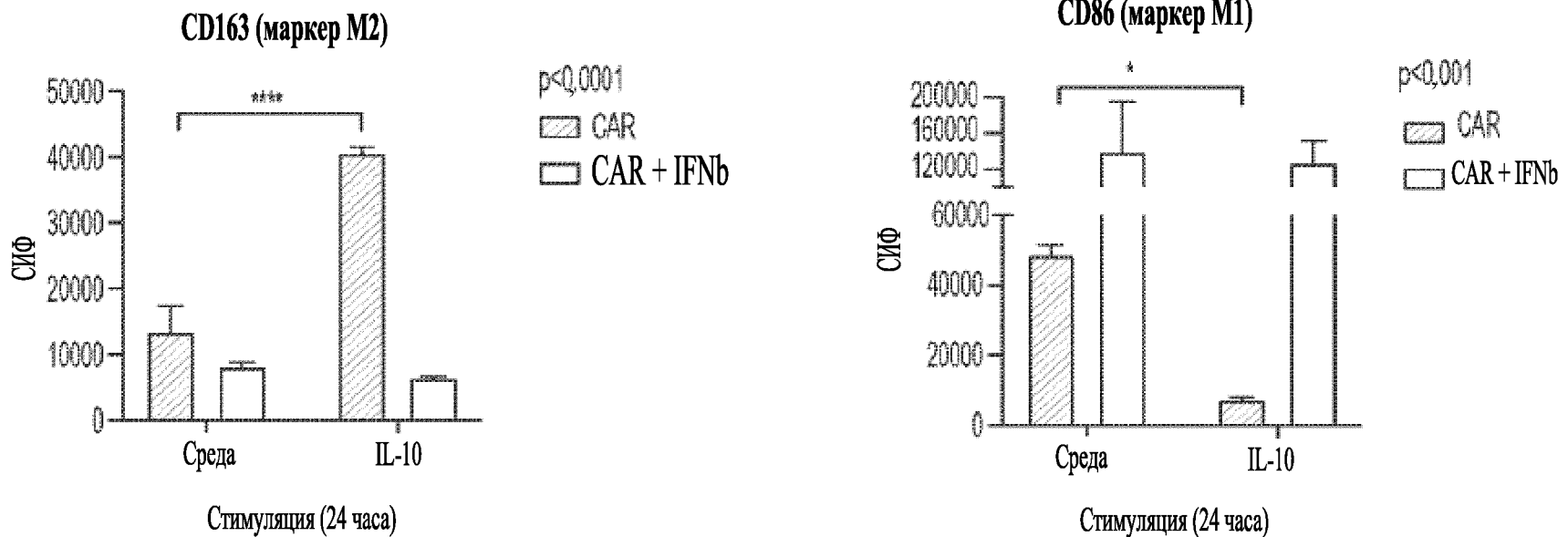
ФИГ. 123В

141/204

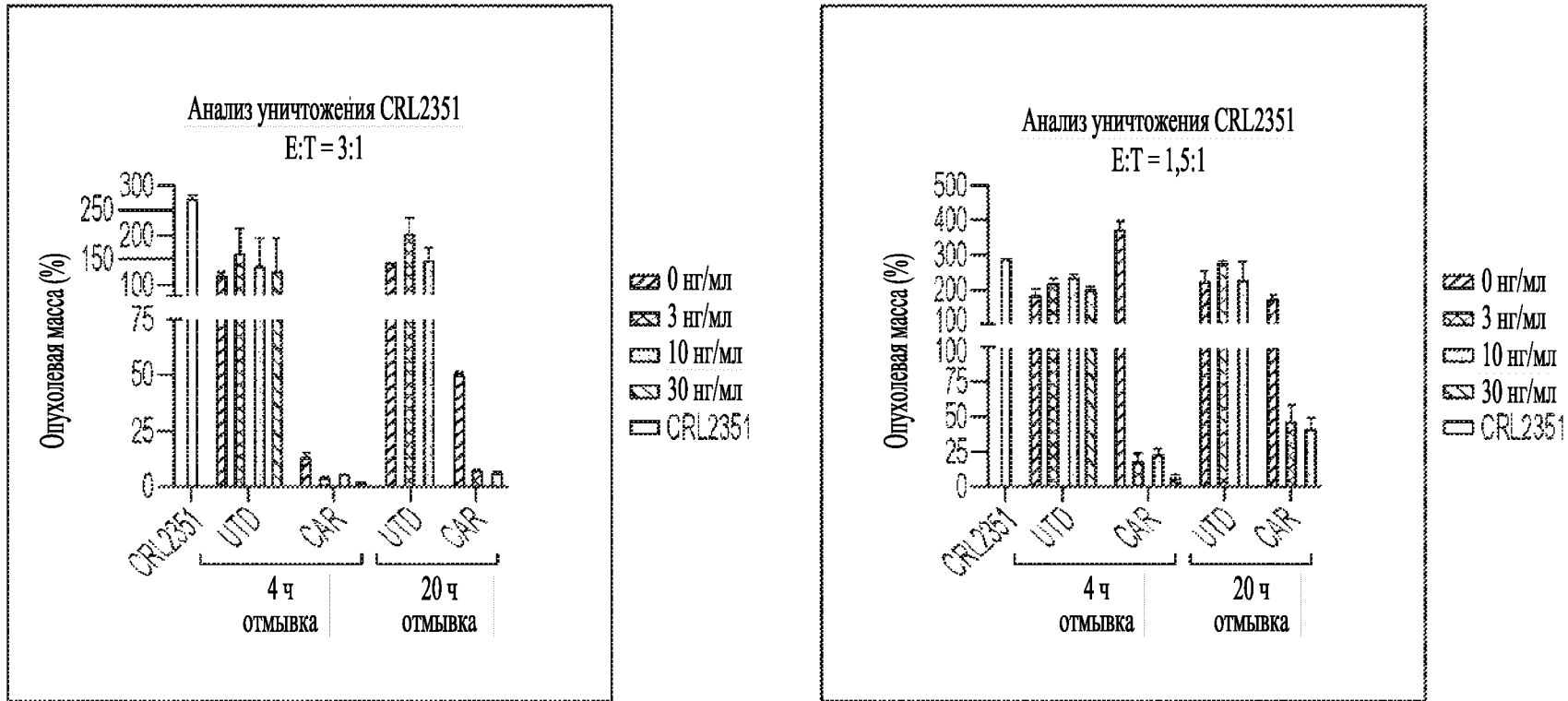


ФИГ. 124А

7 день после ЕР

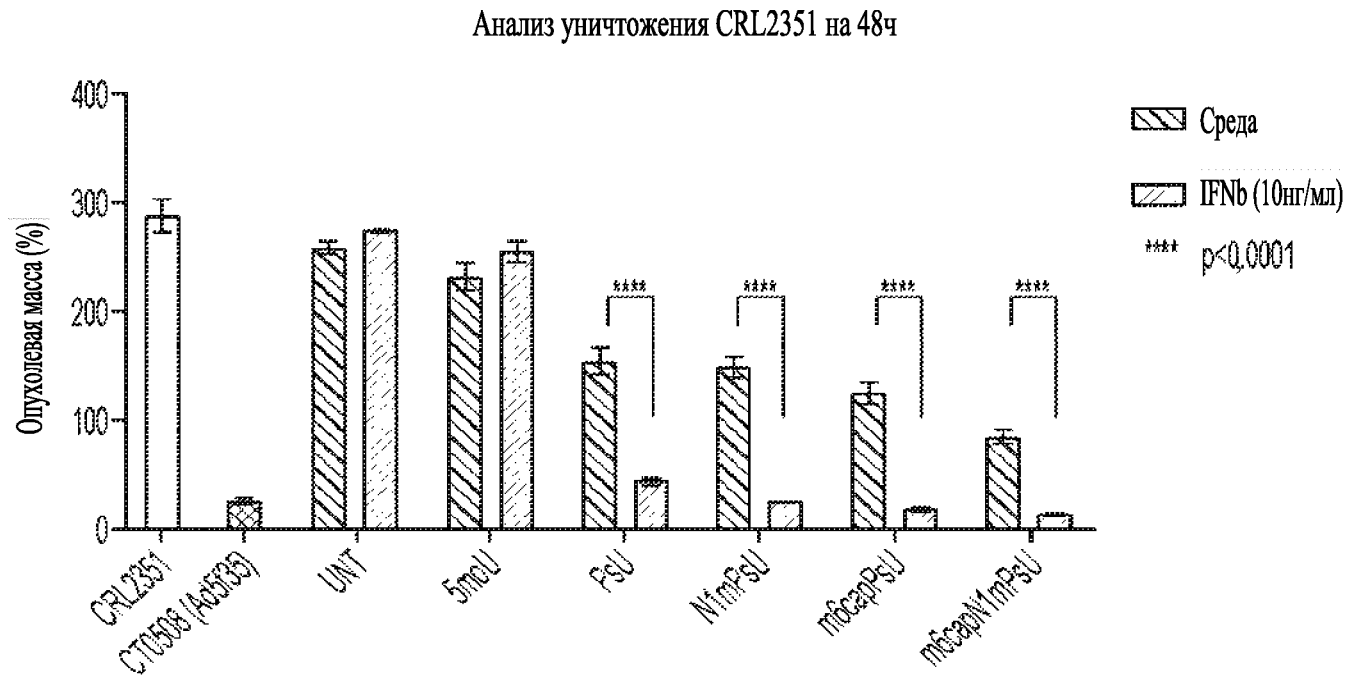


ФИГ. 124В

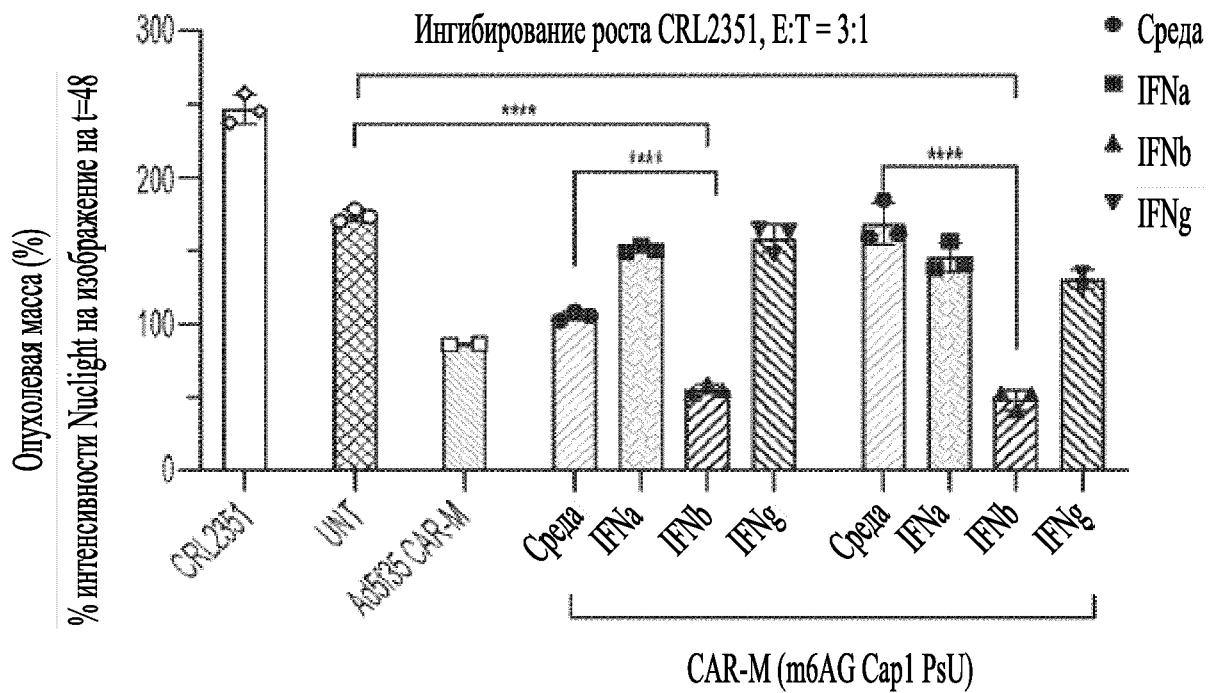


ФИГ. 125А

144/204

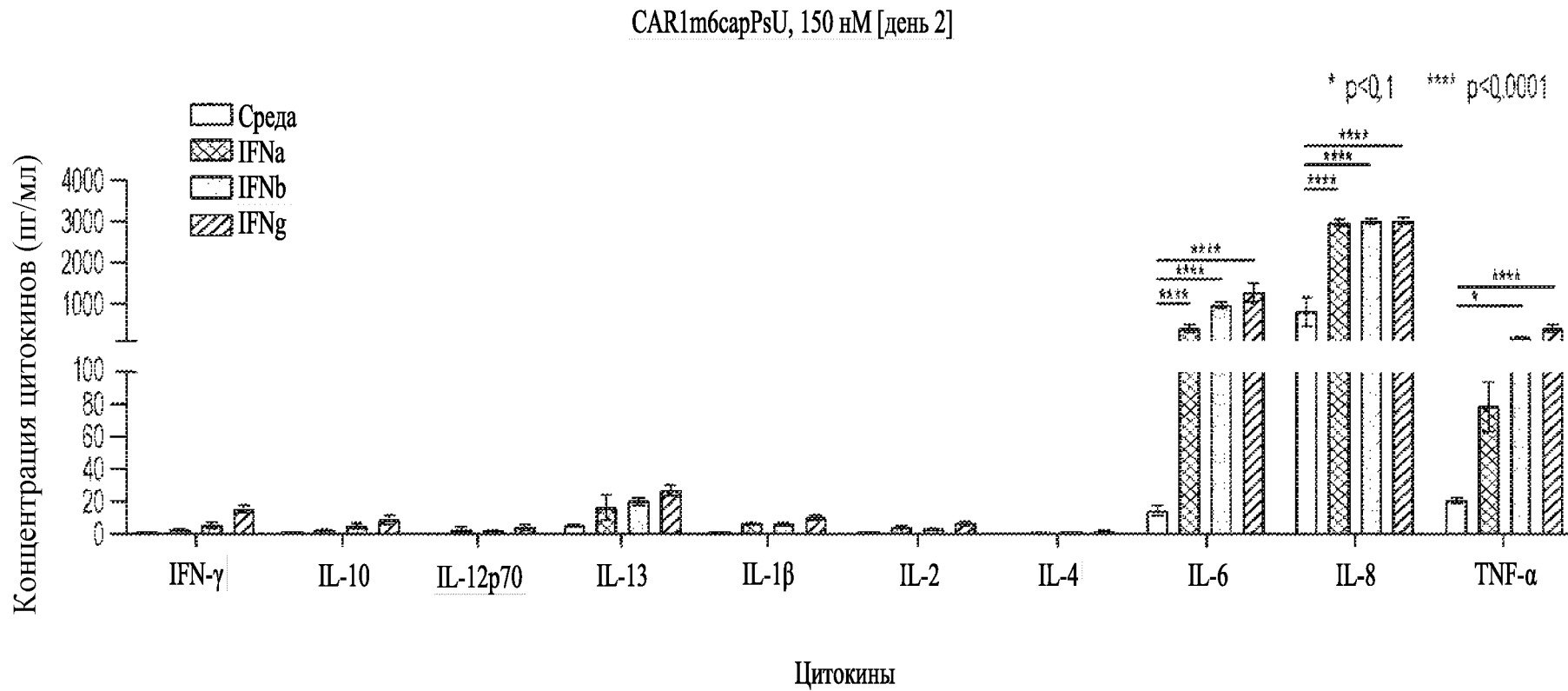


ФИГ. 125В



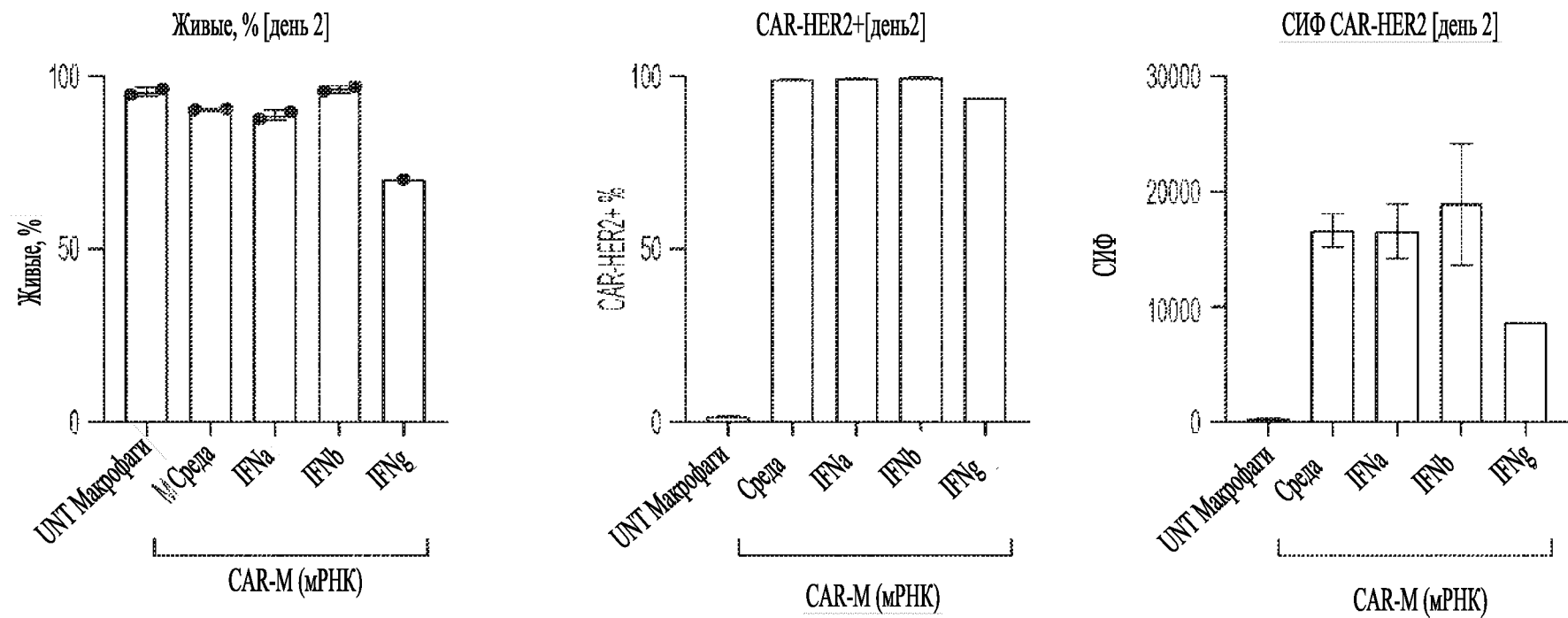
ФИГ. 125C

146/204



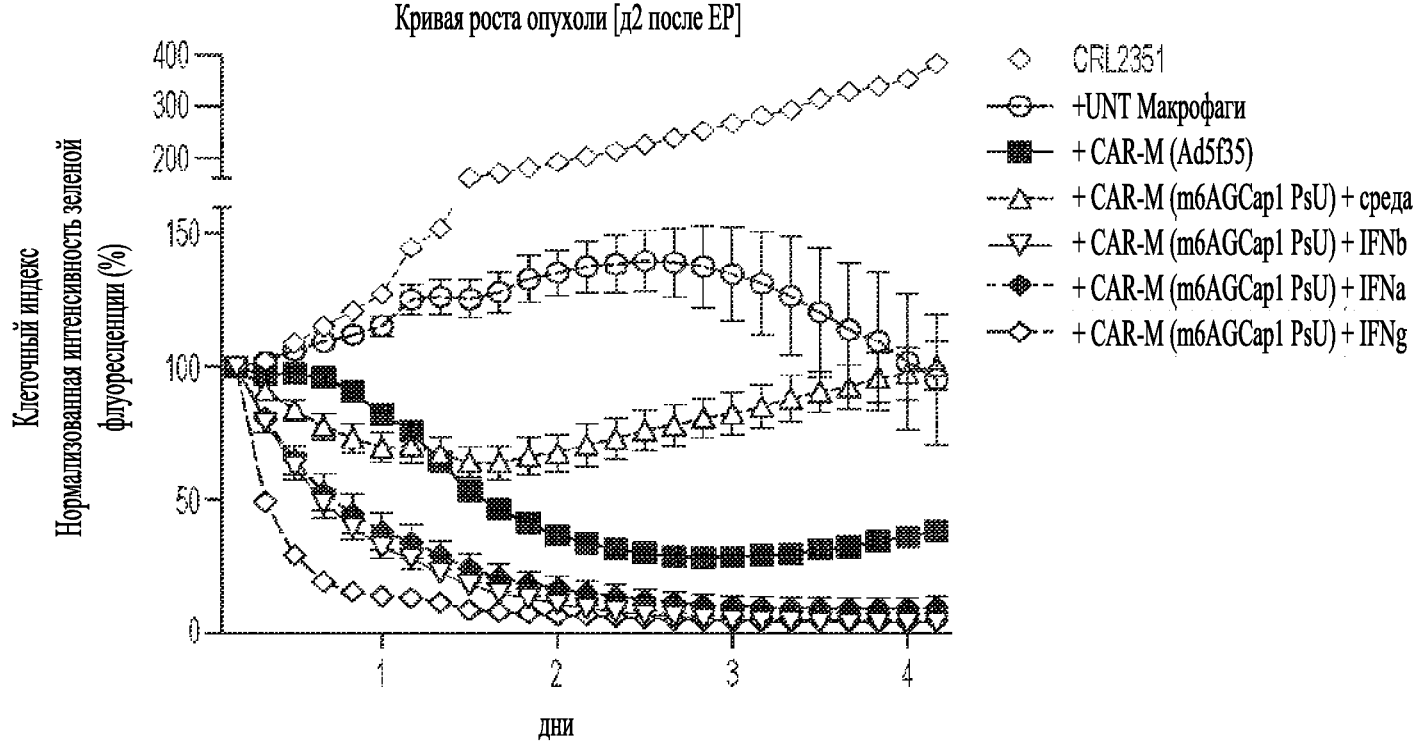
ФИГ. 126

147/204



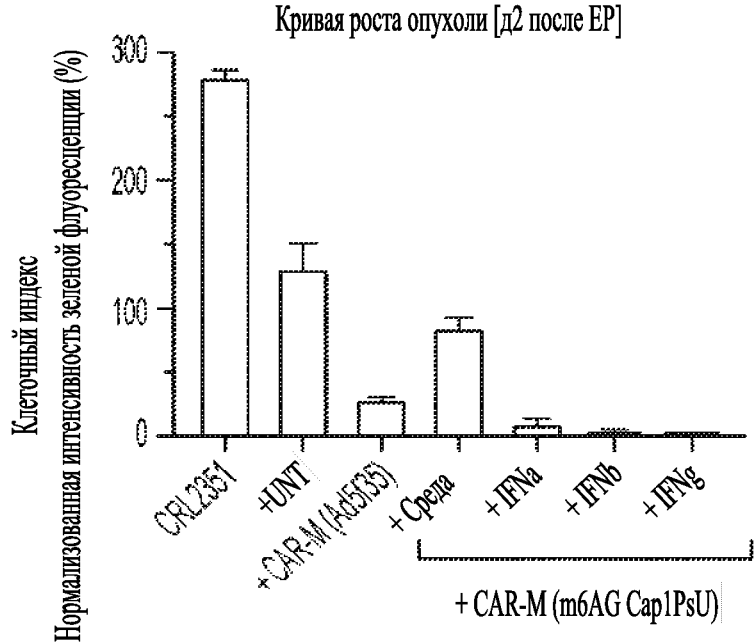
ФИГ. 127A

148/204

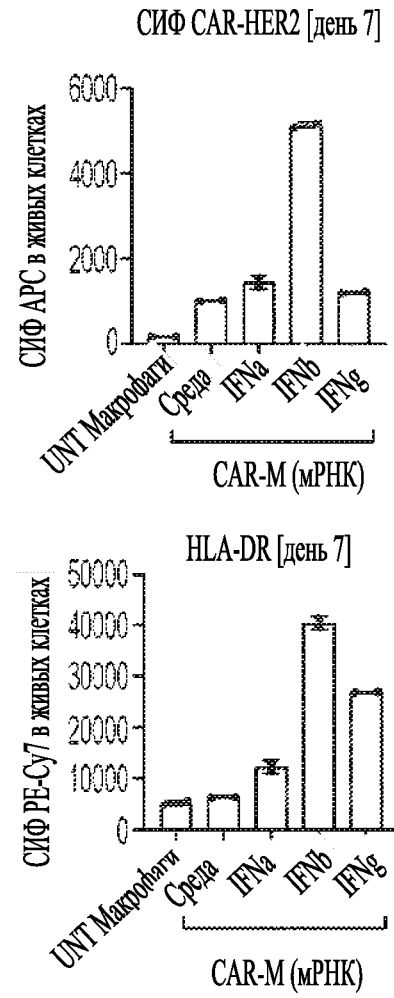
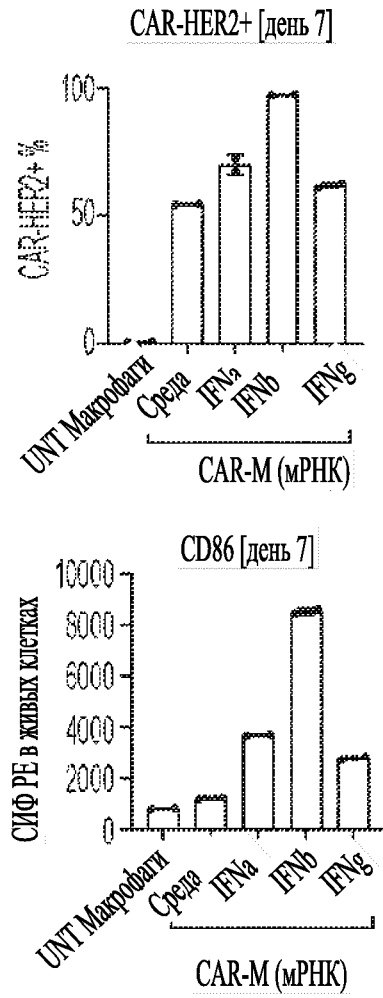
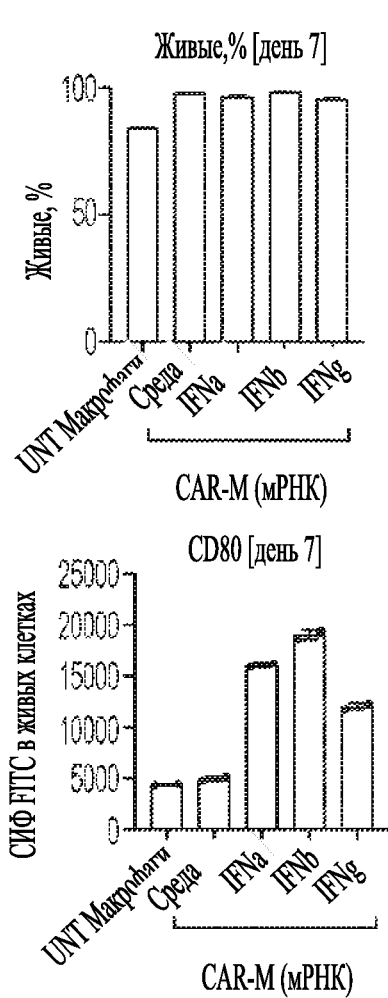


