

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390042** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.02.21**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.06.25**

(51) Int. Cl. **A61K 35/12** (2015.01)  
**A61K 35/15** (2015.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 45/00** (2006.01)

**(54) ТРАНСФЕКЦИЯ ИММУННЫХ КЛЕТОК ПОСРЕДСТВОМ мРНК**

(31) **63/044,855**

(32) **2020.06.26**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/039168**

(87) **WO 2021/263152 2021.12.30**

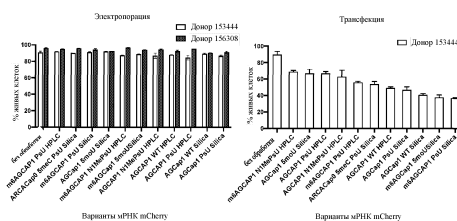
(71) Заявитель:  
**КАРИСМА ТЕРАПЬЮТИКС ИНК.  
(US)**

(72) Изобретатель:  
**Кличински Майкл, Яширо-Охтани  
Юми, Росс Кэйли (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 способам модификации иммунной клетки путем доставки модифицированной матричной РНК (мРНК), кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), и модифицированным иммунным клеткам, содержащим CAR.

Живучесть (%)



202390042

A1

A1

202390042

# **ТРАНСФЕКЦИЯ ИММУННЫХ КЛЕТОК ПОСРЕДСТВОМ мРНК**

## **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Настоящая заявка испрашивает приоритет и преимущество предварительной заявки на патент США № 63/044,855, поданной 26 июня 2020 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

## **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Хотя иммунотерапия была исследована при многих заболеваниях и расстройствах, включая рак, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз (БАС), системный амилоидоз, прионную болезнь, сердечно-сосудистые заболевания, атеросклероз, фиброз, функциональные ограничения, с которыми пришлось столкнуться, все еще нуждаются в устранении.

Следовательно, существует потребность в разработке терапевтических средств, оптимизированных для повышения экспрессии, жизнеспособности и функции.

## **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение охватывает, среди прочего, способы, системы и композиции для модификации иммунных клеток, включая моноциты, макрофаги и/или дендритные клетки. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы, системы и/или композиции обеспечивают усиленную продукцию и/или улучшенные свойства модифицированных иммунных клеток. Неожиданно настоящее изобретение охватывает признание того, что применение модифицированной мРНК (например, мРНК с модификацией 5'-кэп или уридина, кодирующей представляющий интерес трансген, такой как химерный антигенный рецептор (CAR)) может привести к значительному повышению уровня экспрессии, стойкости экспрессию и жизнеспособность моноцитов, макрофагов и/или дендритных клеток человека. Кроме того, настоящее изобретение включает в себя признание того, что применение бета-интерферона может привести к значительному повышению уровня экспрессии, сохранению экспрессии и функции моноцитов, макрофагов и/или дендритных клеток с CAR, которые были трансфицированы мРНК, кодирующей CAR или другой трансген. Настоящее изобретение также охватывает признание того, что применение ингибитора РНКазы (например, ингибитора РНКазы L) может привести к значительному

увеличению уровней экспрессии желаемого полинуклеотида и/или полипептида (например, трансгена).

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способы модификации иммунной клетки, причем способ включает следующие стадии: модификацию матричной РНК (мРНК), кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), очистку мРНК и доставку мРНК в иммунную клетку, при этом иммунная клетка представляет собой макрофаг, моноцит или дендритную клетку, и при этом модифицированная иммунная клетка содержит CAR.

В некоторых вариантах осуществления стадия модификации включает осуществление включения в мРНК модифицированного нуклеотида, изменения 5'- или 3'-нетранслируемой области (UTR), кэп-структуры и/или поли(А)-хвоста. В некоторых вариантах осуществления кэп-структура содержит AGCap1, m6AGCap1 или аналог кэп-структуры с правильной ориентацией (ARCA). В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид включает псевдоуридин (PsU), 5-метоксиуридин (5moU), 5-метилцитидин/псевдоуридин (5meC PsU), N1-метилпсевдоуридин (N1mPsU) или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления стадия очистки включает очистку на кремнезёмной мембране и/или высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). В некоторых вариантах осуществления стадия доставки включает трансфекцию.

В некоторых вариантах осуществления стадия модификации включает осуществление включения в мРНК AGCap1 и 5moU, стадия очистки включает очистку на кремнезёмной мембране, а стадия доставки включает электропорацию. В некоторых вариантах осуществления стадия модификации включает осуществление включения в мРНК AGCap1 и PsU, стадия очистки включает ВЭЖХ, а стадия доставки включает электропорацию. В некоторых вариантах осуществления стадия модификации включает осуществление включения в мРНК AGCap1 и N1mPsU, стадия очистки включает ВЭЖХ, а стадия доставки включает электропорацию. В некоторых вариантах осуществления стадия модификации включает осуществление включения в мРНК m6-AGCap1 и N1mPsU, стадия очистки включает ВЭЖХ, а стадия доставки включает электропорацию. В некоторых вариантах осуществления стадия модификации включает осуществление включения в мРНК m6-AGCap1 и PsU, стадия очистки включает ВЭЖХ, а стадия доставки включает электропорацию. В некоторых вариантах осуществления стадия модификации включает модификацию мРНК для включения AGCap1 и PsU, стадия очистки включает ВЭЖХ, а стадия доставки включает трансфекцию. В некоторых вариантах осуществления стадия модификации включает осуществление включения в мРНК m6-AGCap1 и PsU, стадия

очистки включает ВЭЖХ, а стадия доставки включает трансфекцию. В некоторых вариантах осуществления стадия модификации включает осуществление включения в мРНК m6-AGCap1 и N1mPsU, стадия очистки включает ВЭЖХ, а стадия доставки включает трансфекцию. В некоторых вариантах осуществления стадия модификации включает осуществление включения в мРНК AGCap1 и 5moU. В некоторых вариантах осуществления стадия модификации включает осуществление включения в мРНК m6AGCap1 и 5moU.

В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению дополнительно включает стадию обработки иммунной клетки ингибитором РНКазы L. В некоторых вариантах осуществления ингибитор РНКазы L включает сунитиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор РНКазы L включает ABCE1.

В некоторых вариантах осуществления стадия обработки предшествует стадии доставки.

В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению дополнительно включает стадию культивирования иммунной клетки с цитокином или иммуностимулирующим рекомбинантным белком. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, STNGL, LPS, агонист CD40, лиганд 4-1BB, рекомбинантный рецептор 4-1BB, агонист TLR, бета-глюкан, IL-4, IL-13, IL-10, TGF- $\beta$ , глюкокортикоид, иммунный комплекс или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IFN- $\beta$ .

В некоторых вариантах осуществления стадия культивирования происходит после стадии доставки.

В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению приводит к получению модифицированной иммунной клетки, которая экспрессирует CAR. В некоторых вариантах осуществления экспрессия CAR повышена по сравнению с экспрессией CAR в модифицированной иммунной клетке того же типа, в которую была доставлена немодифицированная мРНК, кодирующая CAR. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка проявляет повышенную эффекторную активность по сравнению с эффекторной активностью модифицированной иммунной клетки того же типа, в которую была доставлена немодифицированная мРНК, кодирующая CAR.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к модифицированной иммунной клетке, полученной способом по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка проявляет повышенную

жизнеспособность по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышенную экспрессию мРНК, кодирующей CAR, по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышенную экспрессию CAR по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышенную продолжительность жизни мРНК, кодирующей CAR, по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышенную продолжительность жизни CAR по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка проявляет повышенную эффекторную активность по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка проявляет повышенную поляризацию M1 по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложены композиции, содержащие одну или более модифицированных мРНК, при этом одна или более модифицированных мРНК содержат модифицированный нуклеотид, изменение 5'- или 3'-нетранслируемой области (UTR), кэп-структуру, поли-A-хвост или их комбинацию, и один или более ингибиторов РНКазы L.

В некоторых вариантах осуществления кэп-структура включает AGCap1 или m6AGCap1. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид представляет собой псевдоуридин (PsU), 5-метоксиуридин (5moU), 5-метилцитидин/псевдоуридин (5meC PsU) или N1-метилпсевдоуридин (N1mPsU). В некоторых вариантах осуществления один или более ингибиторов РНКазы L включают сунитиниб. В некоторых вариантах осуществления один или более ингибиторов РНКазы L включают ABCG1.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

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

На **Фиг. 1A-1C** показаны типичные графики, иллюстрирующие жизнеспособность макрофагов (**Фиг. 1A**), среднюю интенсивность флуоресценции (**Фиг. 1B**) и устойчивость (**Фиг. 1C**) после электропорации или трансфекции мРНК mCherry, содержащей различные модификации.

На **Фиг. 2A-2C** показаны типичные графики, иллюстрирующие жизнеспособность макрофагов (**Фиг. 2A**) и экспрессию CAR (**Фиг. 2B** и **2C**) после электропорации или трансфекции мРНК CAR, содержащей различные модификации.

На **Фиг. 3A-3D** показаны типичные графики, иллюстрирующие влияние модификаций мРНК CAR на функцию макрофагов. На **Фиг. 3A** показана кривая роста опухоли через два дня после электропорации макрофагов с помощью мРНК CAR, а на **Фиг. 3B-3D** показаны кривые роста опухоли при совместном культивировании раковых клеток с макрофагами с CAR при соотношении эффектора (макрофаг с CAR) к мишени (раковая клетка) 4:1, 2:1 и 1:1, соответственно.

На **Фиг. 4A-4F** показаны типичные графики, иллюстрирующие жизнеспособность макрофагов с CAR (**Фиг. 4A** и **Фиг. 4C**), указанный поверхностный маркер означает среднюю интенсивность флуоресценции (**Фиг. 4B**, **Фиг. 4D**, **Фиг. 4E** и **Фиг. 4F**) после обработки цитокинами.

На **Фиг. 5A-5C** показаны типичные графики, иллюстрирующие жизнеспособность макрофагов (**Фиг. 5A**), экспрессию CAR (**Фиг. 5B**) и среднюю интенсивность флуоресценции (**Фиг. 5C**) после трансфекции мРНК CAR, включающей различные модификации, и обработки интерфероновым цитокином.

На **Фиг. 6** показан типичный график, иллюстрирующий постоянство экспрессии CAR в макрофагах, обработанных интерфероновым цитокином.

На **Фиг. 7A** и **7B** показаны типичные графики, иллюстрирующие жизнеспособность макрофагов с CAR, экспрессию CAR и среднюю интенсивность флуоресценции (**Фиг. 7A**) и индукцию маркеров M1 (**Фиг. 7B**) после трансфекции мРНК CAR и обработки различными концентрациями IFN- $\beta$ .