ФИГ. 127В

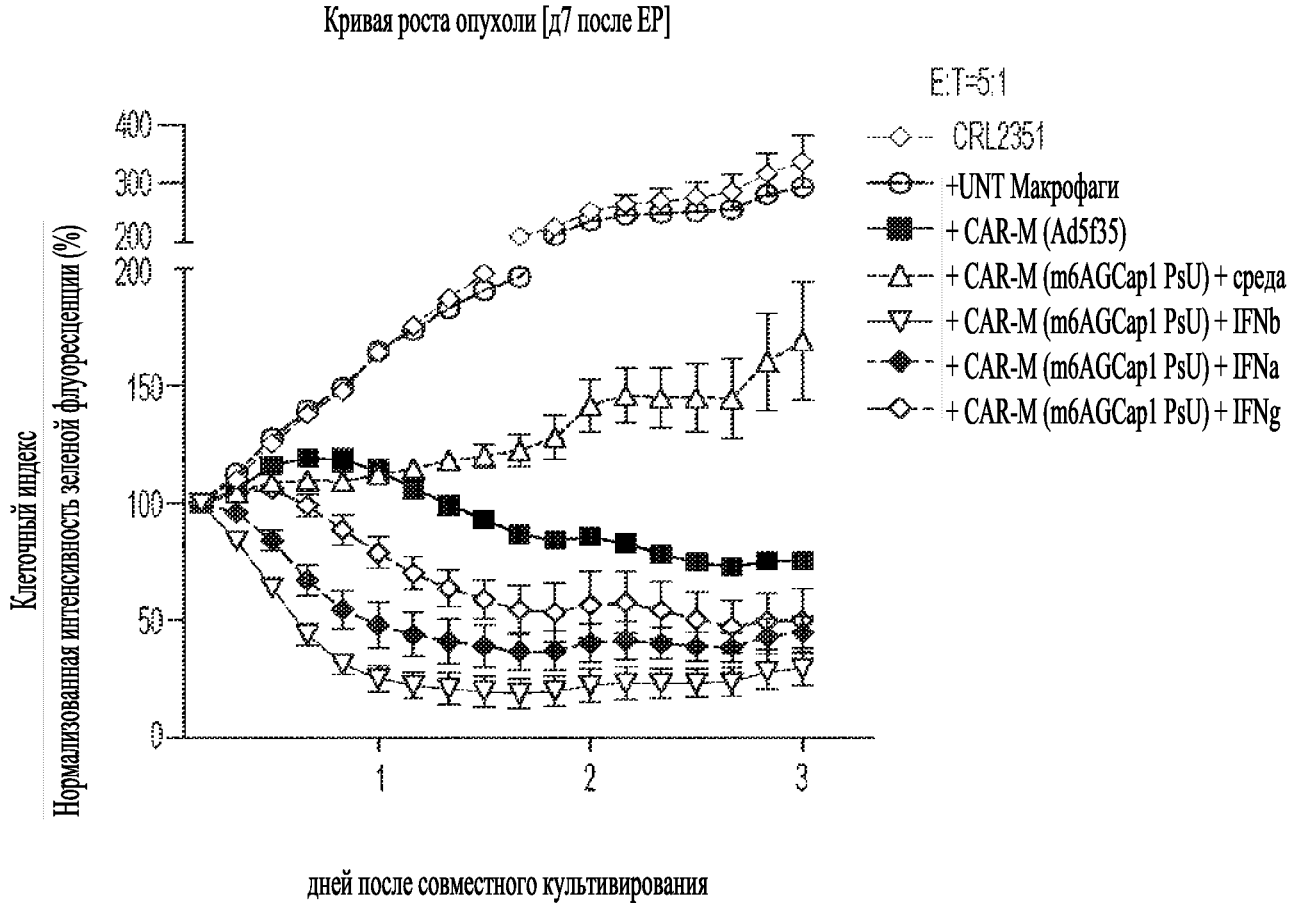
149/204



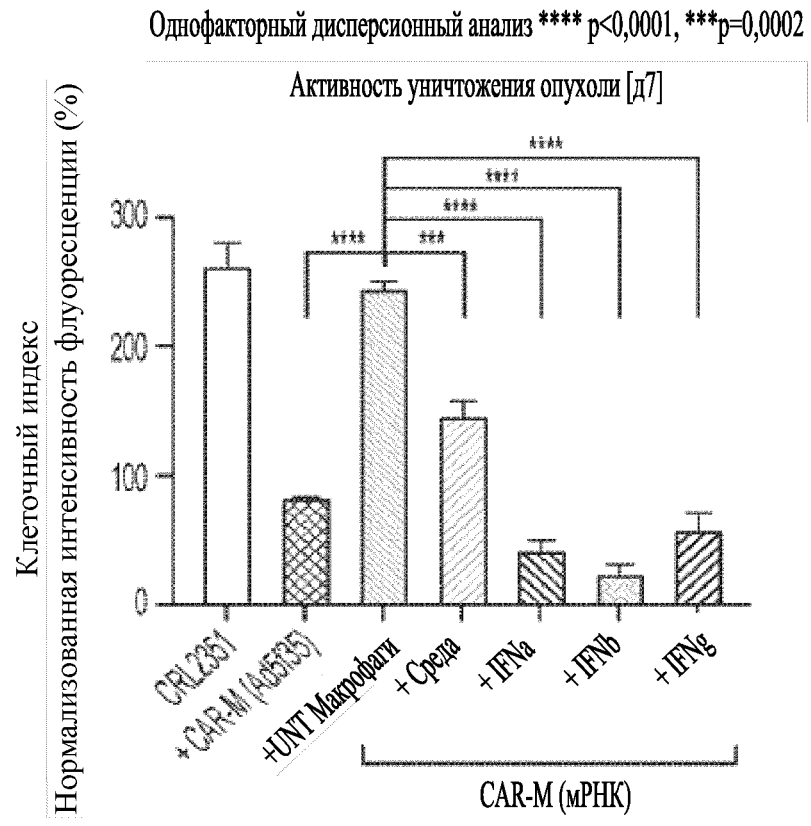
ФИГ. 127C



ФИГ. 128А

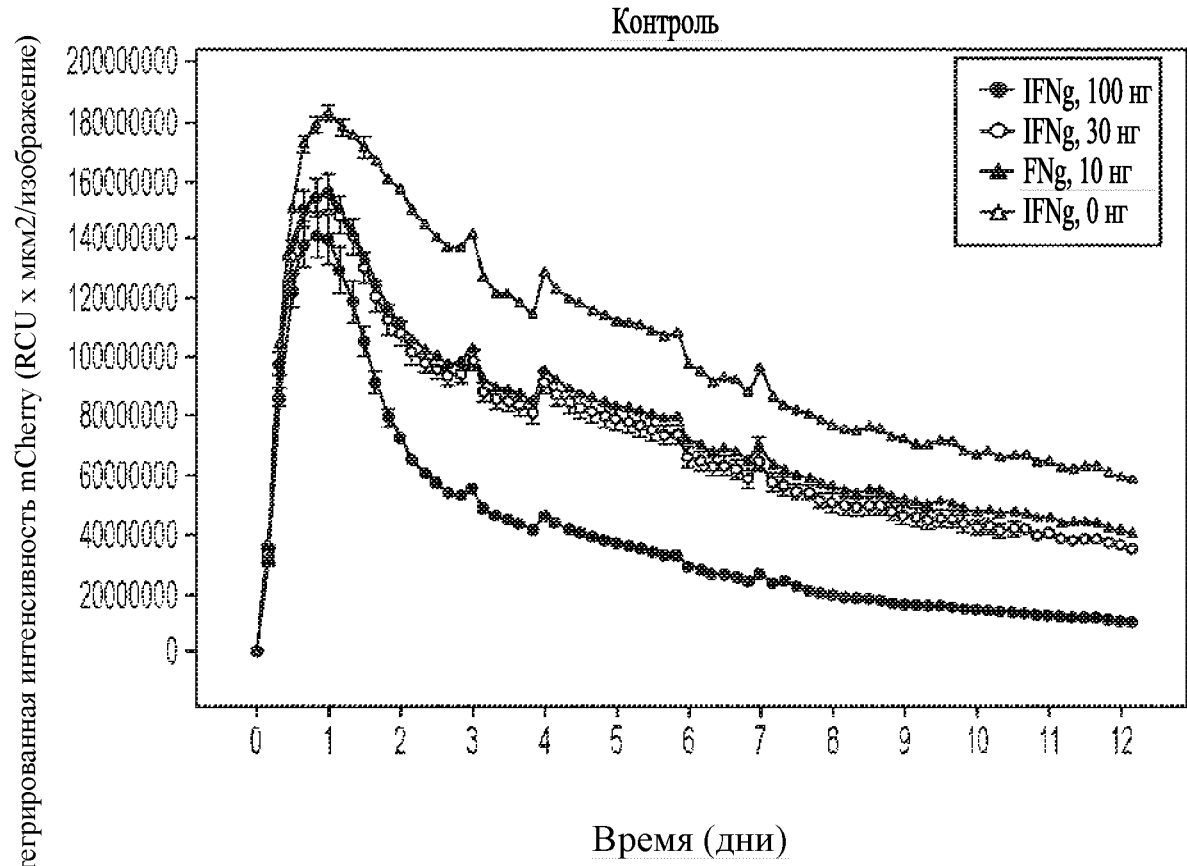


ФИГ. 128В



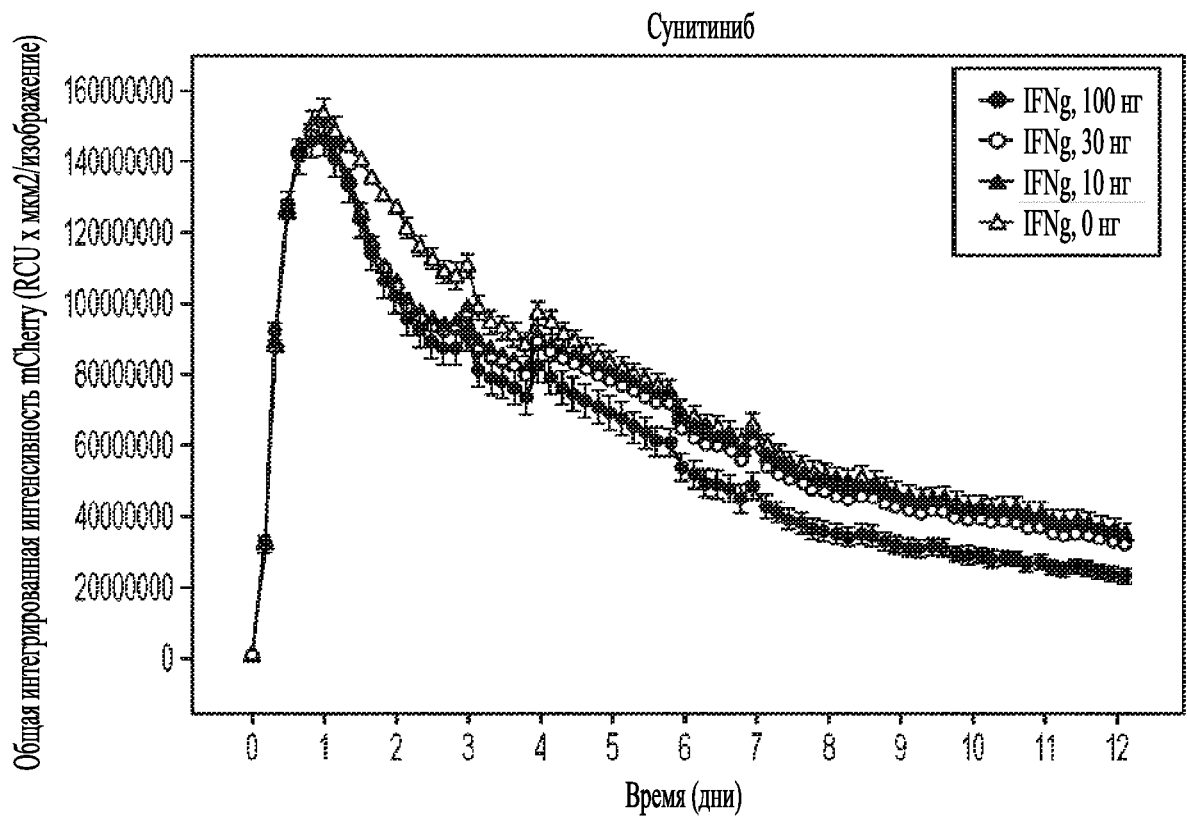
ФИГ. 128С

153/204



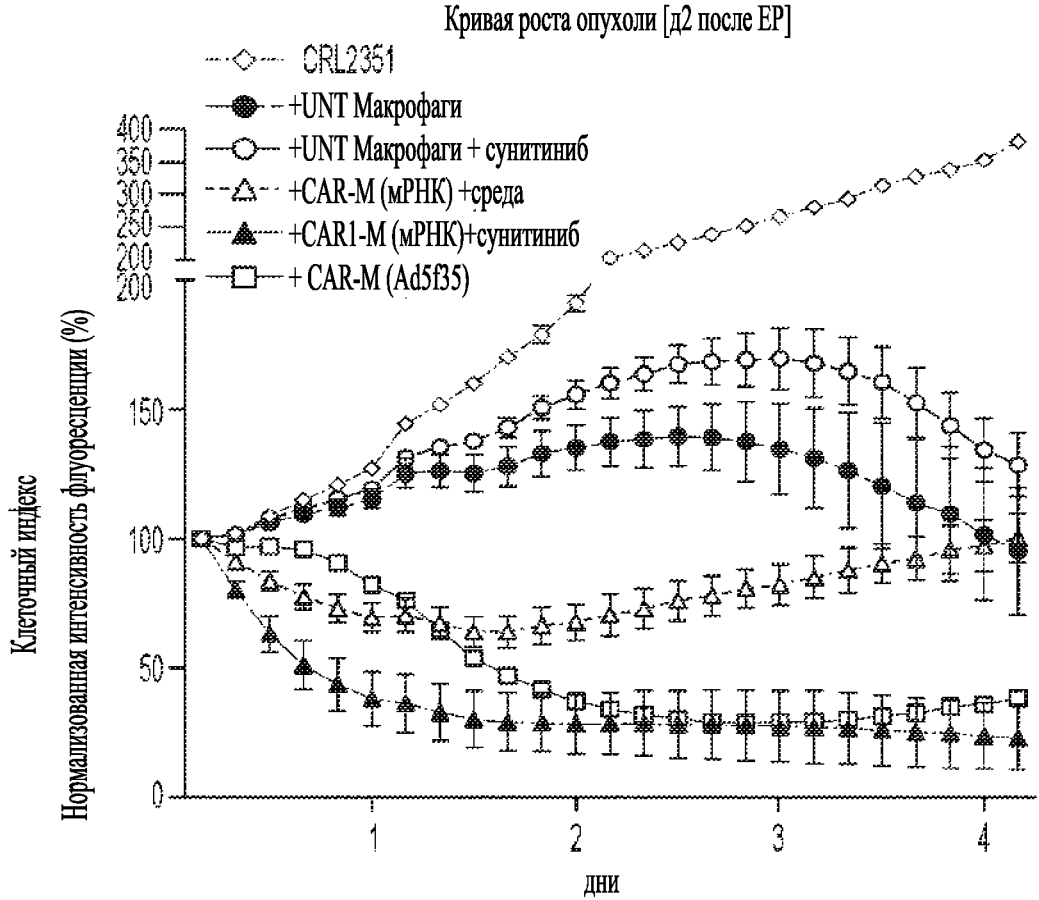
ФИГ. 129

154/204



ФИГ. 130А

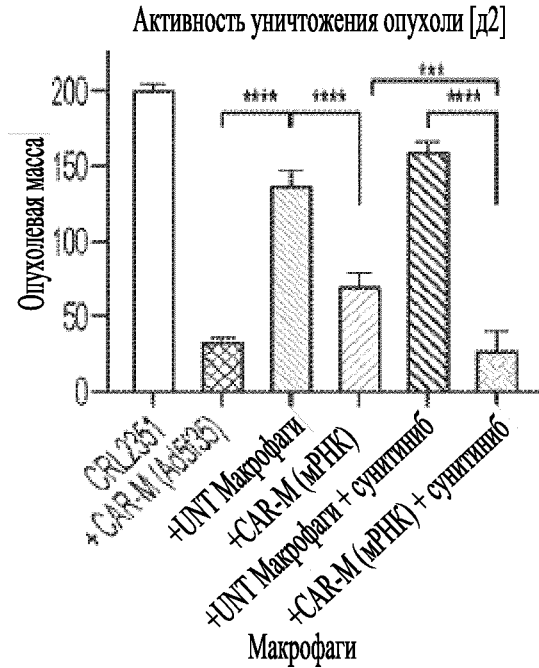
155/204



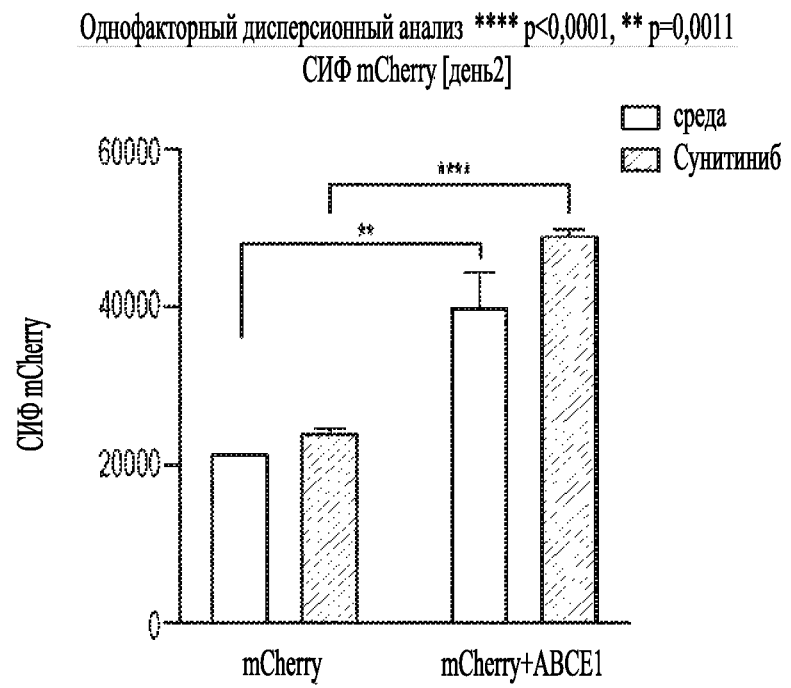
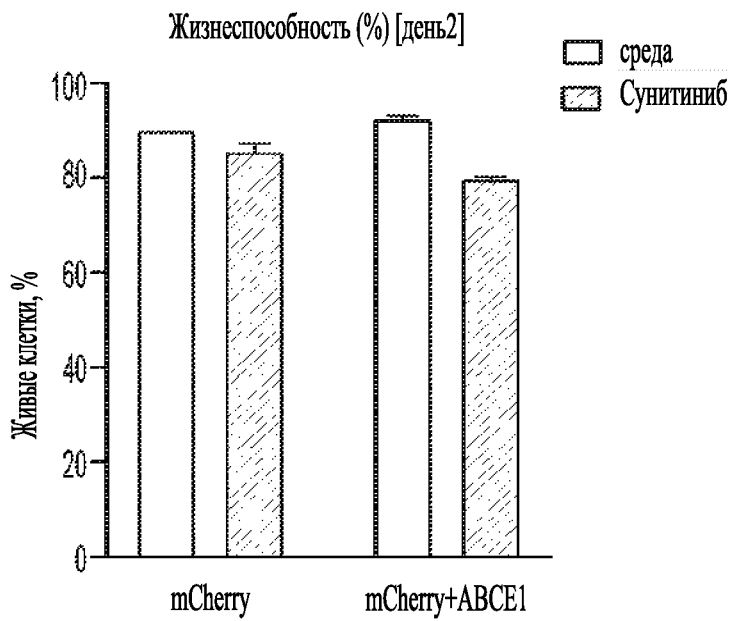
ФИГ. 130В