На **Фиг. 8A** и **8B** показаны типичные графики, иллюстрирующие среднюю интенсивность флуоресценции маркера M2 и M1 макрофагов с CAR через два дня (**Фиг. 8A**) или семь дней (**Фиг. 8B**) после электропорации мРНК CAR и обработки IFN- $\beta$ .

**На Фиг. 9А-9С** показаны типичные графики, иллюстрирующие противоопухолевую функцию макрофагов с CAR. **На Фиг. 9А** показаны результаты для макрофагов, трансфицированных мРНК CAR, с праймированием различными концентрациями IFN- $\beta$  или без него. **На Фиг. 9В** показаны результаты для макрофагов, трансфицированных мРНК CAR, включающей множество модификаций, и обработанных IFN- $\beta$ . **На Фиг. 9С** показаны результаты для макрофагов, трансфицированных мРНК CAR и обработанных интерфероновыми цитокинами.

**На Фиг. 10** показан типичный график, иллюстрирующий влияние обработки макрофагов с CAR интерферонами на секрецию цитокинов.

**На Фиг. 11А-11С** показаны типовые графики, иллюстрирующие влияние обработки интерферонами на персистенцию мРНК CAR в макрофагах и продолжительность функциональности макрофагов с CAR. **На Фиг. 11А** показаны результаты испытаний жизнеспособности и экспрессии CAR в макрофагах с CAR, обработанных интерфероновыми цитокинами. **На Фиг. 11В** и **Фиг. 11С** показаны результаты роста опухоли из раковых клеток, культивированных с макрофагами, подвергнутыми электропорации с помощью мРНК CAR и обработанных интерфероновыми цитокинами.

**На Фиг. 12А-12С** показаны типовые графики, иллюстрирующие влияние обработки интерферонами на жизнеспособность макрофагов, экспрессию CAR, экспрессию маркера М1 и функциональность макрофагов с CAR. **На Фиг. 12А** показана жизнеспособность, экспрессия CAR и экспрессия маркера М1 макрофагов, трансфицированных мРНК CAR и обработанных интерферонами. **На Фиг. 12В** и **Фиг. 12С** показаны результаты уничтожения опухоли из раковых клеток, культивированных с макрофагами, подвергнутыми электропорации с помощью мРНК CAR и обработанных интерфероновыми цитокинами.

**На Фиг. 13** показан типовой график, иллюстрирующий действие IFN- $\gamma$  на трансфицированные макрофаги.

**На Фиг. 14А-14С** показаны типовые графики, иллюстрирующие действие ингибиторов РНКазы L на макрофаги с CAR. **На Фиг. 14А** показана экспрессия mCherry в трансфицированных макрофагах после обработки IFN- $\gamma$  и ингибитором РНКазы L сунитинибом. **На Фиг. 14В** показана кривая роста опухоли для раковых клеток, культивированных с макрофагами с CAR, обработанными сунитинибом. **На Фиг. 14С** показана активность макрофагов с CAR, обработанных сунитинибом, по уничтожению опухолей.

**На Фиг. 15** показаны типовые графики, иллюстрирующие жизнеспособность макрофагов и экспрессию mCherry макрофагами, совместно трансфицированными мРНК, кодирующей mCherry, и мРНК, кодирующей ингибитор РНКазы L ABCE1.

**На Фиг. 16** показан типовой график, иллюстрирующий экспрессию CAR в макрофагах, совместно трансфицированных мРНК, кодирующей CAR, и мРНК, кодирующей ингибитор РНКазы L NS1.

**На Фиг. 17** показан типовой график, иллюстрирующий стабильность мРНК CAR в макрофагах, совместно трансфицированных мРНК, кодирующей CAR, и мРНК, кодирующей либо ингибитор РНКазы L ABCE1, либо ингибитор РНКазы L NS1.

**Фиг. 18А и 18В** представляют собой графики, демонстрирующие способность уничтожать опухоли (**Фиг. 18А**) и индукцию экспрессии маркеров M1 и M2 (**Фиг. 18В**) после инкубации макрофагов и макрофагов с CAR с лигандом CD40 (CD40L).

**Фиг. 19А и 19В** представляют собой графики, демонстрирующие способность уничтожать опухоли (**Фиг. 19А**) и индукцию экспрессии маркеров M1 и M2 (**Фиг. 19В**) после инкубации макрофагов и макрофагов с CAR с 4-1BB.

**Фиг. 20А и 20В** представляют собой графики, демонстрирующие способность к уничтожению опухоли (**Фиг. 20А**) и индукцию экспрессии маркеров M1 и M2 (**Фиг. 20В**) после инкубации макрофагов и макрофагов с CAR с лигандом 4-1BB (4-1BBL).

**На Фиг. 21** показаны типовые графики, иллюстрирующие экспрессию CAR в человеческих моноцитах, подвергнутых электропорации с мРНК CAR.

**На Фиг. 22** показан типичный график, иллюстрирующий эффективность CAR-макрофагов, полученных с помощью электропорации мРНК, с или без праймирования IFN- $\beta$ , в мышинной модели солидной опухоли с ксенотрансплантатом.

**На Фиг. 23** показан типичный график, иллюстрирующий эффективность CAR-макрофагов, полученных с помощью электропорации мРНК, с или без праймирования IFN- $\beta$ , в сингенной мышинной модели солидной опухоли.

## **ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

Для того, чтобы настоящее изобретение было более понятным, сначала представлены определения некоторых терминов. Дополнительные определения для следующих терминов и других терминов изложены в описании. Публикации и другие справочные материалы, на которые даны ссылки в данном документе для описания предпосылок создания изобретения

и предоставления дополнительных подробностей относительно его практического применения, включены в данный документ посредством ссылки.

В контексте данного документа форма единственного числа используется для обозначения одного или более чем одного (т. е. для по меньшей мере одного) грамматического объекта описания. 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 значений, представляющим интерес, 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, фагоцитозом, передачей клеточных сигналов, уничтожением клеток-мишеней и/или процессингом и презентацией 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 и другие функции.

*Агент:* В контексте данного документа термин «агент» (или «биологический агент» или «терапевтический агент») относится к молекуле, которая может экспрессироваться, высвободиться, секретироваться или доставляться к мишени модифицированной клеткой, описанной в настоящем документе. Агент включает, помимо прочего, нуклеиновую кислоту, антибиотик, противовоспалительное средство, антитело или его фрагменты, агент-

антитело или его фрагменты, фактор роста, цитокин, фермент, белок (например, ингибитор РНКазы), пептид, слитый белок, синтетическая молекула, органическая молекула (например, низкомолекулярное вещество), углевод, липид, гормон, микросома, их производное или вариант 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 канонической последовательности иммуноглобулина, достаточные для обеспечения специфического связывания с конкретным антигеном-мишенью. Как известно в данной области техники, интактные антитела, полученные в природе, представляют собой тетрамерные агенты с молекулярной массой приблизительно 150 кДа, содержащие два идентичных полипептида тяжелой цепи (около 50 кДа каждый) и два идентичных полипептида 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) – аминоконцевой вариабельный (VH) домен (расположенный на концах Y-структуры), за которым следуют три константных домена: CH1, CH2 и карбоксиконцевой CH3 (расположенный у основания стебля 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: аминоконцевой вариабельный (VL) домен, за которым следует карбоксиконцевой константный (CL) домен, отделенные друг от друга другим «переключателем». Интактные тетрамеры антител содержат два димера тяжелой и легкой цепей, в которых тяжелая и легкая цепи связаны друг с другом одинарной дисульфидной связью; две другие дисульфидные связи соединяют шарнирные области тяжелой цепи друг с другом, так что димеры соединяются друг с другом и образуется тетрамер. Природные антитела также являются гликозилированными, обычно в домене 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 инвариантных «каркасных» области (FR1, FR2, FR3 и FR4). Когда природные антитела складываются, FR-области образуют бета-листы, которые обеспечивают структурный каркас для доменов, а области петель CDR как тяжелой, так и легкой цепей объединяются в трехмерном пространстве, так что они создают единый гипервариабельный антигенсвязывающий сайт, расположенный на вершине Y-структуры. Fc-область встречающихся в природе антител связывается с элементами системы комплемента, а также с рецепторами на эффекторных клетках, включая, например, эффекторные клетки, которые опосредуют цитотоксичность. Аффинность и/или другие атрибуты связывания Fc-областей с Fc-рецепторами можно модулировать посредством гликозилирования или другой модификации. В некоторых вариантах осуществления антитела, полученные и/или применяемые в соответствии с настоящим изобретением (например, в качестве компонента CAR), включают гликозилированные Fc-домены, включая Fc-домены 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, характерные для антител мыши, кролика, примата или человека. В некоторых вариантах осуществления элементы последовательности антител являются гуманизированными, приматизированными, химерными и т. д., как известно в данной области техники. Кроме того, термин «антитело», в контексте данного документа, может относиться в соответствующих вариантах осуществления (если не указано иное или не ясно из контекста) к любой из известных в данной области техники 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, помимо прочего, из интактных антител IgA, IgG, IgE или IgM; би- или мультиспецифических антител (например, Zybodies® и т. д.); фрагментов антител, таких как Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, Fd'-фрагменты, Fd-фрагменты и выделенные CDR или их наборы;

одноцепочечных FVS; слитых полипептид-Fc; однодоменных антител (например, однодоменные антитела акулы, такие как IgNAR или их фрагменты); антител верблюжьих; маскированных антител (например, Probodies®); малых модульных иммунофармацевтических препаратов («SMIP™»); одноцепочечных или tandemных диател (TandAb®); VHH; Anticalin®; Nanobodies®; минител; BiTE®; белки анкириновых повторов или DARPIN®; Avimer®; DART; ТКР-подобных антител; Adnectin®; Affilin®; транс-тел (Trans-bodies®); Affibodies®; TrimerX®; микропротеинов; Fynomers®, Centyrins® и KALBITOR®. В некоторых вариантах осуществления антитело может не иметь ковалентную модификацию (например, присоединение гликана), которую оно имел бы, если бы было 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-антитело:* В контексте данного документа термин «агент-антитело» 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. Типичные агенты-антитела включают, помимо прочего, моноклональные антитела или поликлональные антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело может включать одну или более последовательностей константной области, характерных для антител мыши, кролика, примата или человека. В некоторых вариантах осуществления агент-антитело может включать один или несколько элементов последовательности, которые являются гуманизированными, приматизированными, химерными и т.д., как известно в данной области техники. Во многих вариантах осуществления термин «агент-антитело» используется для обозначения одной или нескольких 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-антитело, используемый в соответствии с настоящим изобретением, находится в формате, выбранном, помимо прочего, из интактных антител IgA, IgG, IgE или IgM; би- или мультиспецифических антител (например, Zybodies® и т. д.); фрагментов антител, таких как Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, Fd'-фрагменты, Fd-фрагменты и выделенные CDR или их наборы; одноцепочечных FVS; слитых полипептид-Fc; однодоменных антител (например, однодоменные антитела акулы, такие