156/204

Однофакторный дисперсионный анализ **** $p < 0,0001$, *** $p = 0,0005$

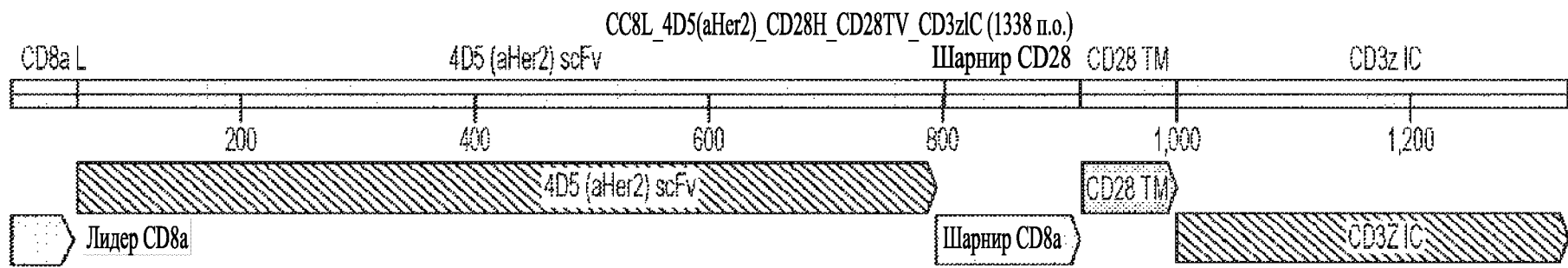


ФИГ. 130С



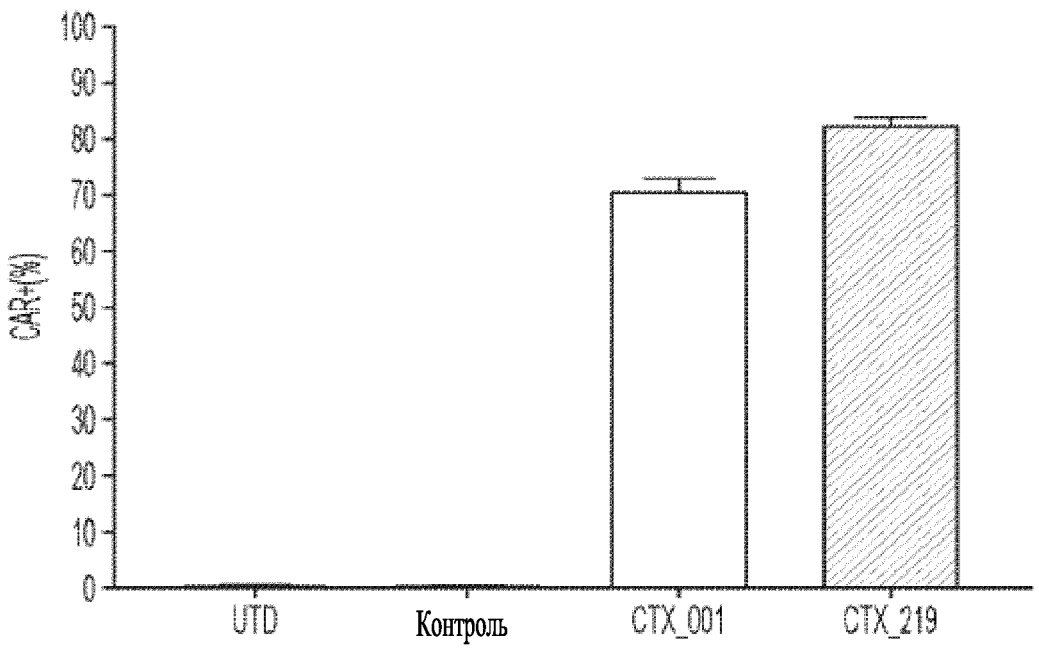
ФИГ. 131

158/204

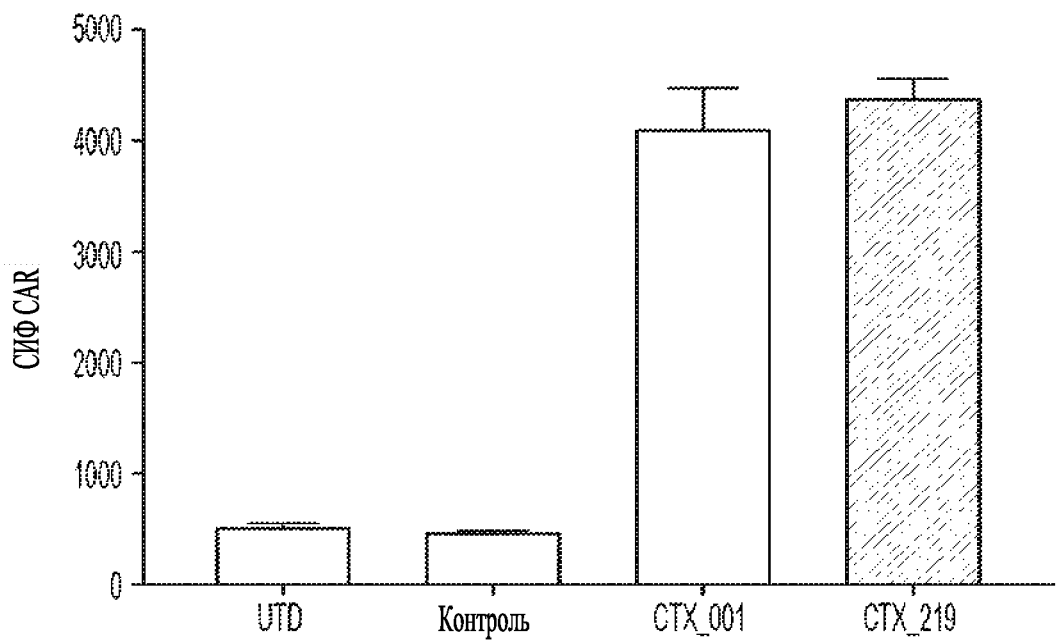


ФИГ. 132

159/204

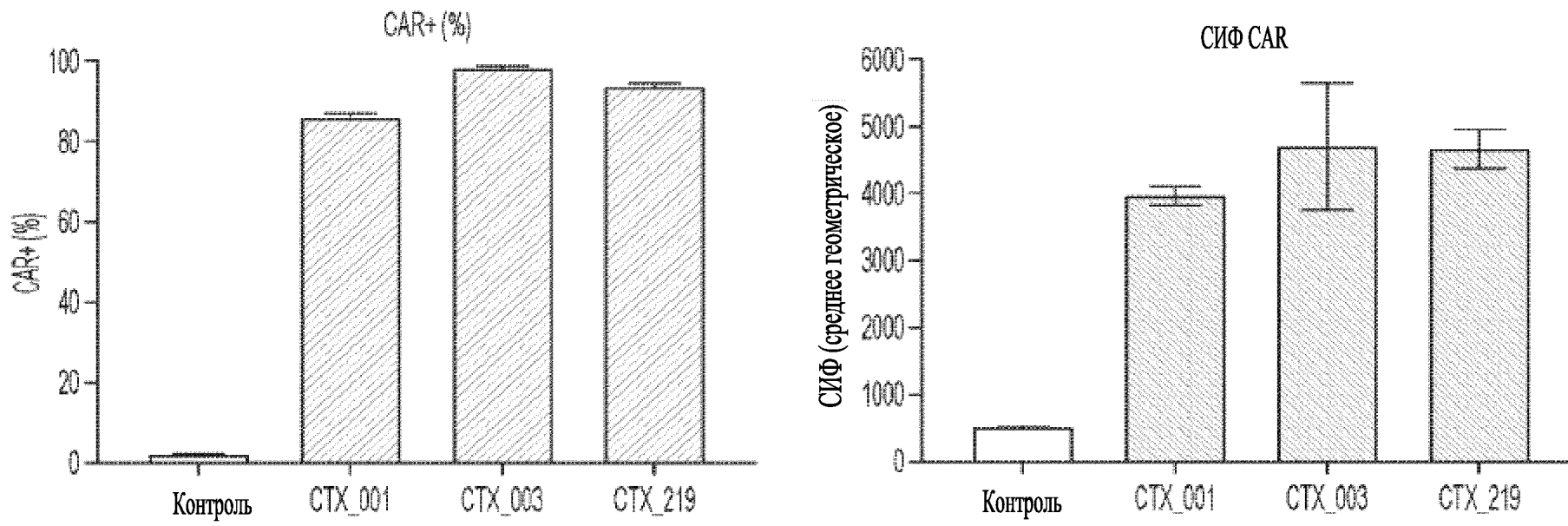


Фиг 133А



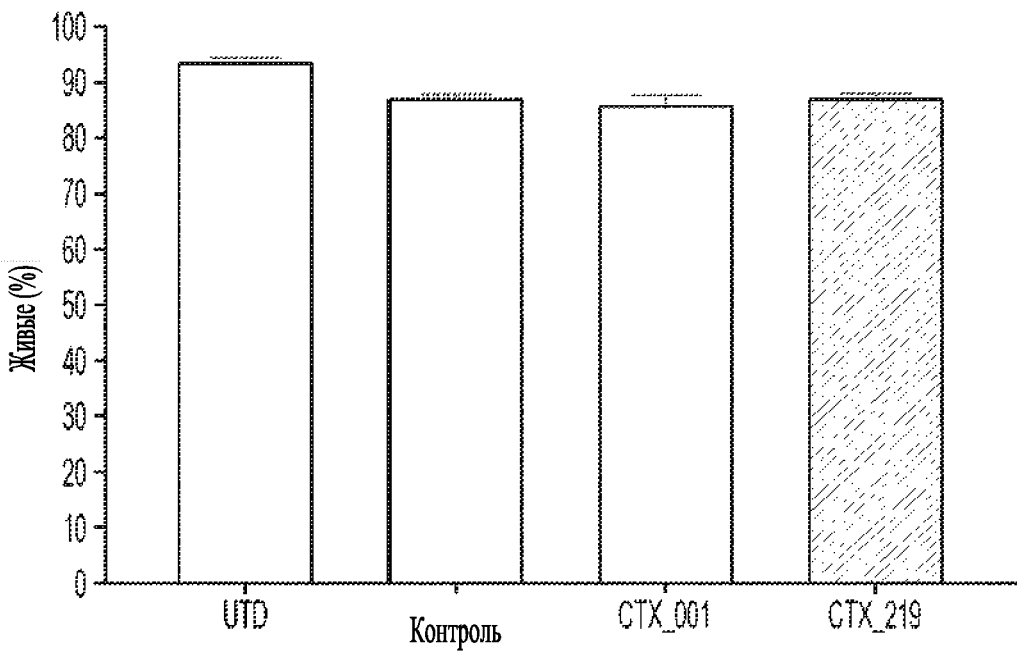
Фиг 133В

161/204

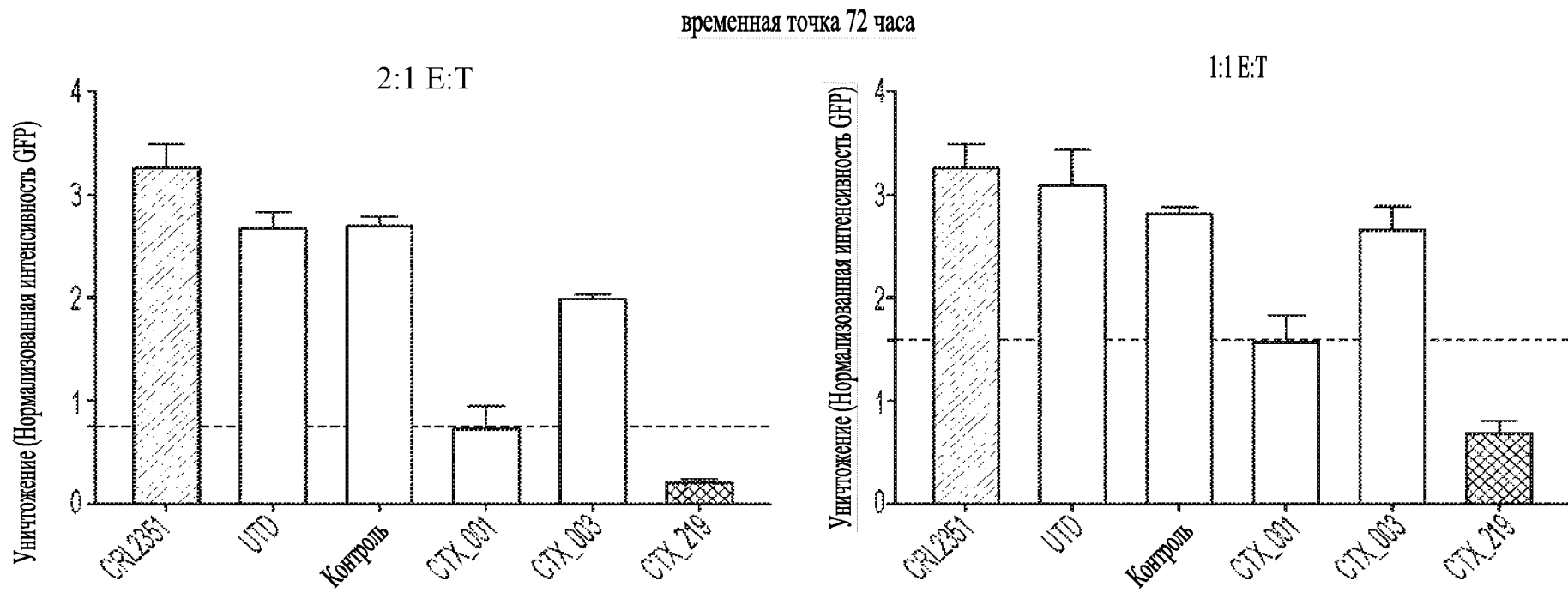


ФИГ. 133С

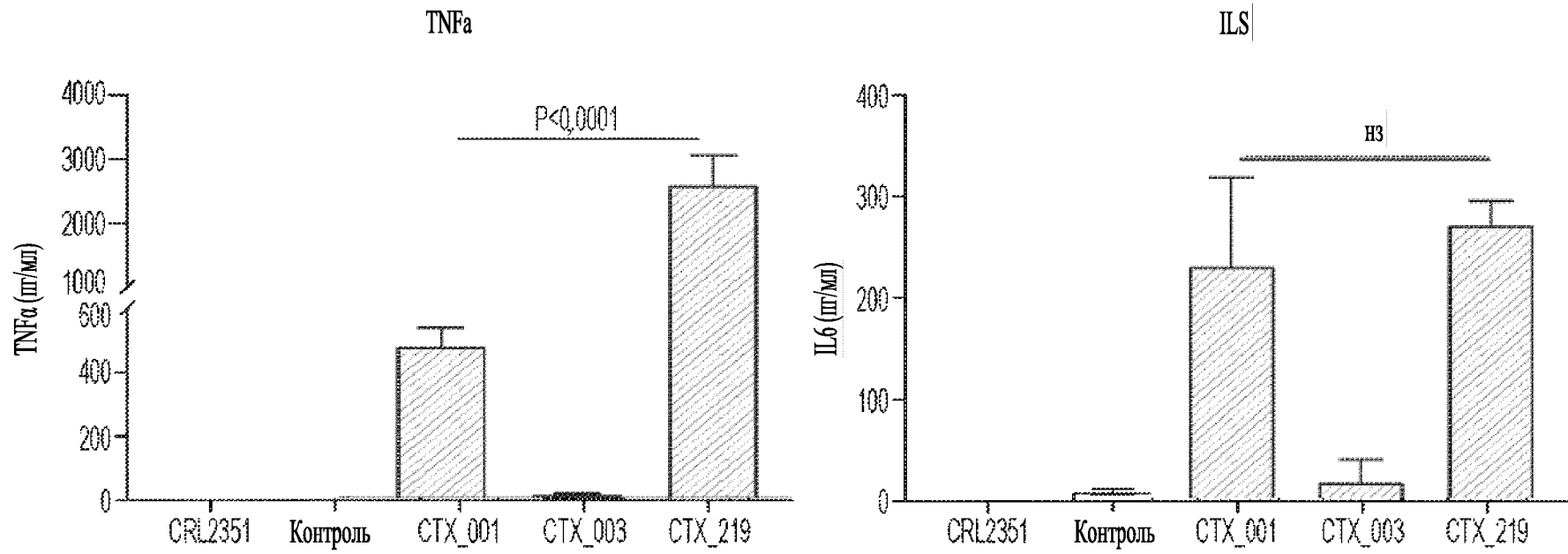
162/204



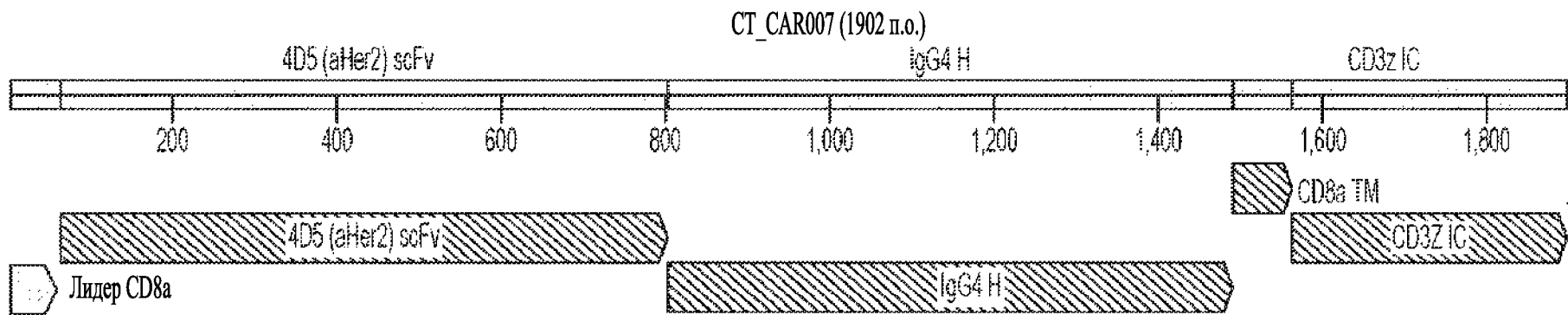
ФИГ. 133D



ФИГ. 133Е

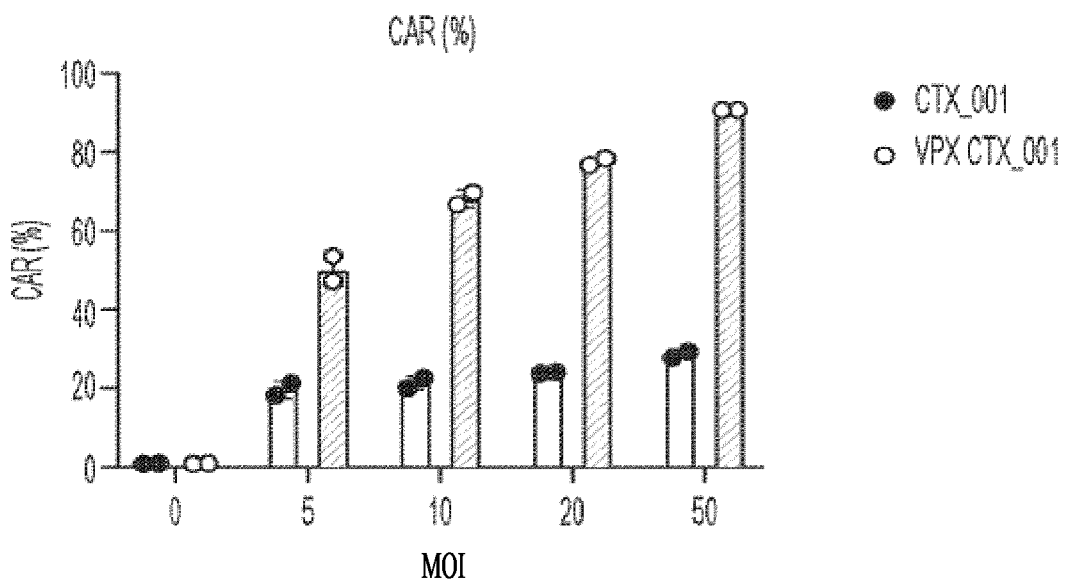


ФИГ. 134



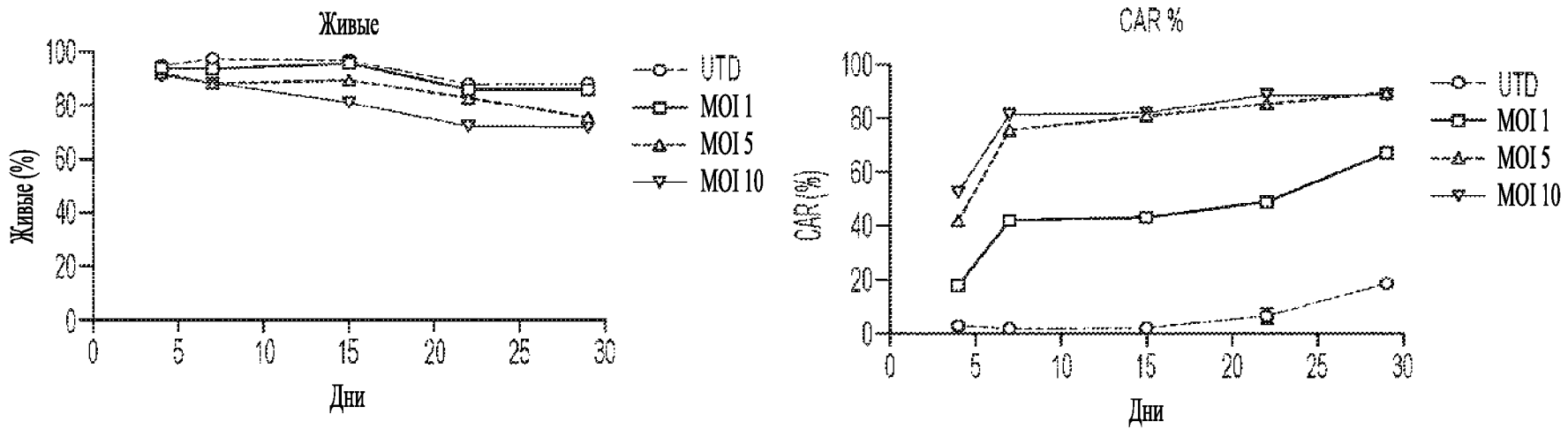
ФИГ. 135

166/204

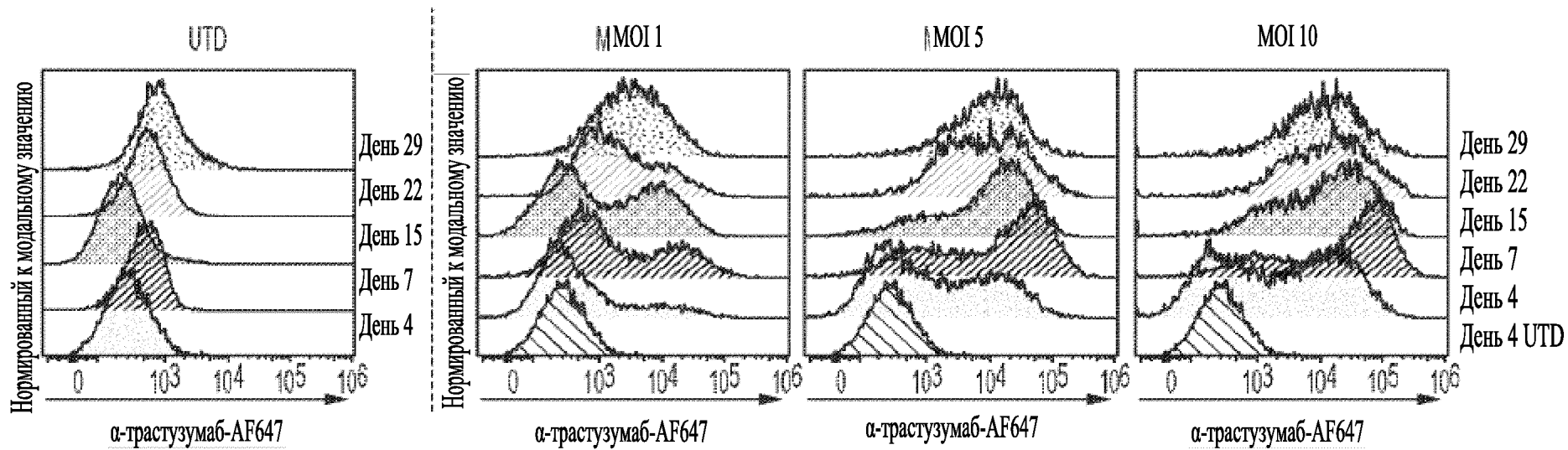


ФИГ. 136

167/204

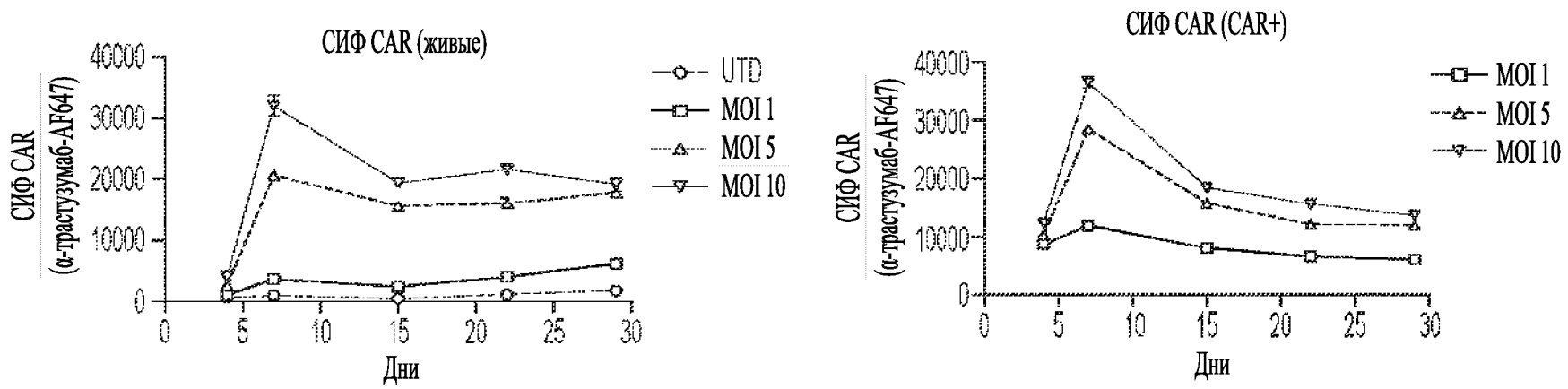


ФИГ. 137



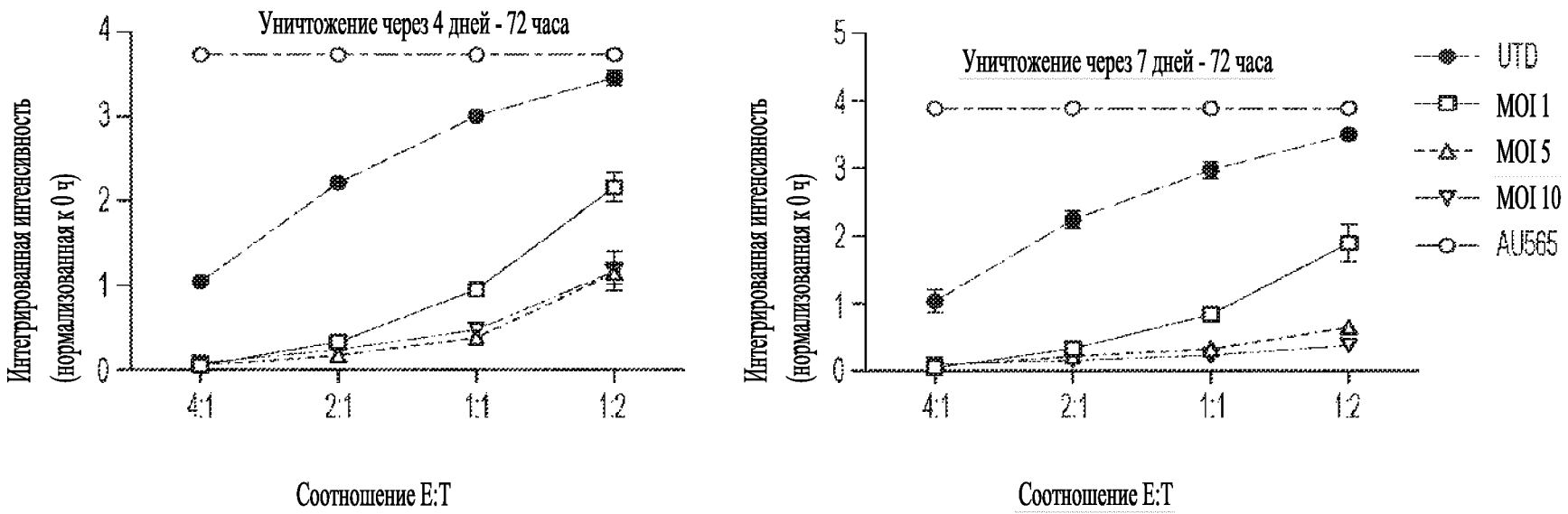
ФИГ. 138

169/204

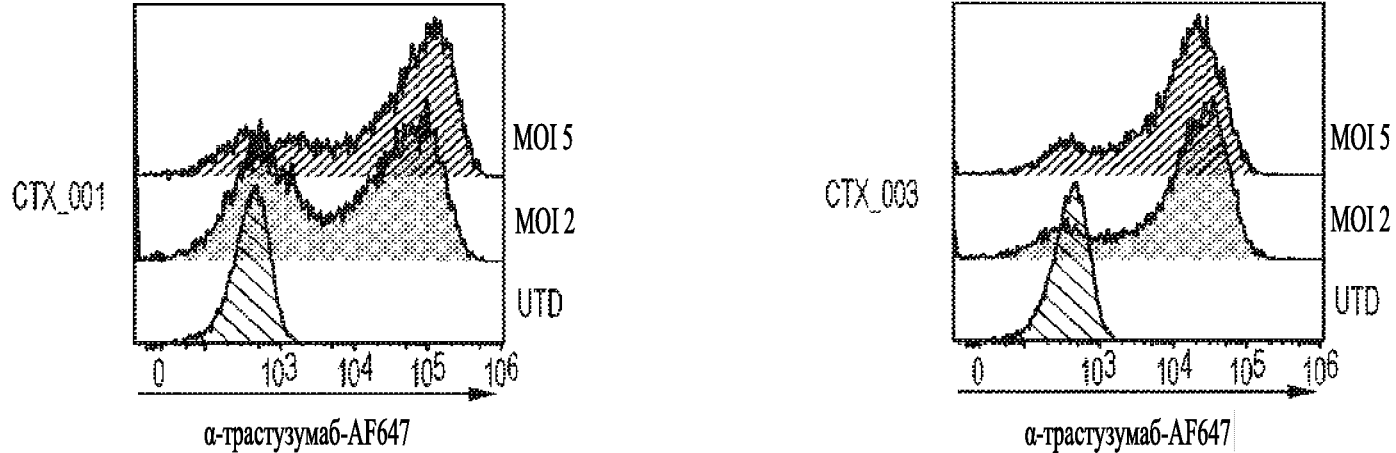


ФИГ. 139

170/204

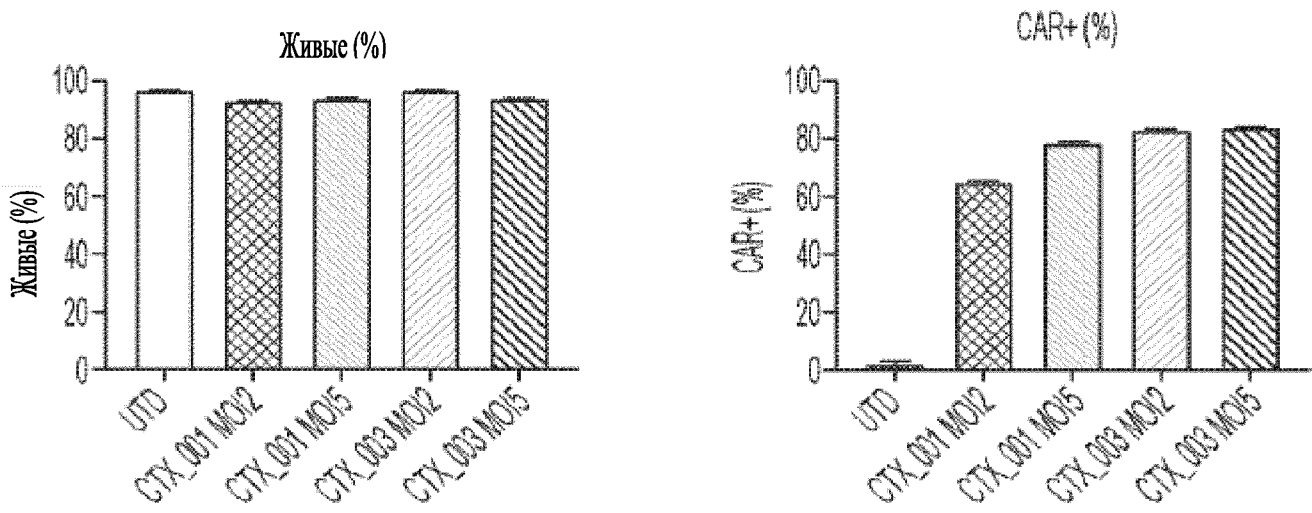


ФИГ. 140



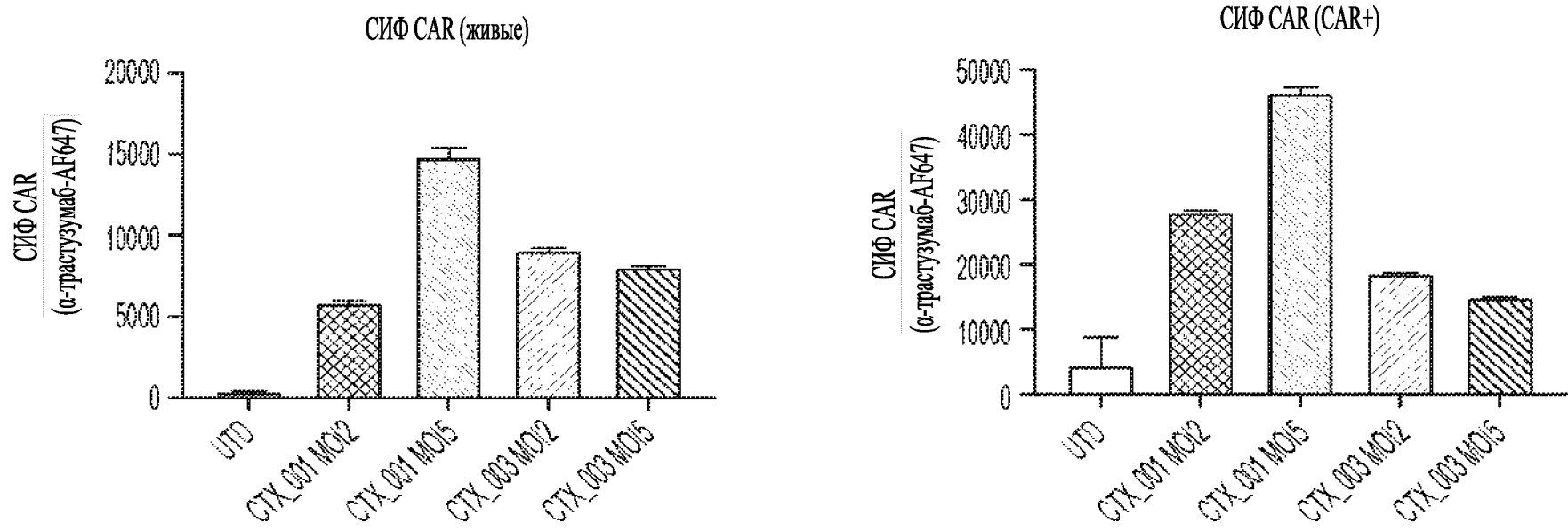
ФИГ. 141А

172/204



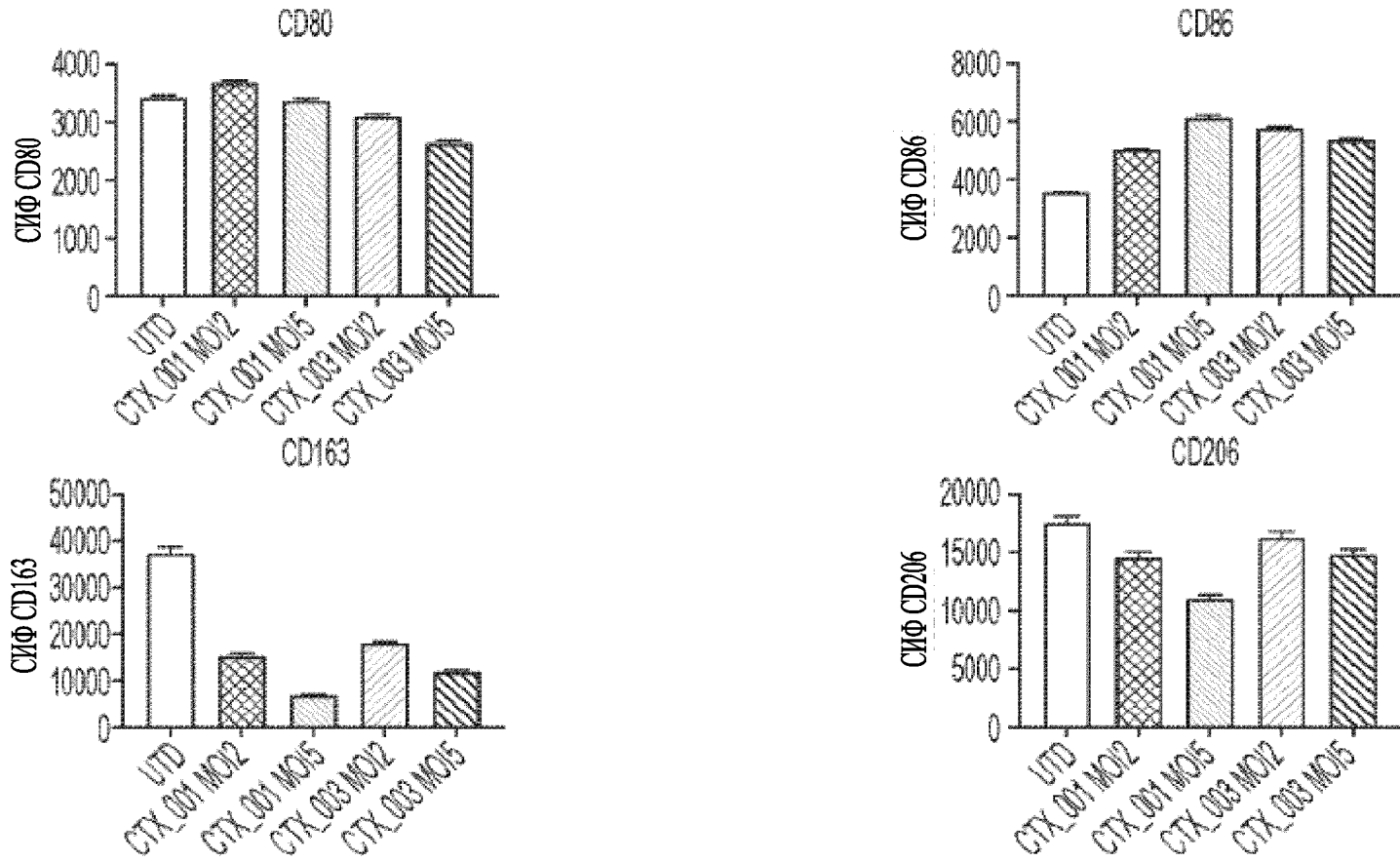
ФИГ. 141В

173/204