как IgNAR или их фрагменты); антител верблужьих; маскированных антител (например, Probodies®); малых модульных иммунофармацевтических препаратов («SMIPTM»); одноцепочечных или tandemных диател (TandAb®); VHH; Anticalin®; Nanobodies®; минител; BiTE®; белки анкириновых повторов или DARPIN®; Avimer®; DART; ТКР-подобных антител; Adnectin®; Affilin®; транс-тел (Trans-bodies®); Affibodies®; TrimerX®; микропротеинов; Fynomers®, Centyrins® и KALBITOR®. В некоторых вариантах осуществления агент-антитело может не иметь ковалентную модификацию (например, присоединение гликана), которую оно имел бы, если бы было получен естественным образом. В некоторых вариантах осуществления агент-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.]. Во многих вариантах осуществления агент-антитело представляет собой или содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого включает один или несколько структурных элементов, известных специалистам в данной области техники как определяющая комплементарность область (CDR); в некоторых вариантах осуществления агент-антитело 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 сути идентична CDR, обнаруженной в эталонном антителе. В некоторых вариантах осуществления включенная CDR по сути 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 сути идентична эталонной CDR в том, что она имеет 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 сути идентична эталонной CDR в том, что она имеет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включенная CDR по сути 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 сути идентична эталонной CDR в том, что по меньшей мере 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 сути 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 сути идентична эталонной CDR в том, что по меньшей мере 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 агент-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 агент-антитело представляет собой полипептидный белок, имеющий домен связывания, гомологичный или в значительной степени гомологичный иммуноглобулин-связывающему домену. В некоторых вариантах осуществления агент-антитело не представляет собой 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-антитело может представлять собой или содержать молекулу или композицию, которая не включает структурные элементы иммуноглобулина (например, рецептор или другую встречающуюся в природе 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 антигены переменным областям интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, помимо прочего, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и фрагменты Fv, линейные антитела, антитела scFv и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител, и их человеческие и гуманизированные версии.

*Тяжелая цепь антитела:* В контексте данного документа термин «тяжелая цепь антитела» относится к большей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих во всех молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях.

*Легкая цепь антитела:* В контексте данного документа термин «легкая цепь антитела» относится к меньшему из двух типов полипептидных цепей, присутствующих во всех молекулах антител в их встречающихся в природе 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 настоящем 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 «Ag» относится к молекуле, которая способна провоцировать иммунный ответ. Такой иммунный ответ может предполагать либо выработку антител, либо активацию специфичных иммунокомпетентных клеток, либо 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. Специалист в данной области техники поймет, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидные последовательности или частичную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, кодирует «антиген», как этот термин используется в настоящем документе. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген не обязательно должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Совершенно очевидно, что настоящее изобретение включает, но не ограничивается этим, применение частичных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена и что эти нуклеотидные последовательности расположены в различных комбинациях, 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 синтезированным 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 настоящего 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 настоящему изобретению в первую очередь предотвращать появление опухоли.

*Аутологичный:* В контексте настоящего документа термин «аутологичный» относится к любому материалу, полученному от индивидуума, которому он позднее будет повторно введен тому же индивидууму.

*Аллогенный:* В контексте настоящего документа термин «аллогенный» относится к любому материалу (например, популяции клеток), полученному от другого животного того же вида.

*Ксеногенный:* В контексте настоящего документа термин «ксеногенный» относится к любому материалу (например, популяции клеток), полученному от животного другого вида.

*Рак:* В контексте настоящего документа термин «рак» относится к заболеванию, характеризующемуся быстрым и неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела. Примеры различных раковых заболеваний описаны в настоящем документе, к ним относится, помимо прочего, рак молочных желез, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почек, рак печени, рак головного мозга, лимфома, лейкемия, рак легких и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой медуллярную карциному щитовидной железы.

*Консервативные модификации последовательности:* В контексте настоящего документа термин «консервативные модификации последовательности» относится к аминокислотным модификациям, которые существенно не влияют или не изменяют характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации могут быть введены в антитело, совместимое с различными вариантами осуществления, стандартными методами, известными в данной области техники, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены аминокислотного остатка 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, и измененное антитело можно протестировать на способность связывать антигены с использованием описанных в данном документе функциональных анализов.

*Костимулирующий лиганд:* В контексте настоящего документа термин «костимулирующий лиганд» относится к молекуле на антигенпрезентирующей клетке (например, АПК, дендритной клетке, В-клетке и т.п.), которая специфически связывает родственную костимулирующую молекулу на моноците/макрофаге/дендритной клетке, тем самым обеспечивая сигнал, который опосредует ответ моноцита/макрофага/дендритной клетки, включая, помимо прочего, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. Костимулирующий лиганд может включать, помимо прочего, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, индуцируемый костимулирующий лиганд (ICOS-L), межклеточную молекулу адгезии (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, бета-рецептор лимфотоксина, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, агонист или антитело, которое связывает рецептор-лиганд Toll 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, помимо прочего, 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.

*Цитотоксический:* В контексте настоящего документа термин «цитотоксический» или «цитотоксичность» относится к уничтожению или повреждению клеток. В одном варианте осуществления улучшается цитотоксичность метаболически усиленных клеток, т.е. повышение цитолитической активности макрофагов.

*Эффективное количество:* В контексте настоящего документа термины «эффективное количество» и «терапевтически эффективное количество» являются взаимозаменяемыми и

относятся к количеству соединения, состава, материала или композиции, как описано в настоящем документе, эффективному для достижения конкретного биологического результата или обеспечивающему производственную, терапевтическую или профилактическую пользу. Такие результаты могут включать, помимо прочего, противоопухолевую активность, определяемую любым способом, подходящим в данной области техники.

*Эффекторная функция:* В контексте настоящего 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 нездоровых клеток путем фагоцитоза.

*Кодирование:* В контексте настоящего документа «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 (т.е., 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 настоящего документа термин «эндогенный» относится к любому материалу, полученному из определенного организма, клетки, ткани или системы или продуцируемому внутри него.

*Экзогенный:* В контексте настоящего документа термин «экзогенный» относится к любому материалу, введенному из или произведенному вне конкретного организма, клетки, ткани или системы.

*Размножение:* В контексте настоящего документа термин «размножение» относится к увеличению количества, как, например, увеличение количества клеток, например, моноцитов, макрофагов и/или дендритных клеток. В одном варианте осуществления количество моноцитов, макрофагов или дендритных клеток, размноженных *ex vivo*,

увеличивается по сравнению с количеством, первоначально присутствующим в культуре. В другом варианте осуществления количество моноцитов, макрофагов или дендритных клеток, размноженных *ex vivo*, увеличивается по сравнению с другими типами клеток в культуре. В некоторых вариантах осуществления может происходить размножение *in vivo*. 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 образованию любого генного продукта из последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления генный продукт может представлять собой транскрипт. В некоторых вариантах осуществления генный продукт может представлять собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления экспрессия последовательности нуклеиновой кислоты включает одно или более из следующего: (1) продукции матрицы РНК из последовательности ДНК (*например*, путем транскрипции); (2) процессинга транскрипта РНК (*например*, путем сплайсинга, редактирования, образования 5'-кэп-структуры и/или образования 3'-концевой структуры); (3) трансляции РНК в полипептид или белок; и/или (4) посттрансляционной модификации полипептида или белка.

*Вектор экспрессии:* Используемый в данном документе термин «вектор экспрессии» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, который содержит регулирующие экспрессию последовательности, функционально соединенные с нуклеотидной последовательностью, которая подлежит экспрессии. Вектор экспрессии содержит достаточно *цис-действующих* 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).

*Фрагмент:* В контексте данного документа термины «фрагмент» или «часть» относятся к структуре, которая включает в себя дискретную часть целого, но не имеет одного или нескольких фрагментов, присутствующих во всей структуре. В некоторых вариантах осуществления фрагмент состоит из такой дискретной части. В некоторых вариантах осуществления фрагмент состоит из или содержит характерный структурный элемент или часть, присутствующую 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 целом нуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный фрагмент содержит или состоит из по меньшей мере около 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более мономерных единиц (например, остатков), обнаруженных в целом нуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления весь материал или объект может называться «исходным» для целого.

*Гомология:* В контексте данного документа термин «гомология» относится к общему сходству между полимерными молекулами, например, между молекулами нуклеиновой кислоты (*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 по меньшей мере на 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичны. В некоторых вариантах осуществления полимерные молекулы считаются «гомологичными» друг другу, если их последовательности меньшей мере на 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% схожи (например, содержащие остатки с схожими 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 наличия гэпов определенной длины в одной последовательности относительно другой при рассмотрении того, какие остатки «соответствуют» друг к другу в разных последовательностях. Например, вычисление процента гомологии между двумя последовательностями нуклеиновой кислоты может быть выполнено путем выравнивания двух последовательностей с целью оптимального сравнения (например, гэпы могут быть введены в одну или обе из первой и второй последовательностей нуклеиновых кислот для оптимального выравнивания, а несоответствующие последовательности могут быть проигнорированы для целей сравнения). В определенных 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 сути 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 идентичны в этом положении; когда положение в первой последовательности занято схожим нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы схожи в этом положении. Процент гомологии между двумя последовательностями является функцией количества идентичных и схожих положений, общих для последовательностей, с учетом количества гепов и длины каждого гепа, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей.

*Идентичность:* В контексте данного документа термин «идентичность» относится к идентичности последовательности субъединиц между двумя полимерными молекулами, в частности, между двумя аминокислотными молекулами, например, между двумя полипептидными молекулами. 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%.

*Идентичность по существу:* В контексте данного документа «идентичность по существу» относится к сравнению между аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот. Как будет понятно специалистам в данной области техники, две последовательности, как правило, считаются «по сути 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, BLAST с гепами и PSI-BLAST для аминокислотных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления две последовательности считаются по сути 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 «идентичность по существу» обычно относится к CDR, имеющей аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную эталонной CDR.

*Иммунная клетка:* В контексте настоящего документа термин «иммунная клетка» относится к клетке, которая участвует в иммунном ответе, например, в стимулировании иммунного ответа. Примеры иммунных клеток включают, помимо прочего, макрофаги, моноциты, дендритные клетки, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки, тромбоциты, крупные гранулярные лимфоциты, клетки Лангерганса, естественные клетки-киллеры (NK), Т-лимфоциты или В-лимфоциты. Источник иммунных клеток (например, макрофагов, моноцитов или дендритных клеток) может быть получен от субъекта.

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

*Иммуноглобулин:* В контексте настоящего документа термин «иммуноглобулин» или «Ig» относится к классу белков, которые функционируют как антитела. Антитела, экспрессируемые В-клетками, иногда называют BCR (В-клеточный рецептор) или антигенный рецептор. 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, желудочно-кишечные выделения и выделения 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

немедленную гиперчувствительность, вызывая высвобождение медиаторов из тучных клеток и базофилов при воздействии аллергена.