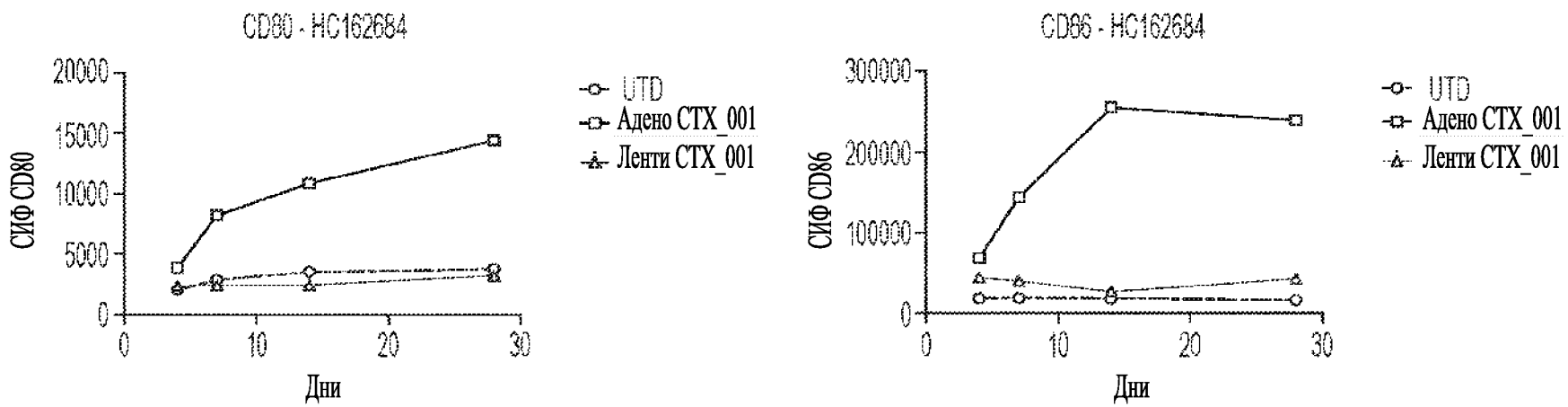
ФИГ. 142

174/204



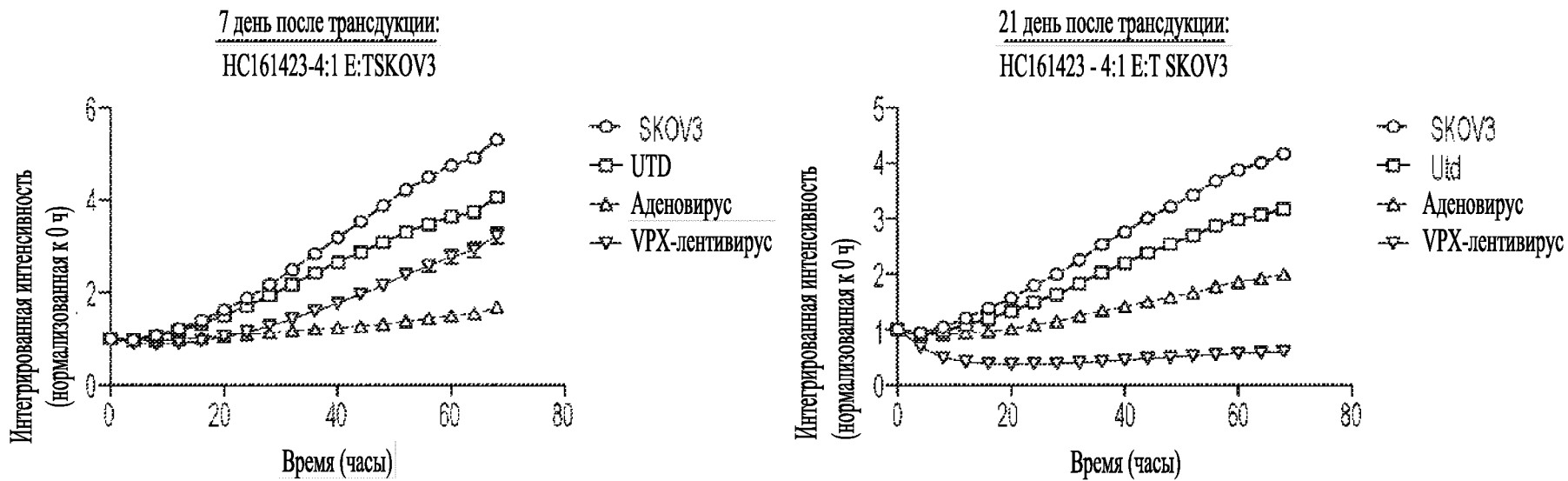
ФИГ. 143

175/204



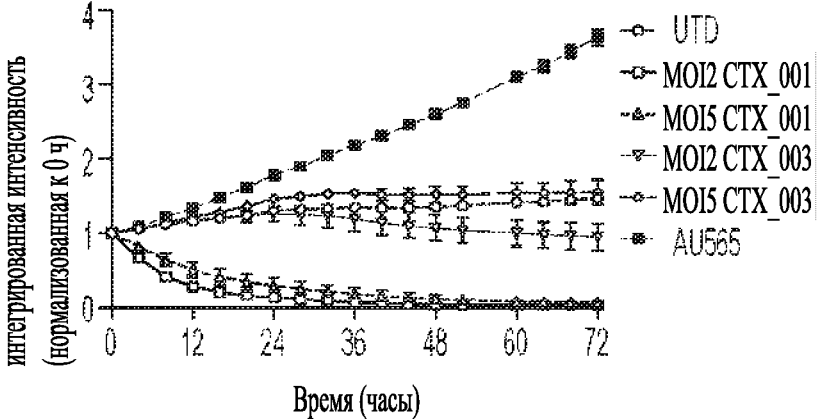
ФИГ. 144

176/204

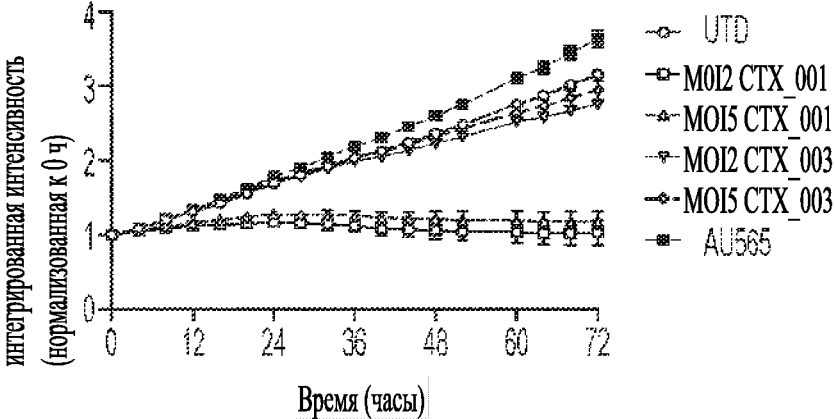


ФИГ. 145

4:1 E:T-AU565



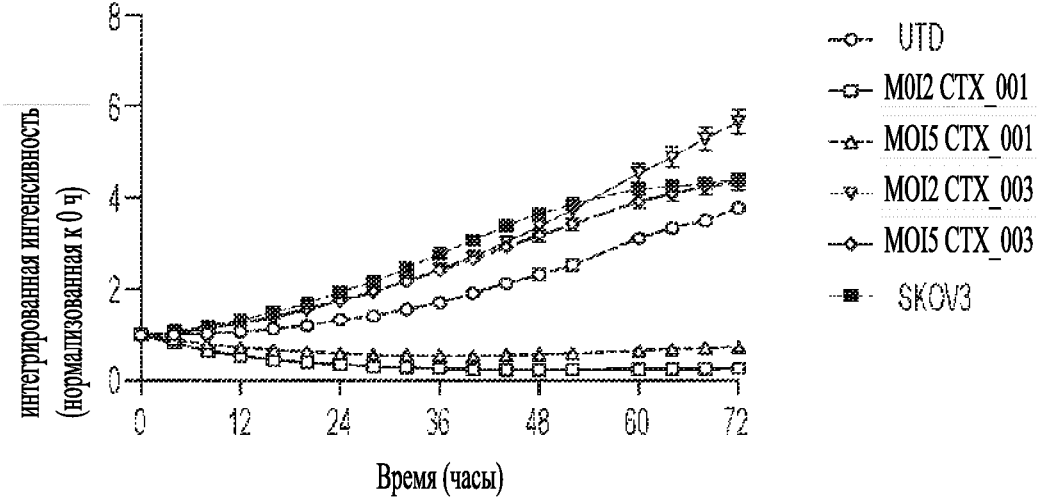
1:2E:T-AU565



ФИГ. 146

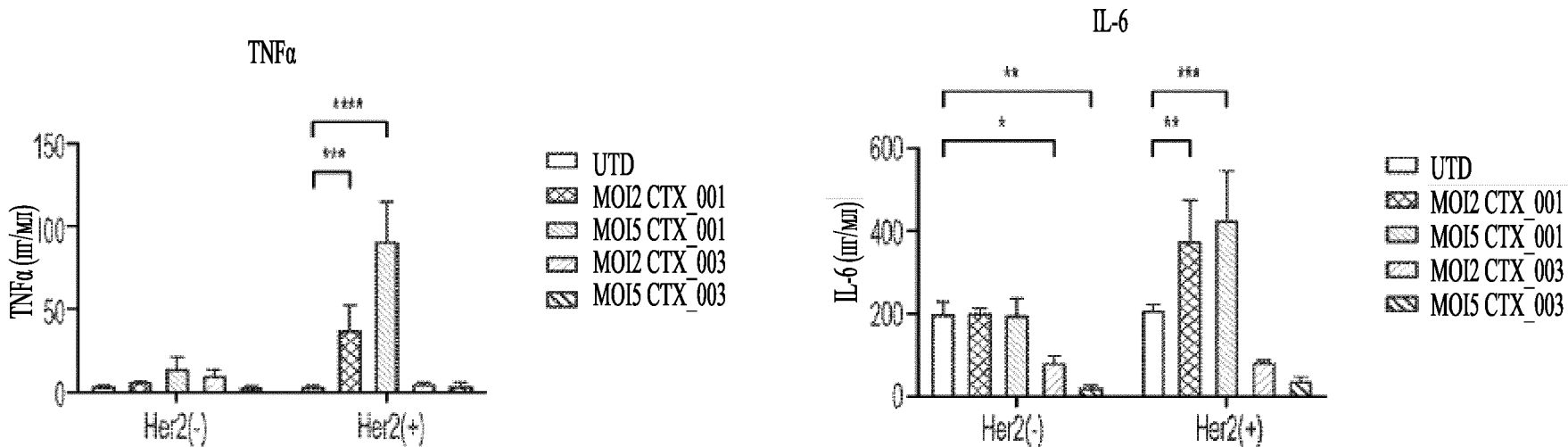
178/204

4:1 E:T-SKOV3



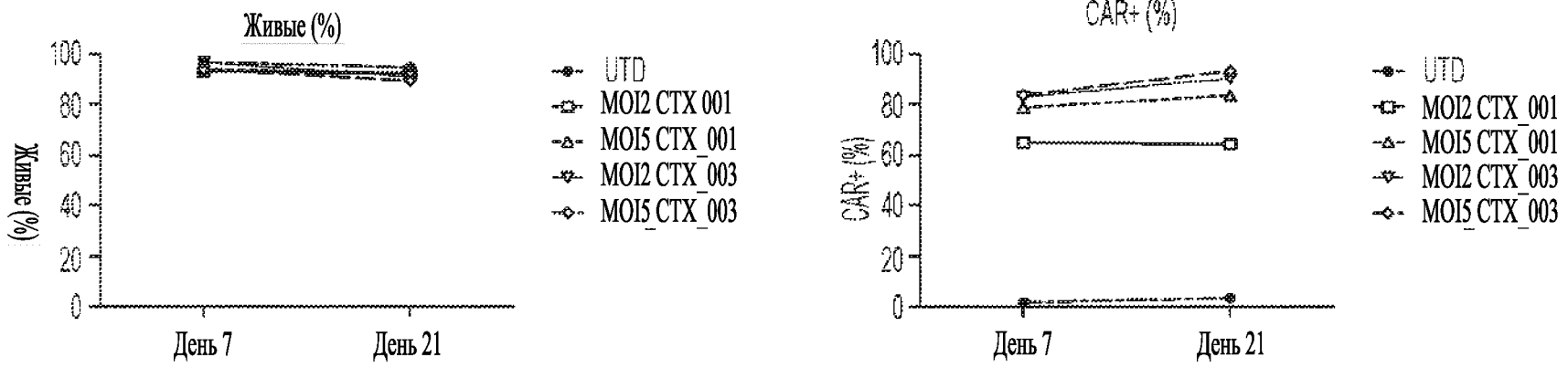
ФИГ. 147

179/204

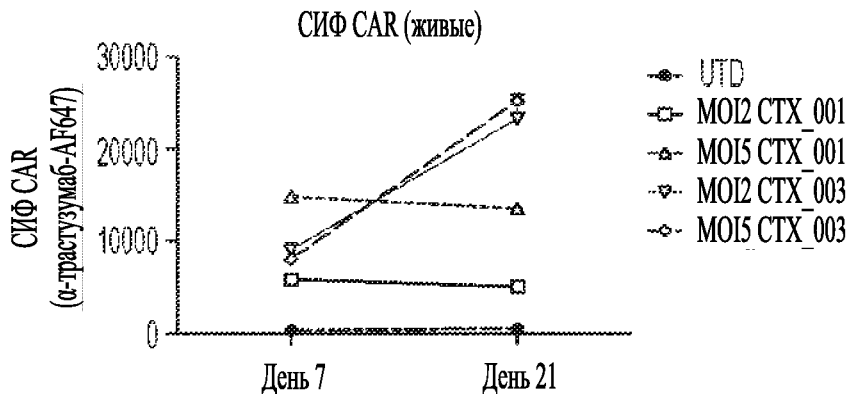
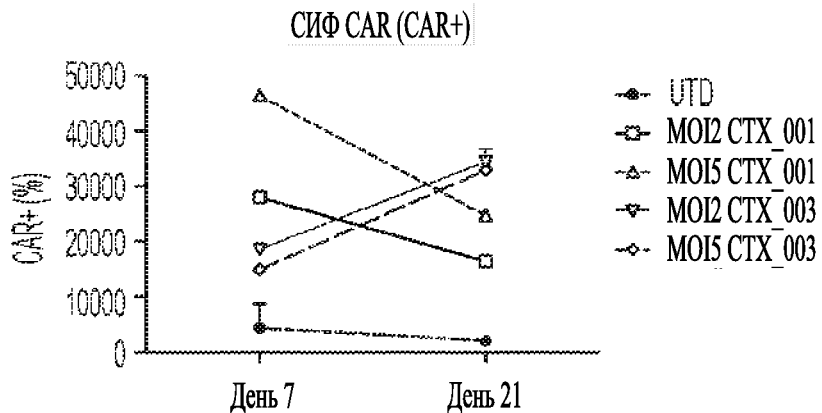


ФИГ. 148

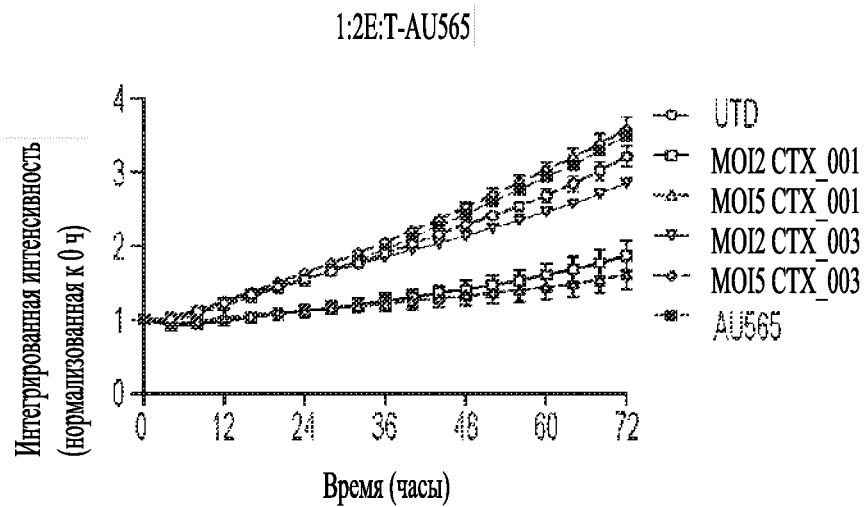
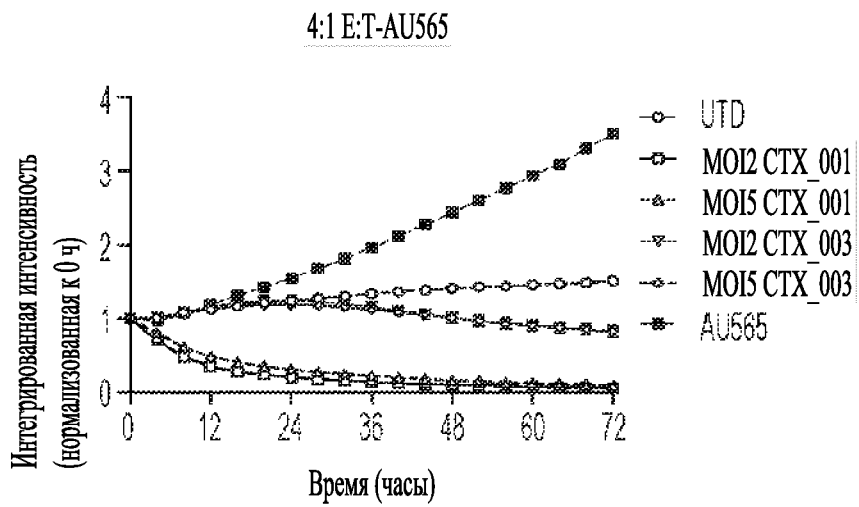
180/204