*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 сути очищенной форме или могут существовать в чужеродной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

*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 путем введения нуклеиновых кислот.

*Модулирующий:* В контексте данного документа термин «модулирующий» относится к опосредованию обнаруживаемого повышения или снижения уровня ответа и/или изменения характера ответа у субъекта по сравнению с уровнем и/или характером ответа у субъекта в отсутствие лечения или соединения и/или по сравнению с уровнем и/или характером ответа у идентичного во всем остальном, но не получавшего лечения, субъекта. Этот термин включает нарушение и/или воздействие на нативный сигнал или ответ, тем самым опосредуя полезный терапевтический ответ у субъекта, предпочтительно у человека.

*Нуклеиновая кислота:* В контексте данного документа термин «нуклеиновая кислота» относится к полимеру, состоящему по меньшей мере из трех нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает РНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является одноцепочечной. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является двухцепочечной. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит как одноцепочечные, так и двухцепочечные части. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит остов, содержащий одну или несколько фосфодиэфирных связей. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит остов, содержащий как фосфодиэфирные, так и нефосфодиэфирные связи. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может содержать остов, который содержит одну или несколько тиофосфатных или 5'-N-фосфорамидитных связей и/или одну или несколько пептидных

связей, например, как в «пептидо-нуклеиновой кислоте». В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит один или несколько или все природные остатки (*например*, аденин, цитозин, дезоксиаденозин, дезоксицитидин, дезоксигуанозин, дезокситимидин, гуанин, тимин, урацил). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит один или несколько или все неприродные остатки. В некоторых вариантах осуществления неприродный остаток содержит аналог нуклеозида (*например*, 2-аминоаденозин, 2-тиотимидин, инозин, пирролопиримидин, 3-метиладенозин, 5-метилцитидин, C-5 пропинилцитидин, C-5 пропинилцитидин-уридин, 2-аминоаденозин, C5-бромурин, C5-фторурин, C5-йодоурин, C5-пропинилурин, C5-пропинилцитидин, C5-метилцитидин, 2-аминоаденозин, 7-дезааденозин, 7-дезагуанозин, 8-оксааденозин, 8-оксогуанозин, 0(6)-метилгуанин, 2-тиоцитидин, метилированные основания, интеркалированные основания и их комбинации). В некоторых вариантах осуществления неприродный остаток содержит один или несколько модифицированных сахаров (*например*, 2'-фторрибозу, рибозу, 2'-дезоксирибозу, арабинозу и гексозу) по сравнению с природными остатками. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональный генный продукт, такой как РНК или полипептид. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, содержащую один или несколько интронов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может быть получена путем выделения из природного источника, ферментативного синтеза (*например*, путем полимеризации на основе комплементарной матрицы, *например*, *in vivo* или *in vitro*, репродукции в рекомбинантной клетке или системе, или химического синтеза. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет длину по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 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, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или более остатков.

**Функционально связанный:** В контексте данного документа термин «функционально связанный» относится к функциональной связи между, *например*, регуляторной последовательностью и последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты, приводящей к экспрессии 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 области заболевания, такой как солидная опухоль в определенной ткани или органа пациента по отношению к уровню экспрессии в нормальной клетке из этой ткани или органа. У пациентов с солидными опухолями или гематологическими злокачественными новообразованиями, характеризующимися сверхэкспрессией опухолевого антигена, можно провести определение 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. В контексте данного документа полинуклеотиды включают, помимо прочего, 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 продуцирована посредством действий человека. 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 содержать 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 включать 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 содержать циклическую часть. В некоторых вариантах осуществления полипептид не является циклическим и/или не содержит 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 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 или идентичность последовательности, имеет общий мотив последовательности (например, характерный элемент последовательности) и/или разделяет общую активность (в некоторых варианты 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 или идентичности

последовательности 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 содержать элемент характеристической 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 содержать или состоять из фрагмента родительского полипептида. В некоторых вариантах осуществления применимый полипептид, который может содержать или состоять из множества фрагментов, каждый из которых находится в одном и том же родительском полипептиде в другом пространственном расположении относительно друг друга, чем в представляющем интерес полипептиде (например, фрагменты, которые непосредственно связаны в родительском, могут быть пространственно разделены в представляющем интерес полипептиде или наоборот, и/или фрагменты могут присутствовать в представляющем интерес полипептиде в другом порядке, чем в родительском), таким образом представляющий интерес полипептид является производным его родительского полипептида.

*Белок:* В контексте данного документа термин «белок» относится к полипептиду (т. е. цепочке из по меньшей мере двух аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями). Белки могут включать фрагменты, отличные от аминокислот (*например*, могут представлять собой гликопротеины, протеоглики и т. д.), и/или могут быть обработаны или модифицированы иным образом. Специалистам в данной области техники будет понятно, что «белок» может представлять собой полную полипептидную цепь, продуцируемую клеткой (с сигнальной последовательностью или без нее), или может представлять собой ее характерную часть. Специалистам в данной области техники будет понятно, что белок иногда может включать более одной полипептидной цепи, например, связанной одной или более дисульфидными связями или связанной другими способами. Полипептиды могут содержать L-аминокислоты, D-аминокислоты или и то, и другое, и могут содержать любую из множества модификаций или аналогов аминокислот, известных в данной области техники. Применимые модификации включают, например, терминальное 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 передачи сигнала:* В контексте данного документа термин «путь передачи сигнала» 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 в себя 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, образованным методами рекомбинантной ДНК, в которых фрагменты тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина связаны с Fv-областью через сконструированный диапазон аминокислот. Известны различные способы получения одноцепочечных антител, в том числе описанные в патентах 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 агент-антитело, относится к антигенсвязывающему домену или антителу, которое распознает специфический антиген, но по сути не распознает или не связывает другие молекулы в образце. Например, антигенсвязывающий домен или агент-антитело, который специфически связывается с антигеном одного вида, также может связываться с этим антигеном одного или нескольких видов. Но такая межвидовая реактивность сама по себе не изменяет классификацию антигенсвязывающего домена или агента-антитела как специфического. В другом примере антигенсвязывающий домен или агент-антитело, которое 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 агента-антитела как специфического. В некоторых случаях термины «специфическое связывание» или «специфично связывается» могут использоваться в отношении взаимодействия антигенсвязывающего домена или агента-антитела, белка или пептида со вторым

химическим веществом, что означает, что взаимодействие зависит от присутствия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) химического вещества; например, антигенсвязывающий домен или агент-антитело распознает и связывается с конкретной структурой белка, а не с белками в целом. Если антигенсвязывающий домен или агент-антитело специфичны для эпитопа «А», присутствие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободного, немеченого А), в реакции, содержащей меченый «А» и антигенсвязывающий домен или агент-антитело, будет уменьшить количество меченого А, связанного с антителом.

*Стимуляция:* В контексте данного документа термин «стимуляция» относится к первичной реакции, индуцированной связыванием стимулирующей молекулы (например, комплекса FcR, комплекса TLR или комплекса ТКР/CD3), например, с его родственным лигандом, тем самым опосредуя событие передачи сигнала, такое как, помимо прочего, передача сигнала через аппарат Fc-рецептора или через синтетический CAR. Стимуляция может опосредовать измененную экспрессию определенных молекул, такую как подавление TGF-бета и/или реорганизацию структур цитоскелета 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, содержащий CD64 (FcγRI), CD32a (FcγRIIa), CD32b (FcγRIIb), CD32c, CD16a (FcγRIIIa), CD16b (FcγRIIIb), FcεRI, FcεRII, FcαRI (CD89) или домен CD40. В некоторых вариантах осуществления стимулирующая молекула содержит внеклеточный домен TLR, содержащий 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 когнатным партнером по связыванию (называемым в настоящем документе «стимулирующей молекулой») на моноците, макрофаге или дендритной клетке, тем самым опосредуя ответ иммунной клетки, включая, помимо прочего, активацию, инициацию иммунного ответа, пролиферация и тому подобное. Стимулирующие лиганды хорошо известны в данной области техники и включают, *среди прочего*, лиганд Toll-подобного рецептора (TLR), антитело против толл-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 или собаке). В некоторых вариантах осуществления субъект-человек является взрослым, подростком или ребенком. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает заболеванием, расстройством или состоянием, например, заболеванием, расстройством или состоянием, которое можно лечить, как предусмотрено в настоящем документе, например раком или опухолью, перечисленными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субъект подвержен заболеванию, расстройству или состоянию; в некоторых вариантах осуществления субъект предрасположен и/или демонстрирует повышенный риск (по сравнению со средним риском, наблюдаемым у контрольного субъекта или популяции) развития заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления у субъекта проявляются один или несколько симптомов заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления у субъекта не наблюдается конкретного симптома (например, клинического проявления заболевания) или характеристики заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления у субъекта не проявляется никаких симптомов или характеристик заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъектом является пациент. В некоторых вариантах осуществления субъектом является индивидуум, которому поставлен диагноз и/или назначена терапия.

*По сути очищенный:* В контексте данного документа термин «по сути очищенный», например, применительно к клетке, относится к клетке, которая по сути не содержит других типов клеток. По сути 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 сути 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 клетки культивируют *in vitro*. В других вариантах осуществления клетки не культивируют *in vitro*.

*Мишень:* В контексте данного документа термин «мишень» относится к клетке, ткани, органу или участку в организме, который является объектом предлагаемых способов, систем и/или композиций, например, клетке, ткани, органу или участку в организме,

который нуждается в лечении или предпочтительно связан, например, с антителом (или его фрагментом) или CAR.

*Целевой сайт:* Используемый в настоящем документе термин «целевой сайт» 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.

*Т-клеточный рецептор:* Используемый в настоящем документе термин «Т-клеточный рецептор» или «ТКР» относится к комплексу мембранных белков, которые участвуют в активации Т-клеток в ответ на презентацию антигена. ТКР отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости. ТКР содержит гетеродимер альфа- ( $\alpha$ ) и бета- ( $\beta$ ) цепи, хотя в некоторых клетках ТКР содержит гамма- и дельта- ( $\gamma/\delta$ ) цепи. ТКР могут существовать в альфа/бета и гамма/дельта формах, которые структурно схожи, но имеют различные анатомические локализации и функции. Каждая цепь включает два внеклеточных домена, переменный и константный домен. В некоторых вариантах осуществления ТКР может быть модифицирован на любой клетке, содержащей ТКР, включая, например, хелперную Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку, Т-клетку памяти, регуляторную Т-клетку, естественную Т-клетку-киллер и гамма-дельта Т-клетку..

*Терапевтический:* Используемый в данном документе термин «терапевтический» относится к лечению и/или профилактике. Терапевтический эффект достигается путем подавления, ремиссии или устранения болезненного состояния.

*Трансфицированный:* Используемый в данном документе 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 экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную клетку субъекта и ее потомство.

*Лечить:* Используемый в данном документе термин «лечить», «лечение» или «процесс лечения» относится к частичному или полному облегчению, улучшению, отсрочке наступления, ингибированию, предотвращению, облегчению и/или снижению частоты и/или тяжести одного или нескольких симптомов или признаков заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение может быть назначено субъекту, у которого нет симптомов или признаков заболевания, расстройства и/или

состояния (например, может быть профилактическим). В некоторых вариантах осуществления лечение может быть назначено субъекту, у которого проявляются только ранние или легкие симптомы или признаки заболевания, расстройства и/или патологического состояния, например, с целью снижения риска развития патологии, ассоциированной с заболеванием, расстройством и/или патологическим состоянием. В некоторых вариантах осуществления лечение может быть назначено субъекту, у которого проявляются установленные, тяжелые и/или поздние признаки заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение может включать введение в иммунную клетку (например, моноцит, макрофаг или дендритную клетку) или введение в иммунную клетку модулятора пути, активируемого транскрибируемой мРНК *in vitro*.

*Опухоль*: Используемый в данном документе термин «опухоль» относится к аномальному росту клеток или ткани. В некоторых вариантах осуществления опухоль может содержать клетки, которые являются предраковыми (*например, доброкачественными*), злокачественными, преметастатическими, метастатическими и/или неметастатическими. В некоторых вариантах осуществления опухоль связана с раком или является его проявлением. В некоторых вариантах осуществления опухоль может быть дисперсной опухолью или жидкостной опухолью. В некоторых вариантах осуществления опухоль может представлять собой солидную опухоль.

*Вектор*: Используемый в данном документе 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 толковать как включающий неплазмидные и невирусные соединения, которые облегчают перенос нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, соединения полилизина, липосомы и т.п. К примерам вирусных векторов относятся, помимо прочего, аденовирусные векторы, векторы адено-ассоциированного вируса, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т. п.

В этом изобретении различные аспекты изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в виде диапазонов предоставляется исключительно для удобства и краткости, и его не следует воспринимать как негибкое ограничение объема настоящего изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также

отдельные числовые значения в этом диапазоне. 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**

### ***Иммунные клетки***

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

В некоторых вариантах осуществления популяция иммунных клеток, как описано в настоящем 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, передачу сигналов клетками, уничтожение клеток-мишеней и/или презентацию антигена, например, по сравнению с неактивной клеткой. 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 TNF, IL-12, IFN, ГМ-КСФ, Г-КСФ, М-КСФ или IL-1), например, относительно неактивной клетки. В некоторых вариантах осуществления активированные иммунные клетки подвергаются клеточному делению. В некоторых вариантах осуществления целевая эффекторная активность иммунной клетки усиливается за счет ингибирования активности CD47 и/или SIRP $\alpha$ . Активность CD47 и/или SIRP $\alpha$  можно ингибировать путем обработки иммунной клетки антителом против CD47 или против SIRP $\alpha$  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 мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, ткань селезенки, пуповину, опухоли и/или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, такие как эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). В некоторых 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 фиколлом. 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, в фосфатно-солевом буфере (ФСБ)) или культуральных средах. В некоторых вариантах осуществления обогащение иммунных клеток (например, моноцитами) включает прилипание к пластику. В некоторых вариантах осуществления после обогащения дифференцировка иммунных клеток (например, моноцитов) включает стимуляцию ГК-КСФ. В некоторых вариантах осуществления для обогащения используют композицию, содержащую клетки крови (например, моноциты, лимфоциты, тромбоциты, плазму и/или эритроциты), такую как композиция для лейкоафереза (например, лейкопак). В некоторых вариантах осуществления композиция для лейкоафереза (например, лейкопак) содержит образец здорового донора-человека. В некоторых вариантах осуществления за аферезом иммунных клеток (например, моноцитов) следует мобилизация с помощью ГК-КСФ. В некоторых вариантах осуществления селекция иммунных клеток (например, моноцитов) включает CD14-положительную селекцию с использованием микрогранул (например, микрогранулы MACS® на устройстве CliniMACS Prodigy). В некоторых вариантах осуществления в композициях и способах, описанных в настоящем документе, используется предшественник иммунных клеток (например, предшественники макрофагов, моноцитов или дендритных клеток). Предшественники иммунных клеток могут дифференцироваться *in vivo* или *ex vivo* в иммунные клетки. Неограничивающие примеры предшественников иммунных клеток 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 (иПСК) могут быть получены из

нормальных тканей человека, таких как периферическая кровь, фибробласты, кожа, кератиноциты или почечные эпителиальные клетки. Аутологичные, аллогенные или универсальные донорные иПСК могут быть дифференцированы в миелоидные линии (например, моноцитов, макрофагов, дендритных клеток или их предшественников).

Иммунные клетки (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), как описано в настоящем документе, могут быть выделены из периферической крови, например, путем лизиса эритроцитов и истощения лимфоцитов и эритроцитов, например, путем центрифугирования в градиенте PERCOLL™. Альтернативно, иммунные клетки могут быть выделены из ткани пуповины. Конкретная субпопуляция иммунных клеток может быть дополнительно выделена методами положительной или отрицательной селекции. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут быть деплетированы относительно клеток, экспрессирующих определенные антигены, включая, помимо прочего, 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 настоящем 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 гранулы и клетки смешиваются друг с другом, чтобы обеспечить максимальную площадь контакта клеток и гранул.

В некоторых вариантах осуществления перед введением иммунные клетки (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), как описано в настоящем документе (например, содержащие CAR, описанный в настоящем документе), обрабатывают провоспалительным агентом. В некоторых вариантах осуществления обработка провоспалительным агентом повышает противоопухолевую активность иммунных клеток, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления обработка провоспалительным агентом способствует фенотипу M1 (например, переключению с фенотипа M2 на фенотип M1) в иммунных клетках, описанных в настоящем 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 агонистов 41BB-лиганда (например, 4-1BB).

В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), как описано в настоящем документе (например, содержащие CAR, описанный в настоящем документе), вводят субъекту в комбинации с провоспалительным агентом. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), как описано в настоящем документе (например, содержащие CAR, описанный в настоящем документе), вводят субъекту по сути одновременно, до или после введения провоспалительного агента. В некоторых вариантах осуществления введение провоспалительного агента повышает противоопухолевую активность иммунных клеток, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления введение провоспалительного агента способствует фенотипу M1 (например, переключению с фенотипа M2 на фенотип M1) в иммунных клетках, описанных в настоящем 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 агонистов 41BB-лиганда (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 представление опухолевых антигенов для организации адаптивного противоопухолевого иммунного ответа.

Накопленные данные свидетельствуют о том, что макрофаги в изобилии присутствуют в микроокружении многих видов рака и могут принимать ряд фенотипов, которые в совокупности называются ассоциированными с опухолью макрофагами (TAM). Иммуносупрессивная природа микроокружения опухоли обычно приводит к большему количеству M2-подобных TAM, 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 фенотип, в большей степени M1, связано с продуктивными противоопухолевым иммунным ответом. Индукция эндогенных ТАМ к переключению на клетки типа M1 и конструирование макрофагов, которые не могут быть преобразованы в M2, значительно улучшит противоопухолевую иммунотерапию и представляет собой значительный прогресс в этой области техники.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг содержит или представляет собой недифференцированный макрофаг или макрофаг M0. В некоторых 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 макрофагов M0 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 макрофаги M0 могут подвергаться воздействию провоспалительных сигналов, таких как LPS, IFN $\gamma$  и ГК-КСФ, и поляризоваться в макрофаги M1. Как правило, макрофаги M1 связаны с провоспалительными иммунным ответом, таким как ответ Т-клеток Th1 и Th17. Воздействие других стимулов может поляризовать макрофаги в разнообразную группу «альтернативно активированных» или макрофагов M2.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг содержит или представляет собой макрофаг M1. В некоторых вариантах осуществления макрофаг экспрессирует один или несколько маркеров макрофагов M1 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 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 член семейства ISG).

В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, секретирует относительно высокие уровни одного или нескольких воспалительных цитокинов (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, или 12 из IL-1, TNF, IL-12, IL-18, IL-23, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-8 или IL33) или хемокинов (например, один или оба хемокинов CC или CXC) (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 хемокинов CXC; например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 хемокинов CC; например, один из хемокинов CX3C, например, один или оба хемокина C), например,

относительно макрофага без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, стимулирует иммунный ответ и/или воспаление, например, по сравнению с макрофагом без CAR, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг содержит или представляет собой макрофаг M2 (например, макрофаг M2a, M2b, M2c и M2d). Макрофаг M2a может индуцироваться IL-4, IL-13 и/или грибковой инфекцией. Макрофаг M2b может индуцироваться лигандами IL-1R, иммунным комплексом и/или LPS. Макрофаг M2c может индуцироваться IL-10 и/или TGFβ. Макрофаг M2d может индуцироваться IL-6 и/или аденозином. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, снижает иммунный ответ у субъекта, например, по сравнению с макрофагом без CAR, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг экспрессирует один или несколько маркеров макрофагов M2 (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 настоящем документе, проявляет повышенную секрецию одного или нескольких противовоспалительных цитокинов (*например*, одного или обоих IL-10 или TGFβ), например, по сравнению с макрофагом без CAR, как описан в данном документе.

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

В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет повышенный фагоцитоз, например, по сравнению с макрофагом без CAR, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет повышенную цитотоксичность в отношении опухолевой клетки, например, по сравнению с макрофагом без CAR, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере

один CAR, описанный в настоящем 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 настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет повышенное уничтожение опухоли (например, за счет фагоцитоза, лизиса, апоптоза или продукции цитокинов, уничтожающих опухоль (например, TNF $\alpha$ ), например, по сравнению с макрофагом без CAR как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, демонстрирует один или оба из повышенных уровней экспрессии желательных генов (например, CD80, CD86, MHC-I, MHC-II, CD40, 41BBL, TNF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL2, IL12, IL6, IL8, IL1b и/или CXCL12) или снижение экспрессии нежелательных генов (например, CD163, CD206, TGF $\beta$ , IL10 и/или IL4), например, по сравнению с макрофагом без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет повышенную продукцию АФК, например, по сравнению с макрофагом без CAR, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, демонстрирует метаболическое перепрограммирование (например, пути передачи сигнала интерферона, пути TH1, передачи сигнала PTEN, передачи сигнала PI3K, передачи сигнала MTOR, передачи сигнала TLR, передачи сигнала CD40, передачи сигнала 41BB, передачи сигнала 41BBL, передачи сигнала созревания макрофагов, передача сигнала созревания дендритных клеток, передачи сигнала CD3-дзета, передачи сигнала FcR $\gamma$ , передачи сигнала CD64, передачи сигнала CD32a, передачи сигнала CD32c, передачи сигнала CD16a, передачи сигнала TLR1, передачи сигнала TLR2, передачи сигнала TLR3, передачи сигнала TLR4, передачи сигнала TLR5, передачи сигнала TLR6, передачи сигнала TLR7, передачи сигнала TLR8, передачи сигнала TLR9, передачи сигнала ALK, передачи сигнала AXL, передачи сигнала DDR2, передачи сигнала EGFR, передачи сигнала EphA1, передачи сигнала INSR, передачи сигнала cMET, передачи сигнала MUSK, передачи сигнала PDGFR, передачи сигнала PTK7, передачи сигнала RET, передачи сигнала ROR1, передачи сигнала ROS1, передачи сигнала RYK, передачи сигнала TIE2, передачи сигнала TRK, передачи сигнала VEGFR, передачи сигнала CD40, передачи сигнала CD19, передачи сигнала CD20, передачи сигнала 41BB, передачи сигнала CD28, передачи сигнала OX40, передачи сигнала GITR, передачи сигнала TREM-1, передачи сигнала TREM-2, передачи