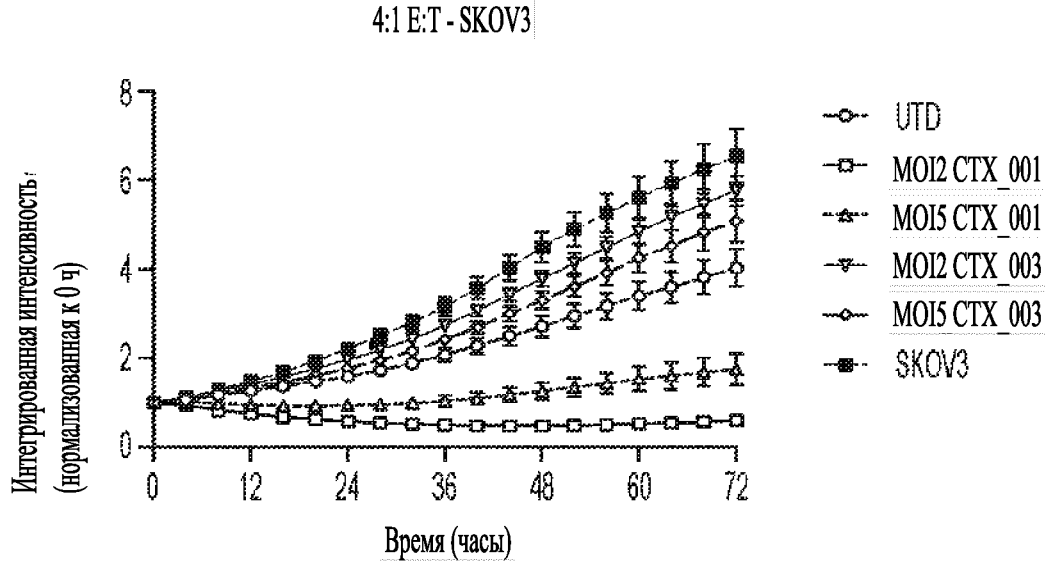
ФИГ. 149



ФИГ. 150

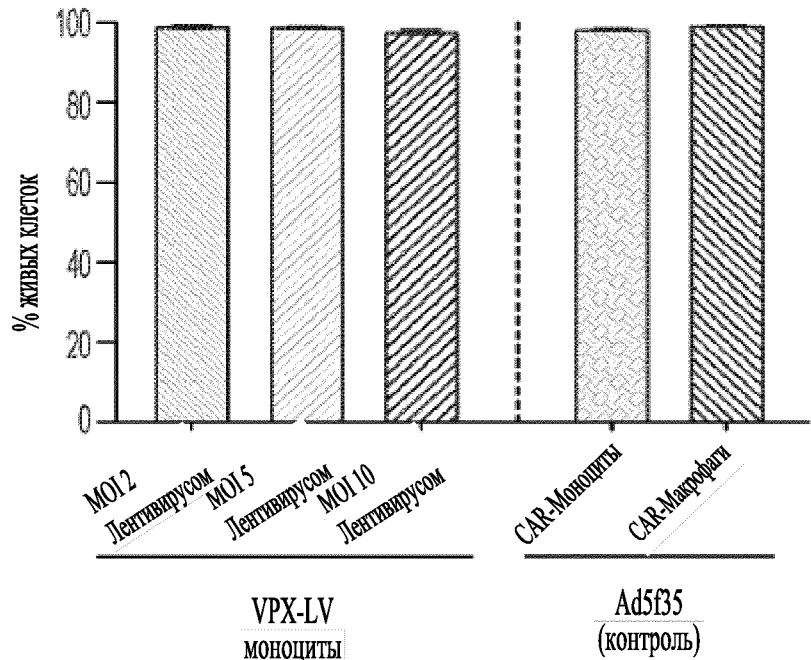


ФИГ. 151

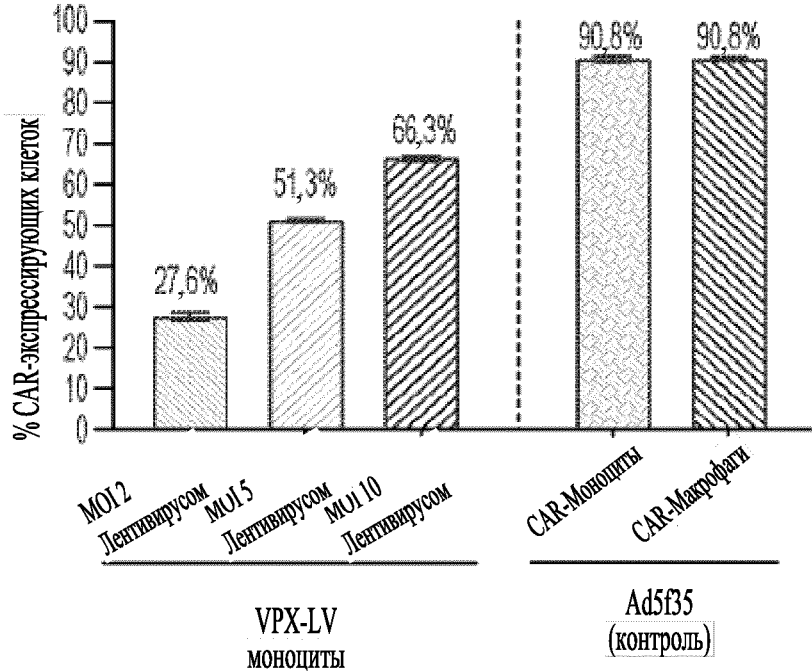


ФИГ. 152

184/204

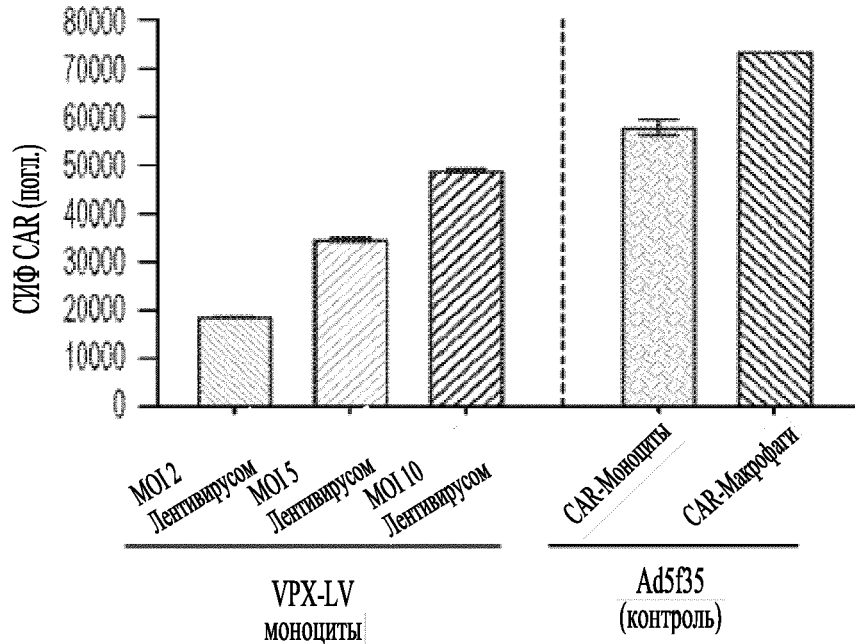


ФИГ. 153А

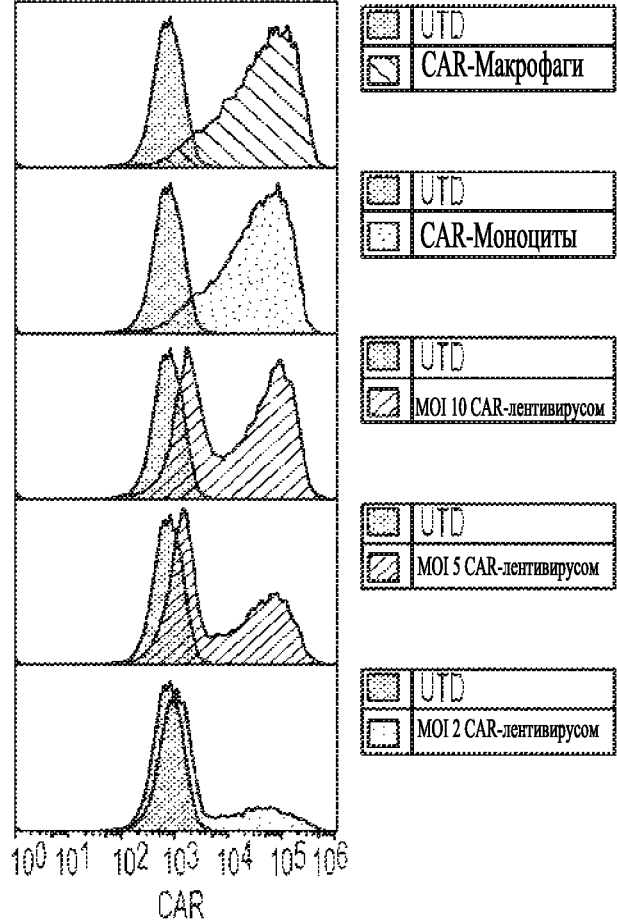


ФИГ. 153В

186/204

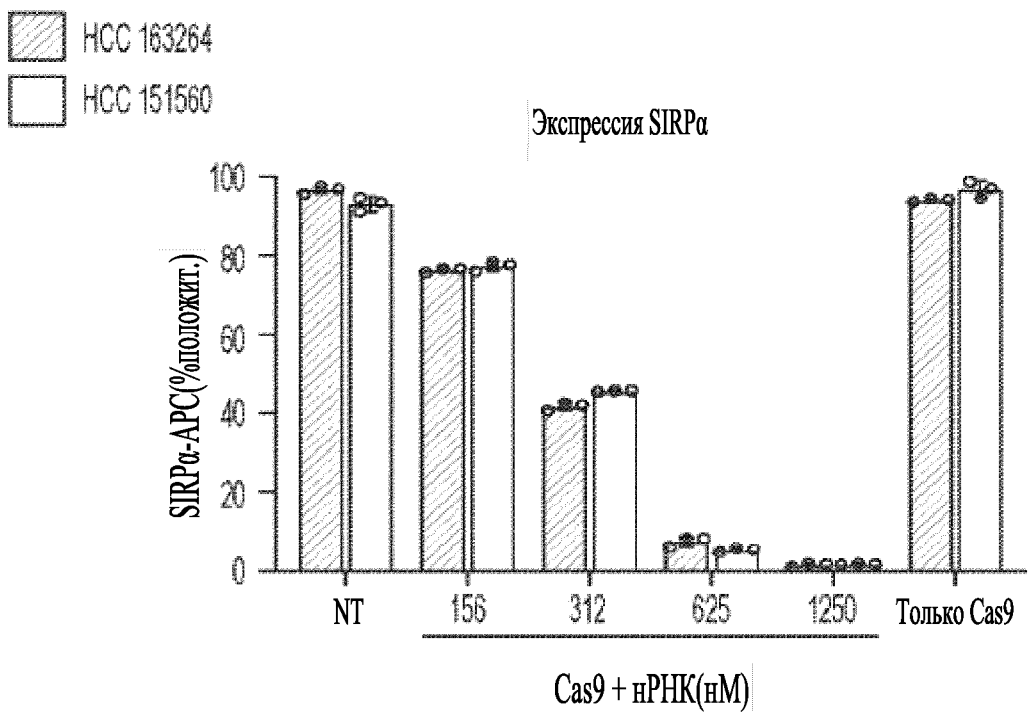


ФИГ. 153C



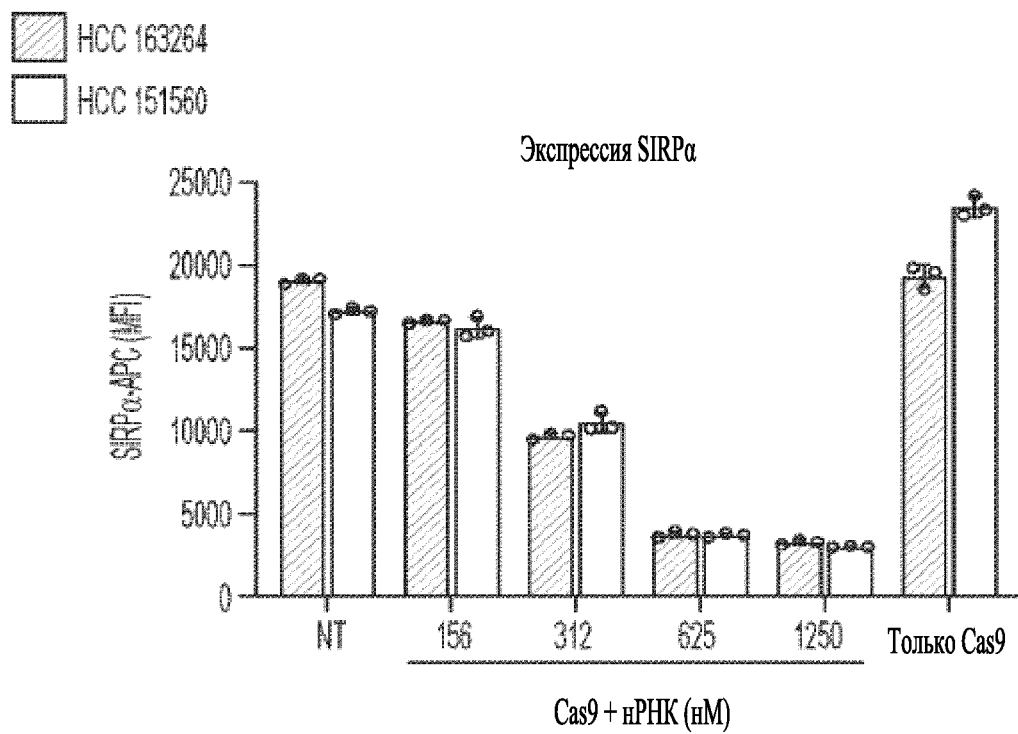
ФИГ. 153D

188/204



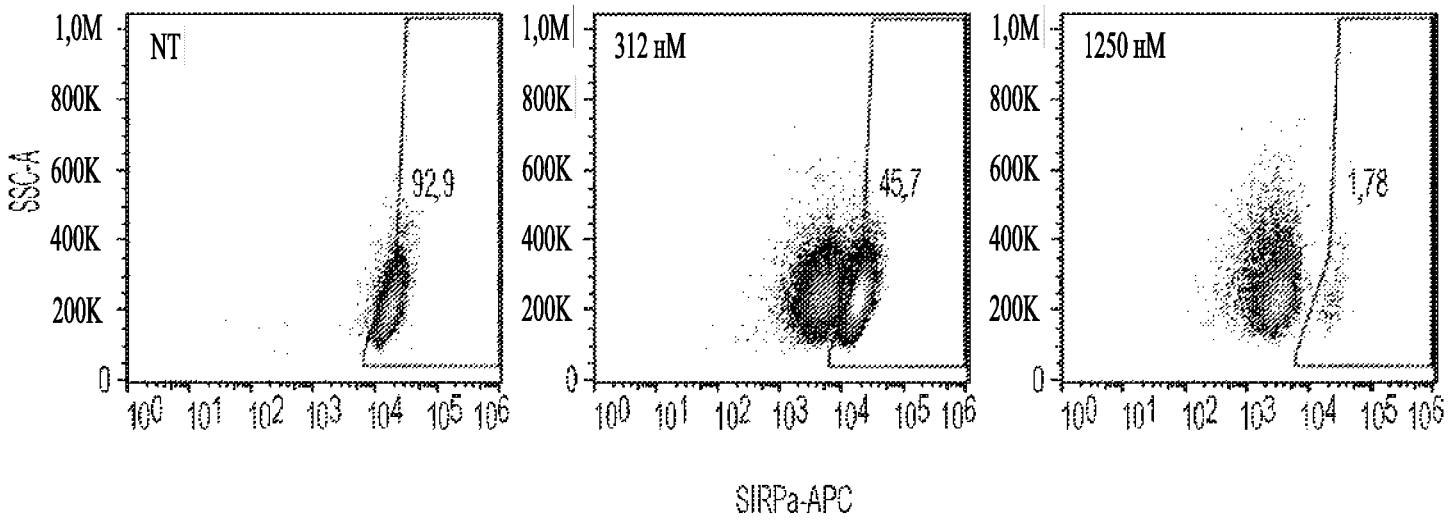
ФИГ. 154А

189/204



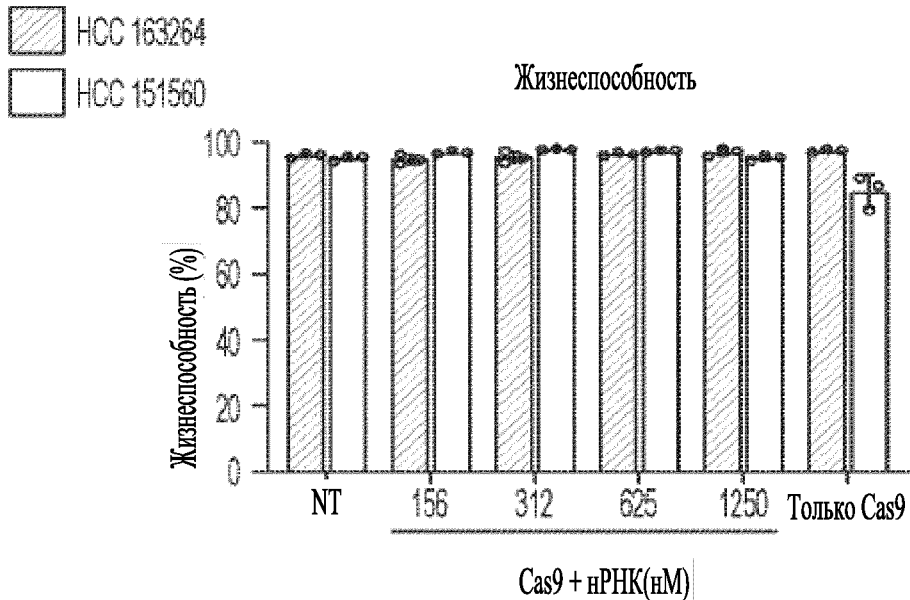
ФИГ. 154В

190/204

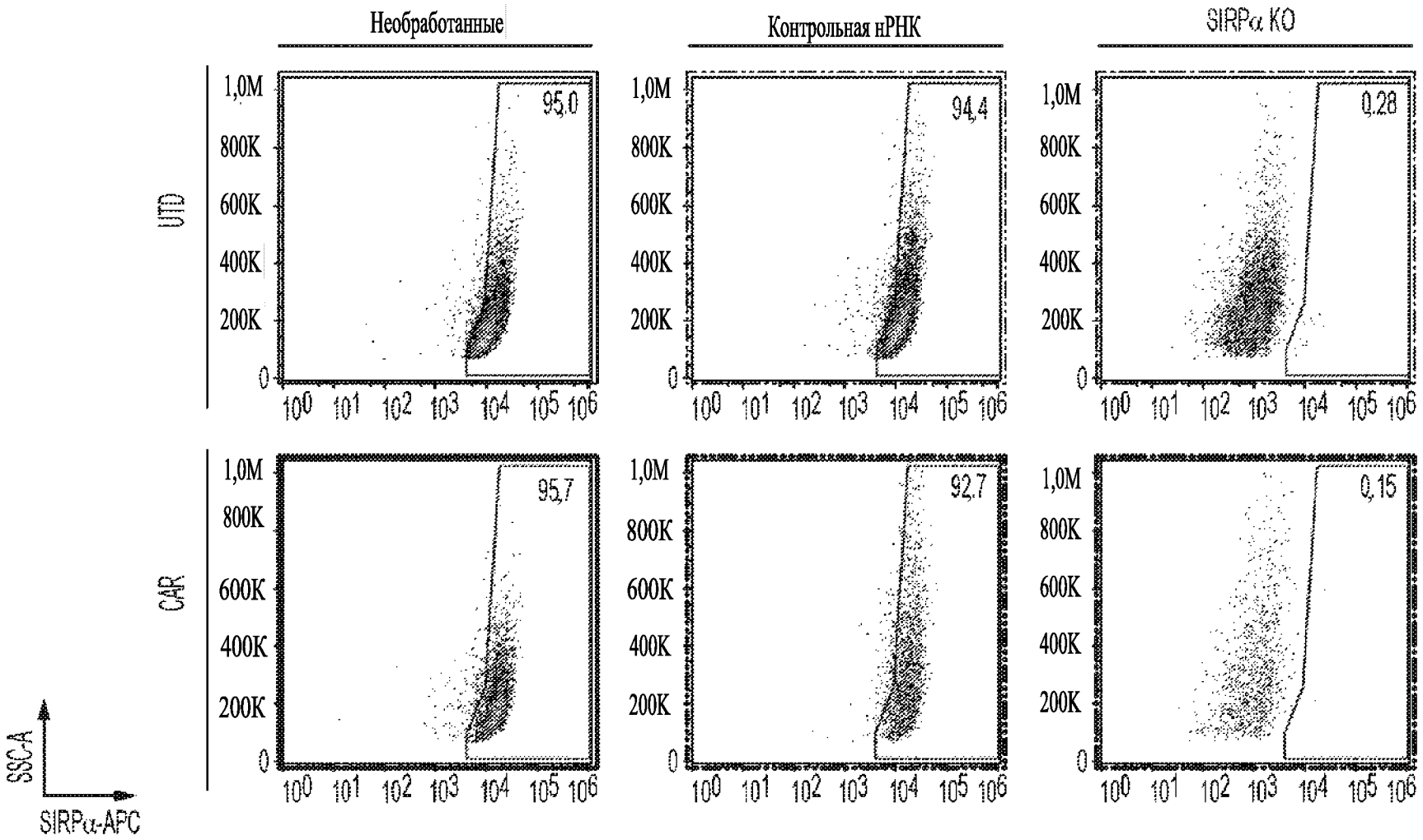


ФИГ. 154С

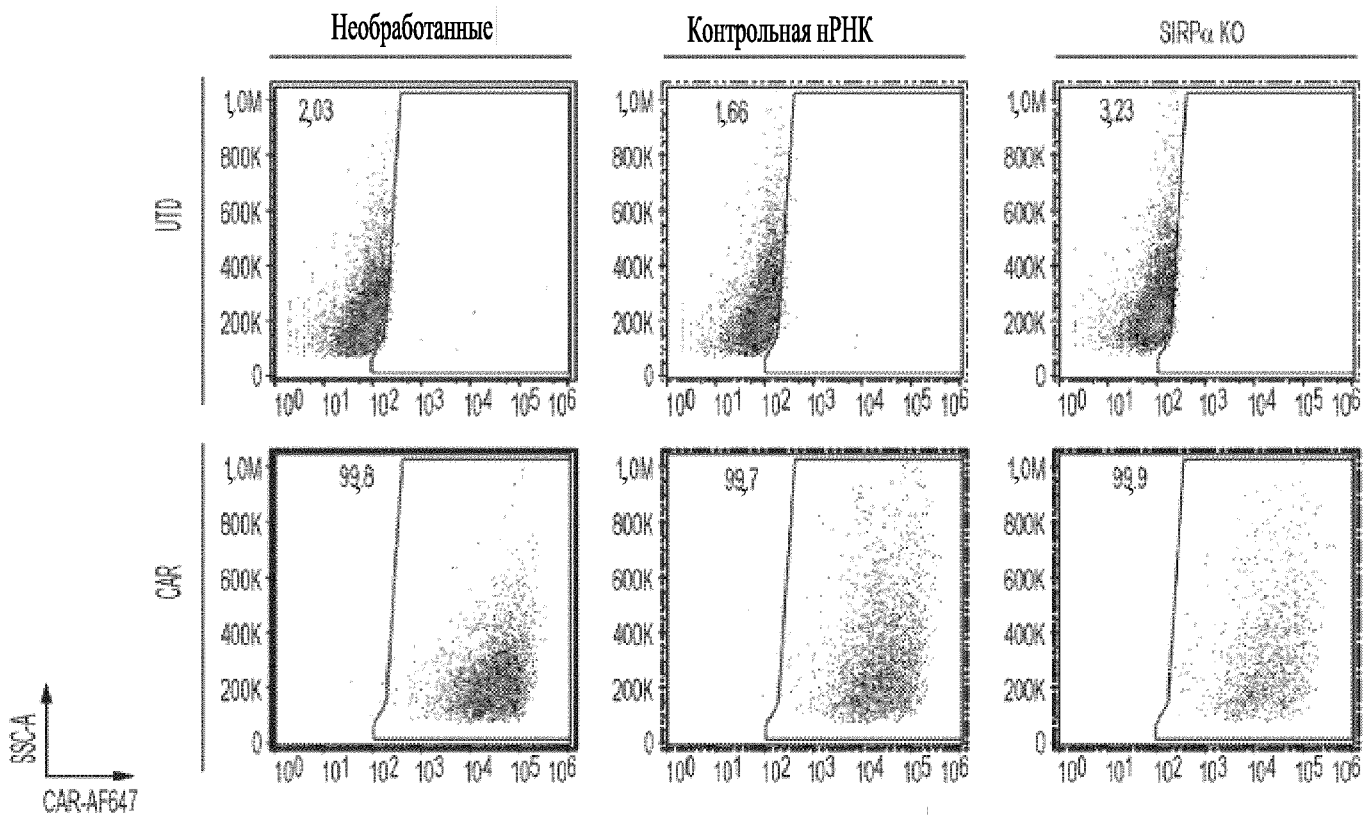
191/204



ФИГ. 154D

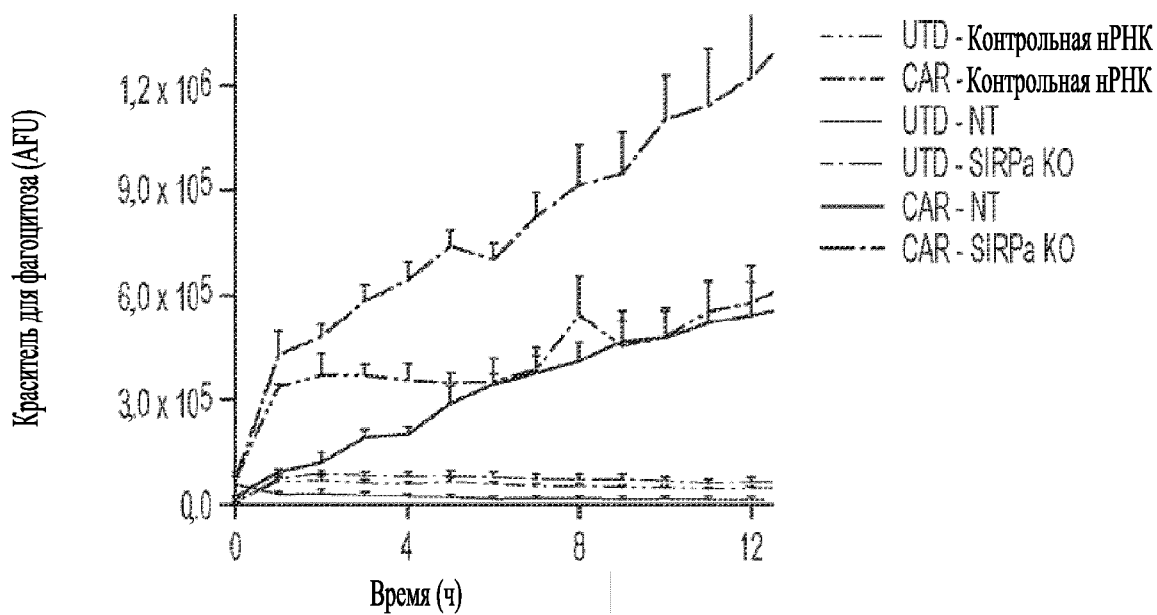