сигнала DAP12, передачи сигнала MR, передачи сигнала ICOS, передачи сигнала MyD88, передачи сигнала V/I/LxYxxL/V, передачи сигнала SIRP $\alpha$ , передачи сигнала CD45, передачи сигнала Siglec-10, передачи сигнала PD1, передачи сигнала SHP-1, передачи сигнала SHP-2, передачи сигнала KIR-2DL, передачи сигнала KIR-3DL, передачи сигнала NKG2A, передачи сигнала CD170, передачи сигнала CD33, передачи сигнала BTLA, передачи сигнала CD32b, передачи сигнала SIRP $\beta$ , передачи сигнала CD22, передачи сигнала PIR-B и/или передачи сигнала LILRB1), например, относительно макрофага без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет индукцию механизмов выживания клеток, например, по сравнению с макрофагом без CAR, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет индукцию механизмов гибели клеток, например, по сравнению с макрофагом без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет одно, два, три, четыре или пять из повышенной устойчивости к контрольным точкам фагоцитоза, повышенной экспрессии рецепторов хемокинов для облегчения переноса, повышенной экспрессии хемокинов для рекрутирования других иммунных клетки, повышенной экспрессии ферментов, разрушающих ECM (например, MMP, разрушающих ECM опухоли и/или проявляющих антифиброзную активность), или повышенной пролиферации, например, по сравнению с макрофагами без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет один, два, три или четыре из увеличенной продолжительности экспрессии CAR, улучшенной стабильности CAR на клеточной поверхности, повышенного уровня экспрессии CAR или пониженной фоновой активности CAR, например, относительно макрофага без CAR, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, снижает заражение (например, инфекционным агентом) субъекта, например, по сравнению с макрофагом без CAR, описанным в настоящем 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-Барр, 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 (ТОРС), вирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS) или коронавируса 2 с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS-CoV2)), вирус Эбола, вирус Западного Нила или их вариант или комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления макрофаг, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, снижает образование и/или разрушает существующие агрегаты посредством фагоцитоза по меньшей мере одного белкового агрегата у субъекта (например, у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием, воспалительным заболеванием, сердечно-сосудистым заболеванием, фиброзным заболеванием, амилоидозом или их комбинацией), например, относительно макрофага без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание выбрано из группы, состоящей из таупатии, а-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), синдрома Халлервордена-Шпатца, полиглутаминовой болезни, болезни 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, бронхоэктазы, буллезного эпидермолиза, циклической нейтропении, иммунодефицита, болезни Макла-Уэллса (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), бета-2-микроглобулинового амилоидоза, локализованного амилоидоза, амилоидоза тяжелых цепей (AG), амилоидоза легких цепей (AL), первичного системного амилоидоза, амилоидоза ApoAI, амилоидоза ApoAII,

амилоидоза A $\alpha$ IV, амилоидоза аполипопротеина C2, амилоидоза аполипопротеина C3, лактоферринового амилоидоза роговицы, транстретин-связанного амилоидоза, диализного амилоидоза, фибриногенового амилоидоза, амилоидоза Lect2 (ALECT2) и лизоцимного амилоидоза. В некоторых вариантах осуществления сердечно-сосудистое заболевание выбрано из группы, состоящей из атеросклероза, заболевания коронарной артерии, 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, фиброза брюшной полости, фиброза костного мозга и фиброза кожи.

### *Моноциты*

Моноциты представляют собой мультипотентные клетки, циркулирующие в крови, костном мозге и селезенке и обычно не пролиферирующие в стационарном состоянии. 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 рецепторы распознавания патогенов, которые опосредуют миграцию из крови в ткани, например, во время заражения. 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 несколько фенотипических маркеров. Примеры фенотипических маркеров для клеток моноцитов человека включают, помимо прочего, CD9, CD11b, CD11c, CDw12, CD13, CD14, 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, помимо прочего, CD11a, CD11b, CD16, CD18, CD29, CD31, CD32, CD44, CD45, CD49d, CD115,

CD116, Cdwl31, CD281, CD282, CD284, CD286, F4/80 и CD49b. В некоторых вариантах осуществления моноциты содержат один, два или три из CD11b, CD14 или CD16. В некоторых вариантах осуществления моноциты включают моноциты CD14+, CD16-, моноциты CD14+, CD16+ или моноциты CD14-CD16+.

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

В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет повышенную секрецию одного или нескольких цитокинов (например, одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или семи TNF, IL-12, IFN, ГМ-КСФ, Г-КСФ, М-КСФ или IL-1), например, относительно моноцита без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет повышенный фагоцитоз, например, по сравнению с моноцитом без CAR, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, демонстрирует повышенную выживаемость, например, по сравнению с моноцитом без CAR, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет усиленную дифференциацию в макрофаги (например, макрофаги M1 или M2), например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет повышенную дифференциацию в ДК (например, резидентные или мигрирующие ДК и/или в лимфоидной и нелимфоидной ткани), например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет повышенную цитотоксичность в отношении опухолевой клетки, например, по сравнению с моноцитом без CAR, описанным в настоящем документе. В некоторых

вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем 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 настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет повышенное уничтожение опухоли (например, за счет фагоцитоза, лизиса, апоптоза или продукции цитокинов, уничтожающих опухоль (например, TNF $\alpha$ ), например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, демонстрирует одну или обе из повышенной экспрессии желательных генов или пониженной экспрессии желательных генов, например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, демонстрирует повышенную продукцию АФК, например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, демонстрирует метаболическое перепрограммирование, например, по сравнению с моноцитом без CAR, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет индукцию механизмов выживания клеток, например, по сравнению с моноцитом без CAR, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет индукцию механизмов гибели клеток, например, по сравнению с моноцитом без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет одно, два, три, четыре или пять из повышенной устойчивости к контрольным точкам фагоцитоза, повышенной экспрессии рецепторов хемокинов для облегчения переноса, повышенной экспрессии хемокинов для рекрутирования других иммунных клетки, повышенной экспрессии ферментов, разрушающих ЕСМ (например, MMP, разрушающих ЕСМ опухоли и/или проявляющих антифиброзную активность), или повышенной пролиферации, например, по сравнению с моноцитами без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления моноцит, содержащий или

экспрессирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет один, два, три или четыре из увеличенной продолжительности экспрессии CAR, улучшенной стабильности CAR на клеточной поверхности, повышенного уровня экспрессии CAR или пониженной фоновой активности CAR, например, относительно моноцита без CAR, как описано в настоящем документе.

### *Дендритные клетки*

Дендритные клетки (ДК) 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 обычно считается, что они происходят из лимфоидных или миелоидных клеток.

В некоторых вариантах осуществления ДК содержит или экспрессирует один или несколько фенотипических маркеров. Например, фенотипические маркеры ДК включают, помимо прочего, CD11c, CD83, CD1a, CD1c, CD141, CD207, CLEC9a, CD123, CD85, CD180, CD187, CD205, CD281, CD282, CD284, CD286 и частично CD206, CD207, CD208 и CD209.

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

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

опухолевых Т-клеток, например, повышенную стимуляцию Т-клеток по сравнению с ДК без CAR, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления ДК, содержащая или экспрессирующая по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет повышенную секрецию одного или нескольких цитокинов (например, одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или семи TNF, IL-12, IFN, ГМ-КСФ, Г-КСФ, М-КСФ или IL-1), например, относительно ДК без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ДК, содержащая или экспрессирующая по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет повышенный фагоцитоз, например, по сравнению с ДК без CAR, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ДК, содержащая или экспрессирующая по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, демонстрирует 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 ДК без CAR, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления ДК, содержащая или экспрессирующая по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, демонстрирует одну или обе из повышенной экспрессии желательных генов или пониженной экспрессии желательных генов, например, по сравнению с ДК без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ДК, содержащая или экспрессирующая по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, демонстрирует повышенную продукцию АФК, например, по сравнению с ДК без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ДК, содержащая или экспрессирующая по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, демонстрирует метаболическое перепрограммирование, например, по сравнению с ДК без CAR, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ДК, содержащая или экспрессирующая по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет индукцию механизмов выживания клеток, например, по сравнению с ДК без CAR, описанным в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления ДК, содержащая или экспрессирующая по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет индукцию механизмов гибели клеток, например, по сравнению с ДК без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ДК, содержащая или экспрессирующая по меньшей

мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет одно, два, три, четыре или пять из повышенной устойчивости к контрольным точкам фагоцитоза, повышенной экспрессии рецепторов хемокинов для облегчения переноса, повышенной экспрессии хемокинов для рекрутирования других иммунных клетки, повышенной экспрессии ферментов, разрушающих ЕСМ (например, ММР, разрушающих ЕСМ опухоли и/или проявляющих антифиброзную активность), или повышенной пролиферации, например, по сравнению с ДК без CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ДК, содержащая или экспрессирующая по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, проявляет один, два, три или четыре из увеличенной продолжительности экспрессии CAR, улучшенной стабильности CAR на клеточной поверхности, повышенного уровня экспрессии CAR или пониженной фоновой активности CAR, например, относительно ДК без CAR, как описано в настоящем документе.

### *Способы модификации иммунных клеток*

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы модификации иммунной клетки, включающие стадии: (а) модификации нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), (b) очистки нуклеиновой кислоты и (с) доставку нуклеиновой кислоты в иммунную клетку, при этом иммунная клетка содержит макрофаг, моноцит или дендритную клетку, и при этом модифицированная иммунная клетка содержит CAR. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы модификации иммунной клетки, включающие следующие стадии: (а) модификацию матричной РНК (мРНК), кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), (b) очистку мРНК и (с) доставку мРНК в иммунную клетку, при этом иммунная клетка включает макрофаг, моноцит или дендритную клетку, и при этом модифицированная иммунная клетка содержит CAR.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы, включающие доставку модифицированной мРНК в иммунную клетку, при этом мРНК содержит CAR. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы дополнительно включают обработку иммунной клетки ингибитором РНКазы L, необязательно перед стадией доставки. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы дополнительно включают стадию культивирования иммунной клетки с цитокином или иммуностимулирующим рекомбинантным белком (например, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, STNGL, LPS, агонист CD40, лиганд 4-1BB, рекомбинантный рецептор 4-1BB, агонист TLR, бета-глюкан, IL-4, IL-13, IL-10, TGF- $\beta$ , глюкокортикоид,

иммунный комплекс или их комбинация). В некоторых вариантах осуществления цитокин включает IFN- $\beta$ .

### *Модификации нуклеиновых кислот*

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой или содержит мРНК. В некоторых вариантах осуществления мРНК по настоящему изобретению может быть синтезирована в виде немодифицированной или модифицированной мРНК. Обычно мРНК модифицируют для повышения стабильности. Модификации мРНК могут включать, например, модификации нуклеотидов РНК. Таким образом, модифицированная мРНК в соответствии с настоящим изобретением может включать, например, модификации остова, модификации сахаров или модификации оснований. В некоторых вариантах осуществления стадия модификации мРНК включает осуществление включения в мРНК модифицированного нуклеотида, изменения 5'- или 3'-нетранслируемой области (UTR), кэп-структуры и/или поли(А)-хвоста. В некоторых вариантах осуществления мРНК могут быть синтезированы из встречающихся в природе нуклеотидов и/или аналогов нуклеотидов (модифицированных нуклеотидов), включая, помимо прочего, пурины (аденин (А), гуанин (G)) или пиримидины (тимин (Т), цитозин (С), урацил (U)), и модифицированных аналогов нуклеотидов или производных пуринов и пиримидинов, таких как, например, 1-метиладенин, 2-метиладенин, 2-метилтио-N-6-изопентениладенин, N6-метиладенин, N6-изопентениладенин, 2-тиоцитозин, 3-метилцитозин, 4-ацетилцитозин, 5-метилцитозин, 2,6-диаминопурин, 1-метилгуанин, 2-метилгуанин, 2,2-диметилгуанин, 7-метилгуанин, инозин, 1-метил-инозин, псевдоурацил (5-урацил), дигидроурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоурацил, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-фторурацил, 5-бромурасил, 5-карбоксиметиламинометилурацил, 5-метил-2-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый сложный эфир N-урацил-5-оксиуксусной кислоты, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, 5'-метоксикарбонилметилурацил, 5-метоксиурацил, метиловый сложный эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусная кислота (v), 1-метил-псевдоурацил, кеозин,  $\beta$ -D-маннозил-кеозин, вибутоксозин и фосфорамидаты, фосфоротиоаты, пептидные нуклеотиды, метилфосфонаты, 7-дезагуанозин, 5-метилцитозин и инозин. Получение таких аналогов известно специалисту в данной области техники, например, из патента США № 4373071, патента США № 4401796, патента США № 4415732, патента США № 4458066, патента США № 4500707, патента США № 4668777, патента США № 4973679, патента США № 5047524, патента

США № 5132418, патента США № 5153319, патента США № 5262530 и патента США № 5700642, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления мРНК по настоящему изобретению (например, мРНК, кодирующие CAR) могут содержать модификации остова РНК. Как правило, модификация остова представляет собой модификацию, при которой фосфаты остова нуклеотидов, содержащихся в РНК, модифицируются химически. Примеры модификаций остова обычно включают, помимо прочего, модификации из группы, состоящей из метилфосфонатов, метилфосфорамидатов, фосфорамидатов, фосфоротиоатов (например, цитидин-5'-O-(1-тиофосфат)), боранофосфатов, положительно заряженных гуанидиновых групп и т.д., которые включает замену фосфодиэфирной связи другими анионными, катионными или нейтральными группами.

В некоторых вариантах осуществления мРНК по настоящему изобретению (например, мРНК, кодирующие CAR) могут содержать модификации сахара. Типичная модификация сахара представляет собой химическую модификацию сахара в нуклеотидах, включая, помимо прочего, модификации сахара, выбранные из группы, состоящей из 2'-дезоксидефторолигорибонуклеотида (2'-фтор-2'-дезоксидефторцитидин 5'-трифосфата, 2'-фтор-2'-дезоксидефторуридин 5'-трифосфата), 2'-дезоксидефтор-олигорибонуклеотида (2'-амино-2'-дезоксидефторцитидин 5'-трифосфата, 2'-амино-2'-дезоксидефторуридин 5'-трифосфата), 2'-О-алкилолигорибонуклеотида, 2'-дезоксидефтор-С-алкилолигорибонуклеотида (2'-О-метилцитидин 5'-трифосфата, 2'-метилуридин 5'-трифосфата), 2'-С-алкилолигорибонуклеотида и их изомеров (2'-арацитидин-5'-трифосфата, 2'-арауридин-5'-трифосфата) или азидотрифосфатов (2'-азидо-2'-дезоксидефторцитидин 5'-трифосфата, 2'-азидо-2'-дезоксидефторуридин 5'-трифосфата).

В некоторых вариантах осуществления мРНК по настоящему изобретению (например, мРНК, кодирующие CAR) могут содержать модификации оснований нуклеотидов (модификации оснований). Модифицированный нуклеотид, который содержит модификацию основания, также называют нуклеотидом с модифицированным основанием. Примеры таких нуклеотидов с модифицированным основанием включают, помимо прочего, 2-амино-6-хлорпуририбозид-5'-трифосфат, 2-аминоаденозин 5'-трифосфат, 2-тиоцитидин 5'-трифосфат, 2-тиуридин 5'-трифосфат, 4-тиуридин 5'-трифосфат, 5-аминоаллилцитидин 5'-трифосфат, 5-аминоаллилуридин 5'-трифосфат, 5-бромцитидин 5'-трифосфат, 5-бромуридин 5'-трифосфат, 5-йодоцитидин 5'-трифосфат, 5-йодоуридин 5'-трифосфат, 5-метилцитидин 5'-трифосфат, 5-метилуридин 5'-трифосфат, 6-азацитидин 5'-

трифосфат, 6-азауридин 5'-трифосфат, 6-хлорпуририбозид 5'-трифосфат, 7-дезааденозин 5'-трифосфат, 7-дезагуанозин 5'-трифосфат, 8-азааденозин 5'-трифосфат, 8-азидоаденозин 5'-трифосфат, бензимидазолрибозид 5'-трифосфат, N1-метиладенозин 5'-трифосфат, N1-метилгуанозин 5'-трифосфат, N6-метиладенозин 5'-трифосфат, O6-метилгуанозин 5'-трифосфат, псевдоуридин 5'-трифосфат, пурамицин 5'-трифосфат или ксантозин 5'-трифосфат. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид включает псевдоуридин (PsU), 5-метоксиуридин (5moU), 5-метилцитидин/псевдоуридин (5meC PsU), N1-метилпсевдоуридин (N1mPsU) или их комбинации.

Как правило, синтез мРНК включает добавление «кэпа» на N-конце (5') и «хвоста» на C-конце (3'). Наличие кэпа важно для обеспечения устойчивости к нуклеазам, обнаруженным в большинстве эукариотических клеток. Наличие «хвоста» служит для защиты мРНК от расщепления экзонуклеазой.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мРНК по настоящему изобретению (например, мРНК, кодирующие CAR) включают структуру 5'-кэпа. 5'-кэп обычно добавляют следующим образом: сначала концевая фосфатаза РНК удаляет одну из концевых фосфатных групп с 5'-нуклеотида, оставляя два концевых фосфата; гуанозинтрифосфат (ГТФ) затем добавляется к концевым фосфатам с помощью гуанилилтрансферазы, образуя 5'-трифосфатную связь; затем 7-азот гуанина метилируется метилтрансферазой. Примеры структур кэпа включают, помимо прочего, m7G(5')ppp (5'(A,G(5')ppp(5')A и G(5')ppp(5')G. В некоторых вариантах осуществления кэп содержит структуру Cap0. В структурах cap0 отсутствует 2'-О-метильный остаток рибозы, присоединенный к основаниям 1 и 2. В некоторых вариантах осуществления кэп содержит структуру AGCap1. Структуры AGCap1 имеют 2'-О-метильный остаток в основании 2. В некоторых вариантах осуществления кэп содержит структуру Cap2. Структуры Cap2 имеют 2'-О-метильный остаток, присоединенный к обоим основаниям 2 и 3. В некоторых вариантах осуществления структура кэпа содержит AGCap1, m6AGCap1 или аналог кэпа с правильной ориентацией (ARCA). В некоторых вариантах осуществления модифицированная мРНК по настоящему изобретению содержит m6AGCap1 и модифицированные нуклеотиды, содержащие псевдоуридин (PsU).

В некоторых вариантах осуществления мРНК по настоящему изобретению (например, мРНК, кодирующие CAR) включают структуру 3'-поли(А)-хвоста. Поли(А)-хвост на 3'-конце мРНК обычно включает около 10-400 аденозиновых нуклеотидов (например, около 100-400 аденозиновых нуклеотидов, около 10-200 аденозиновых нуклеотидов, около 10-150 аденозиновых нуклеотидов, около 10-100 аденозиновых нуклеотидов, около 20-70

аденозиновых нуклеотидов или около 20-60 аденозиновых нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления мРНК включают структуру 3'-поли(С)-хвоста. Подходящий поли(С)-хвост на 3'-конце мРНК обычно включает около 10-200 цитозиновых нуклеотидов (например, около 10-150 цитозиновых нуклеотидов, около 10-100 цитозиновых нуклеотидов, около 20-70 цитозиновых нуклеотидов, около 20-60 цитозиновых нуклеотидов или около 10-40 цитозиновых нуклеотидов). Поли(С)-хвост может быть добавлен к поли(А)-хвосту или может быть заменой поли(А)-хвоста.

В некоторых вариантах осуществления мРНК по настоящему изобретению (например, мРНК, кодирующие CAR) включают 5'- и/или 3'-нетранслируемую область. В некоторых вариантах осуществления 5'-нетранслируемая область включает один или несколько элементов, влияющих на стабильность или трансляцию мРНК, например, чувствительный к железу элемент. В некоторых вариантах осуществления 5'-нетранслируемая область может иметь длину около 50-500 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления 3'-нетранслируемая область включает один или несколько из сигналов полиаденилирования, сайт связывания белков, влияющих на стабильность положения мРНК в клетке, или один или несколько сайтов связывания микроРНК. В некоторых вариантах осуществления 3'-нетранслируемая область может иметь длину от 50 до 500 нуклеотидов или более.