ФИГ. 155А



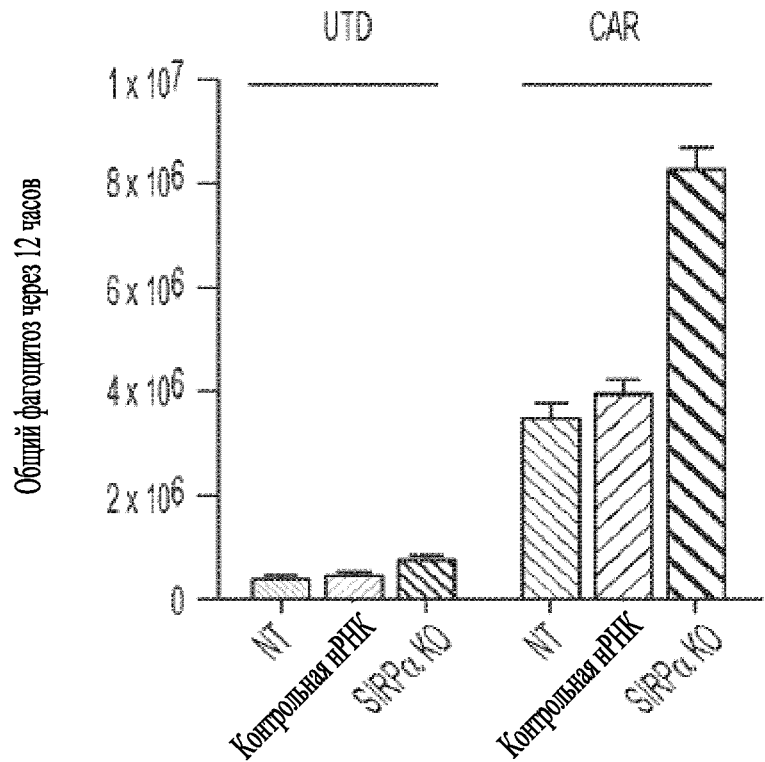
ФИГ. 155В

194/204

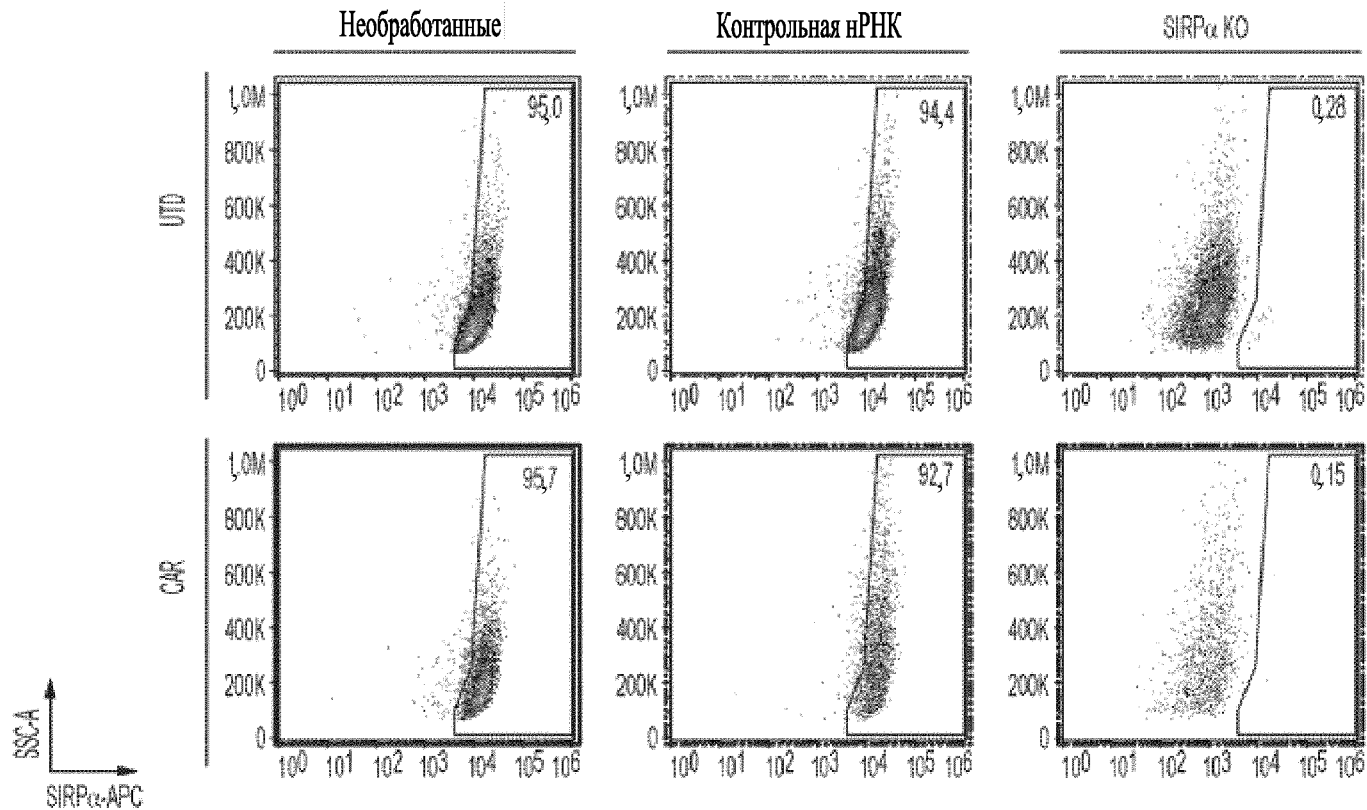


ФИГ. 155С

195/204

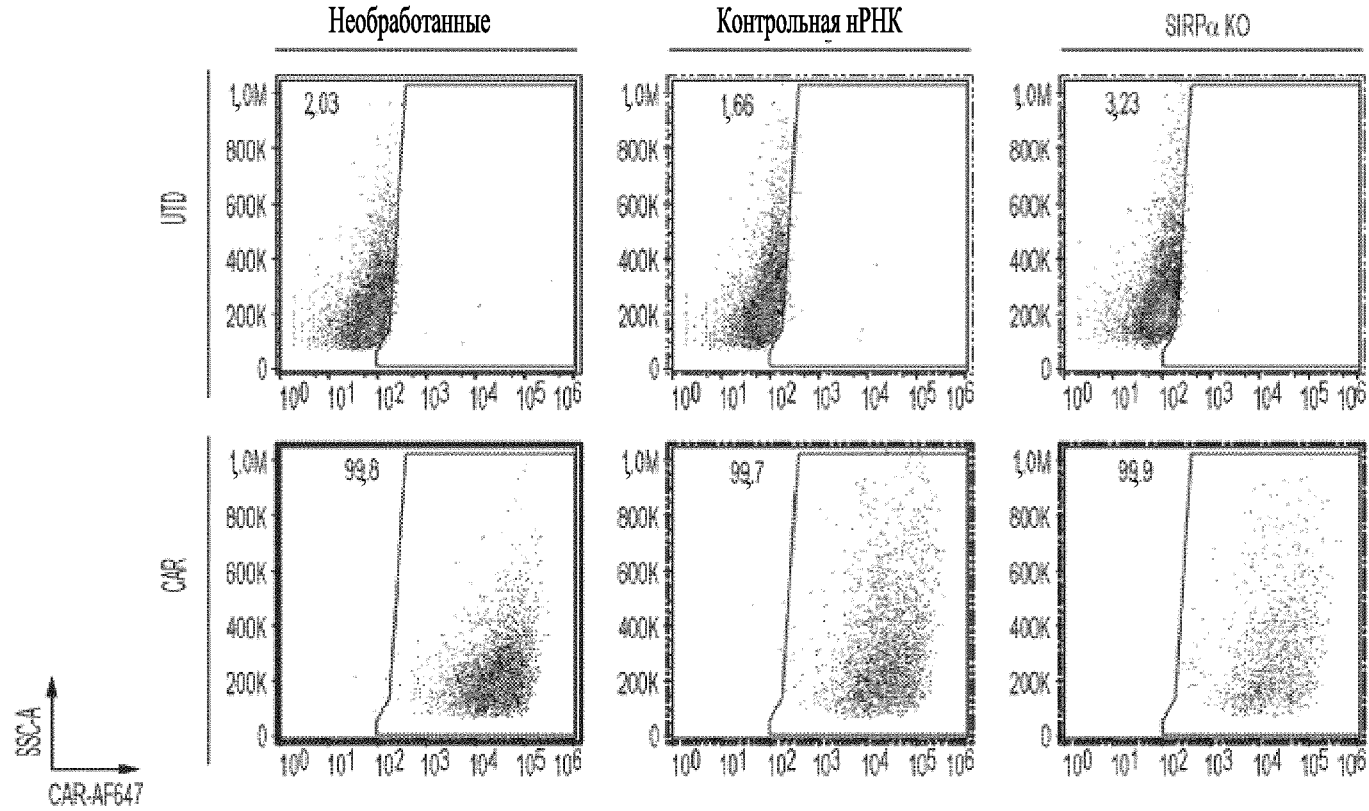


ФИГ. 155D

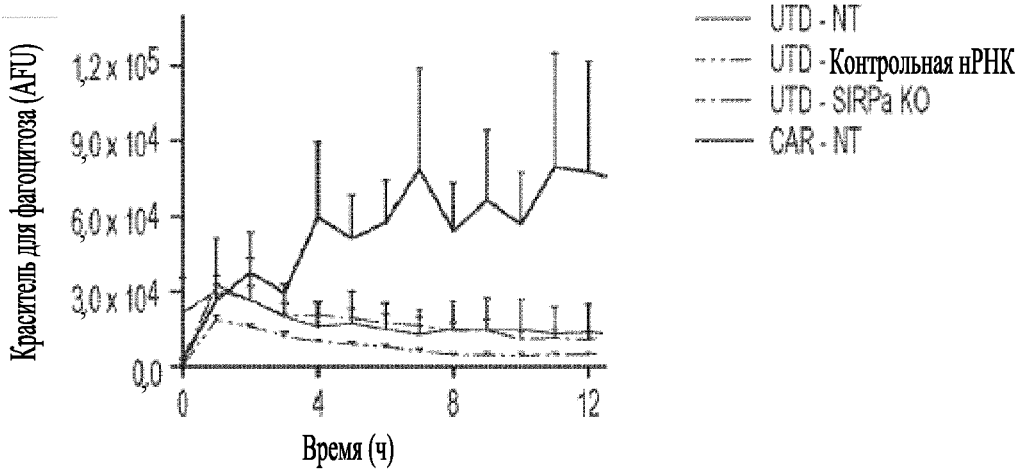
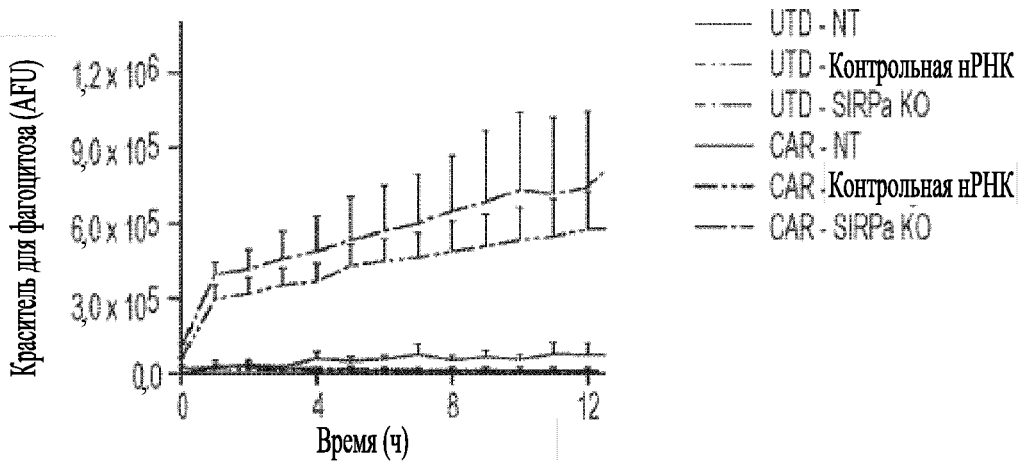


ФИГ. 156А

197/204

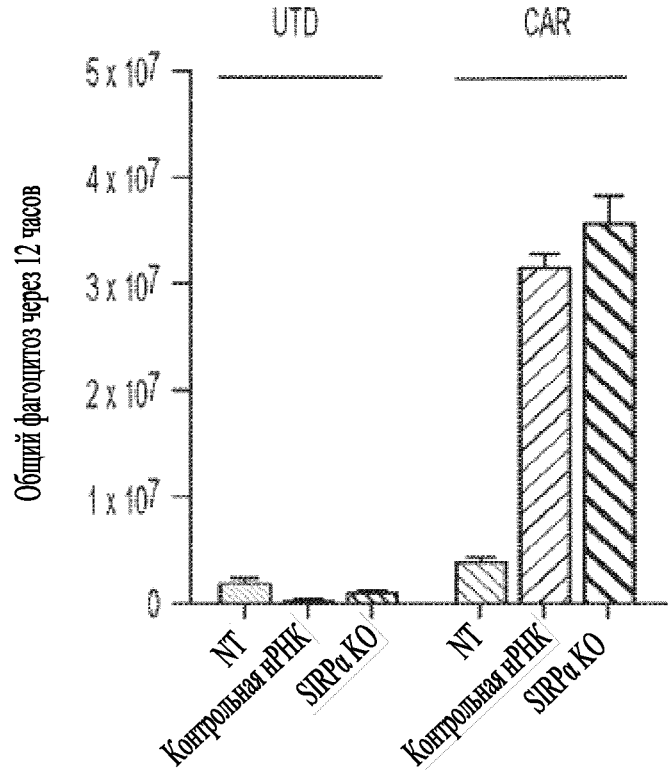


198/204



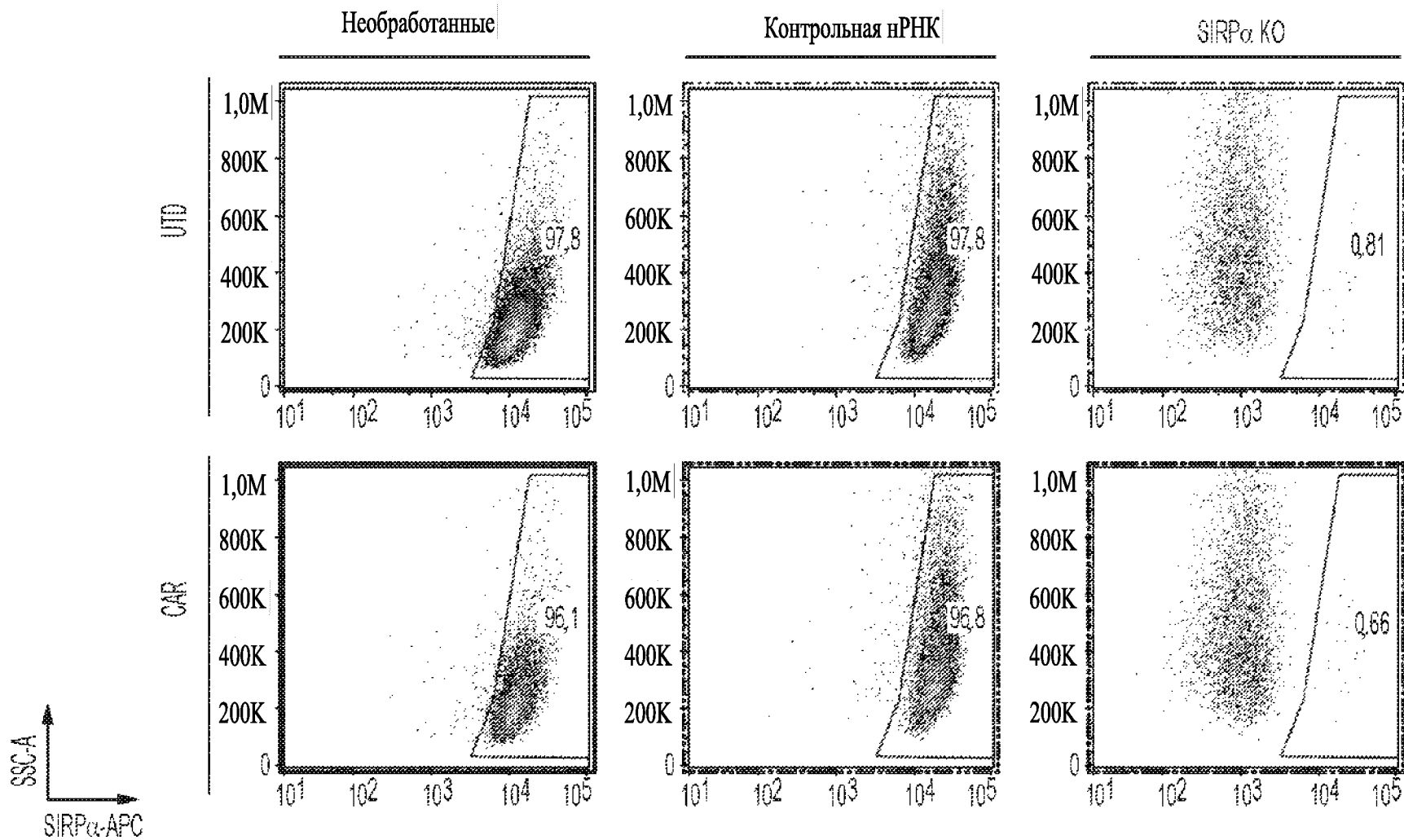
ФИГ. 156С

199/204

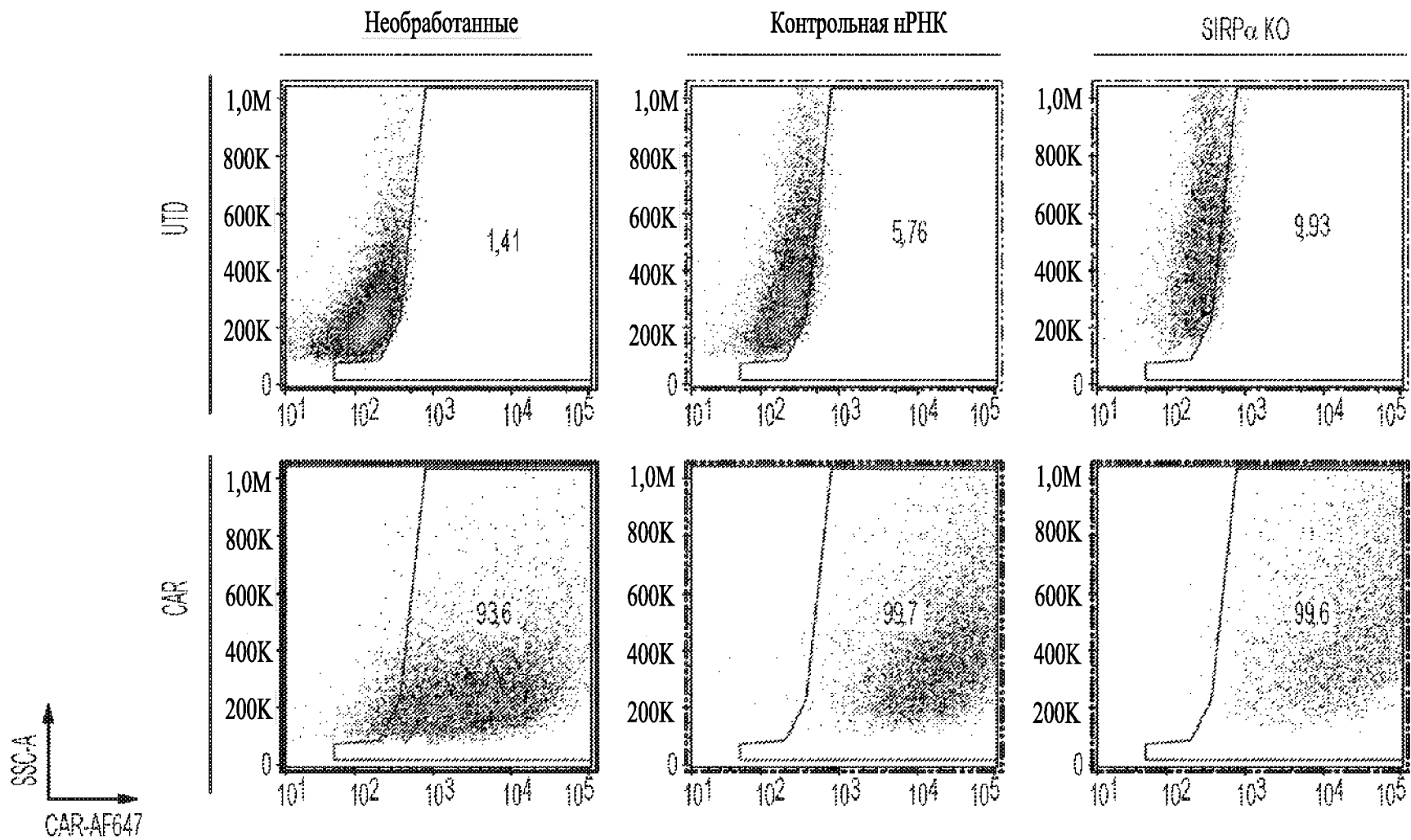


ФИГ. 156D

200/204

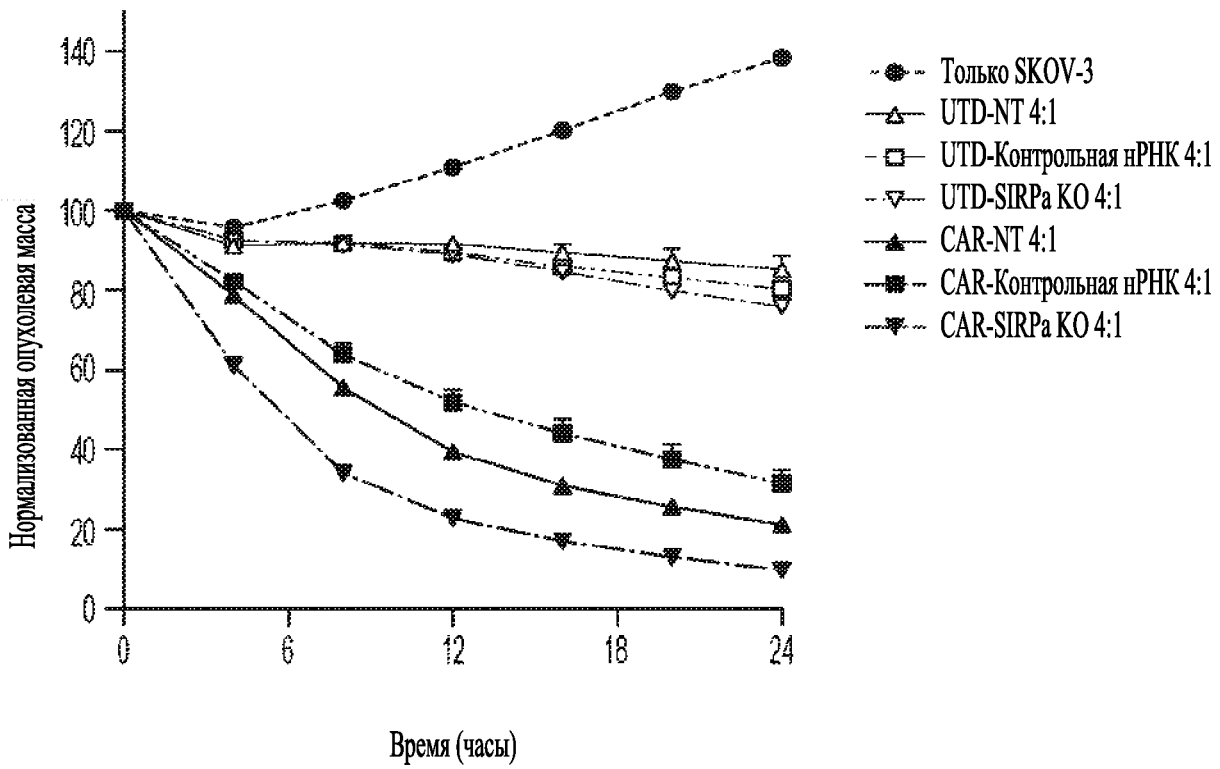


ФИГ. 157А



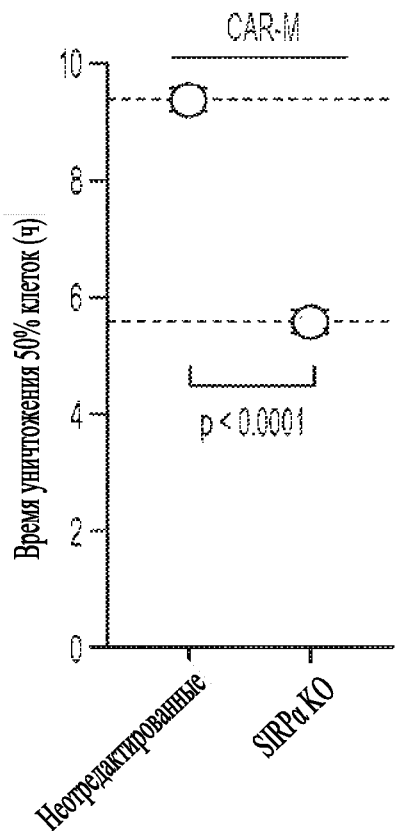
ФИГ. 157В

202/204



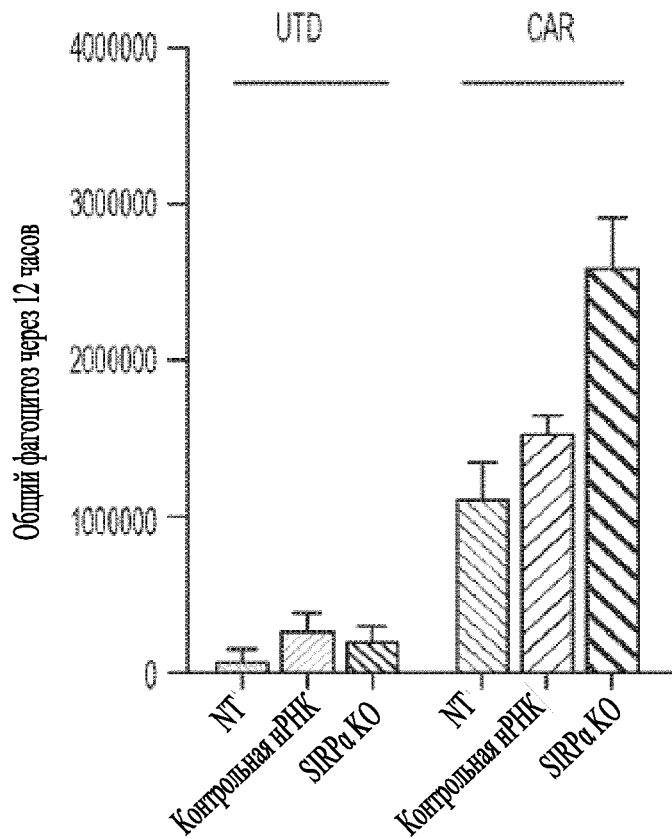
ФИГ. 157С

203/204



ФИГ. 157D

204/204



ФИГ. 157E