### *Доставка нуклеиновой кислоты*

Настоящее изобретение, среди прочего, обеспечивает способы модификации иммунной клетки (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки), включающие доставку конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих химерный антигенный рецептор (CAR) или его фрагмент, в иммунную клетку. Способы могут включать доставку в иммунную клетку (например, моноцит, макрофаг или дендритную клетку) конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих: (a) внеклеточный домен (например, внеклеточный домен, как описано в настоящем документе), (b) трансмембранный домен (например, трансмембранный домен, как описано в настоящем документе) и (c) внутриклеточный домен (например, внутриклеточный домен, как описано в настоящем документе), так что иммунная клетка содержит CAR, содержащий (a)-(c). В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, дополнительно кодирует одну, две или три из: (d) внеклеточного лидерного

домена (например, внеклеточного лидерного домена, как описано в настоящем документе), (е) внеклеточного шарнирного домен (например, внеклеточного шарнирного домена, как описано в настоящем документе), или (f) внутриклеточного костимулирующего домена (например, внутриклеточного костимулирующего домена, как описано в настоящем документе).

Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих по меньшей мере один CAR, как описано в настоящем документе, может быть введена в иммунную клетку (например, моноцит, макрофаг или дендритную клетку) физическими, химическими или биологическими способами. В некоторых вариантах осуществления один или несколько физических, химических или биологических способов доставки нуклеиновых кислот, как описано в настоящем документе, можно использовать для введения одной или нескольких последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих по меньшей мере один CAR, как описано в настоящем документе, и для введения одной или нескольких последовательностей нуклеиновых кислот, которые не кодируют CAR. Физические способы введения конструкции нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе, в иммунную клетку (например, моноцит, макрофаг или дендритную клетку) могут включать электропорацию, преципитацию фосфатом кальция, липофекцию, опосредованную виromeром трансфекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, механотрансдукцию (например, технология выдавливания) или их комбинацию. Конструкция нуклеиновой кислоты может быть введена в иммунные клетки с использованием коммерчески доступных способов, включая электропорацию. (Amaha Nucleofector-II® (Amaha Biosystems, Кёльн, Германия), ECM 830 BTX (Harvard Instruments, Бостон, Массачусетс), Gene Pulser II® (BioRad, Денвер, Колорадо), Multiporator® (Eppendorf, Гамбург, Германия)), Maxcyte STX (Maxcyte), Maxcyte VLX (Maxcyte), Maxcyte GT (Maxcyte), электропоратор CliniMacs (Miltenyi Biotec) или систему трансфекции Neon (Thermo Fisher). 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), содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

Биологические способы введения конструкции нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем 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 настоящий 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. В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор упакован с белком Vpx (например, как описано в международной публикации № WO 2017/044487, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления Vpx содержит 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 настоящем 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 настоящем 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 настоящем документе (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки), например, по сравнению с лентивирусным вектором, не упакованным с белком Vpx. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка, как описано в настоящем документе (например, моноцит, макрофаг или дендритная клетка), является одним или обоими из следующих способов: электропорация или трансфекция по меньшей мере одной мРНК Vpx до трансфекции вирусным вектором (например, аденовирусным вектором, например, вектором Ad2 или вектором Ad5 (например, аденовирусным вектором Ad5f35, например, хелпер-зависимым аденовирусным вектором Ad5F35)). Химические средства введения конструкции нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, в иммунную клетку (например, моноцит, макрофаг или дендритную клетку) включают системы коллоидной дисперсии, комплексы макромолекул, нанокапсулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов (например, масляные

эмульсии в воде, мицеллы, смешанные мицеллы, наночастицы, липосомы и комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота).

В некоторых вариантах осуществления система доставки конструкции нуклеиновой кислоты, описанная в настоящем документе, представляет собой систему на основе липидов. Конструкция нуклеиновой кислоты, описанная в настоящем 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, содержащем липид, смешана с липидом, в комплексе 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, Миссури); дицетилфосфат может быть получен от K&K Laboratories (Plainview, NY); холестерин может быть получен от Calbiochem-Behring и димиристилфосфатидилглицерин может быть получен от Avanti Polar Lipids, Inc. (Бирмингем, Алабама). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить при температуре около -20°C.

#### *Очистка нуклеиновых кислот*

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают стадию очистки нуклеиновых кислот (например, мРНК, кодирующих CAR). В некоторых вариантах осуществления стадия очистки нуклеиновых кислот (например, мРНК, кодирующих CAR) включает использование любого стандартного метода очистки, известного в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления стадия очистки нуклеиновых кислот (например, мРНК, кодирующих CAR) включает очистку на кремнезёмной мембране, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), гранулы Dynabead, осаждение LiCl, фенол-хлороформную экстракцию, очистку на основе смолы, выделение полиА, RNeasy или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления стадия очистки нуклеиновых кислот (например, мРНК, кодирующих CAR) включает очистку на кремнезёмной мембране. В некоторых вариантах осуществления стадия очистки нуклеиновых кислот (например, мРНК, кодирующих CAR) включает высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

#### *Обработка и культивирование иммунных клеток во время модификации*

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают одну или несколько 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-подобный рецептор 3 (TLR3), TLR7 и TLR8) и цитоплазматическими рецепторами врожденного иммунитета (протеинкиназа, активируемая РНК (PKR), белок гена I, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-I), белок 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы (MDA5), и 2'-5'-олигоаденилатсинтаза (ОАС)). Передача сигналов через эти различные пути приводит к воспалению, связанному с интерфероном типа 1 (IFN), фактором некроза опухоли (TNF), интерлейкином-6 (IL-6), IL-12 и активацией каскадов транскрипционных программ. В целом, они создают провоспалительное микроокружение, способное вызывать специфические иммунные ответы. Более того, последующие эффекты, такие как замедление трансляции за счет фосфорилирования эукариотического фактора инициации трансляции 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), усиленное расщепление РНК рибонуклеазой L (РНКазой 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, содержит ингибитор РНКазы. В некоторых вариантах осуществления модулятор пути, активируемого транскрибируемой *in vitro* мРНК, содержит ингибитор РНКазы L, РНКазы T2 или РНКазы 1. В некоторых вариантах осуществления модулятор пути, активируемого транскрибируемой *in vitro* мРНК, содержит 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 повышает 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- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , 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- $\beta$  (например, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 или TGF- $\beta$ 3), глюкокортикоид, иммунный комплекс, интерлейкин-1 альфа (IL-1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , 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 (ГМ-КСФ), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), фактор ингибирования лейкемии (LIF), онкостатин М (OSM), TNF- $\beta$ , CD154, лимфотоксин бета (LT- $\beta$ ), лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), CD70, CD153, лиганд рецептора TNF, индуцированный глюкокортикоидами (GITRL), член суперсемейства фактора некроза опухоли 14 (TNFSF14), OX40L (CD252), TALL-1 (член суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли 13B - TNFSF13B), связанный с TNF лиганд, индуцирующий апоптоз (TRAIL), слабый индуктор апоптоза, связанный с TNF (TWEAK), связанный с TNF цитокин, индуцированный активацией, (TRANCE), эритропоэтин (Еро), предшественник тиреоидной пероксидазы (Тро), лиганд тирозинкиназы 3, связанный с FMS (FLT-3L), фактор стволовых клеток (SCF), макрофагальный колониестимулирующий фактор (М-КСФ), поверхностный белок мерозоитов (MSP), лиганд белка, содержащего домен олигомеризации (NOD), связывающий нуклеотиды (например, агонисты NOD1, NOD2 или NOD1/2), лиганд RIG-I подобного рецептора (RLR) (например, 5'ppp-дцРНК, 3p-шРНК, Поли(I:C) или Поли(dA:dT)), лиганд лектинового рецептора (CLR) С-типа (например, курдлан,  $\beta$ -глюкан, НКСА, ламинарин, пустулан, склероглюкан, диспергируемый WGP, растворимый WGP,

зимозан, обедненный зимозаном, фурфурман, b-GlcCer, GlcC14C18, HKMT, TDB, TDB-HS15 или TDM), циклический динуклеотидный сенсорный лиганд (например, агонист C-Gas или стимулятор гена интерферона (STING) лиганд), индуктор воспаления (например, квасцы, АТФ, кристаллы CPPD, гемозоин, кристаллы MSU, Nano-SiO<sub>2</sub>, нигерицин или TDB), арилуглеводородный (AhR) лиганд (например, FICZ, индирубин, ITE или L-кинуруенин), лиганд альфа-протеинкиназы 1 (ALPK1), лиганд мульти-PRR, активатор NFκB/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, которая не была культивирована 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 экспрессию белка (например, CAR) модифицированной иммунной клеткой по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, которая не была культивирована 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 продолжительность экспрессии белка (например, CAR) модифицированной иммунной клеткой по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, которая не была культивирована 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, которая не была культивирована 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 поляризацию M1 модифицированной иммунной клетки по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, которая не была культивирована с цитокином или иммуностимулирующим рекомбинантным белком.

### *Модифицированные иммунные клетки*

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку получают способами по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка проявляет повышенную жизнеспособность по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышение жизнеспособности по меньшей мере на 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % или 50 % относительно модифицированной иммунной клетки того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышенную экспрессию мРНК, кодирующей CAR, по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышение экспрессии мРНК, кодирующей CAR, по меньшей мере на 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 %, 1000 %, 1500 % или 2000 % относительно модифицированной иммунной клетки того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышение экспрессии мРНК, кодирующей CAR, по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 раз по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышенную экспрессию CAR по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышенную экспрессию CAR по меньшей мере на 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 %, 1000 %, 1500 % или 2000 % относительно

модифицированной иммунной клетки того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышенную экспрессию CAR по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 раз по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышенную продолжительность жизни мРНК, кодирующей CAR, по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка демонстрирует увеличение продолжительности жизни мРНК, кодирующей CAR, по меньшей мере на 12 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 3 недели или 1 месяц относительно модифицированной иммунной клетки того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышенную продолжительность жизни CAR по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка демонстрирует увеличение продолжительности жизни CAR по меньшей мере на 12 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 3 недели или 1 месяц относительно модифицированной иммунной клетки того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка проявляет повышенную эффекторную активность по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка проявляет эффекторную активность, повышенную на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% относительно модифицированной иммунной клетки того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления повышенная эффекторная активность включает повышенную продукцию цитокинов, продукцию

хемокинов, фагоцитоз, передачу клеточных сигналов, уничтожение клеток-мишеней и/или презентацию антигена.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка проявляет повышенную поляризацию M1 по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления повышенная поляризация M1 включает повышенные уровни маркера M1, содержащего 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 модифицированная иммунная клетка проявляет увеличение поляризации M1 на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% относительно модифицированной иммунной клетки того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка проявляет пониженную поляризацию M2 по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления снижение поляризации M2 включает снижение уровней маркера M2, включающего CD206, CD163 или CD209. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка проявляет снижение поляризации M2 на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% или 1000% относительно модифицированной иммунной клетки того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR.

### *Анализы*

Для подтверждения присутствия конструкции нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем 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 обнаружение присутствия или отсутствия конкретного пептида, например, с помощью иммунологических средств (ИФА и вестерн-блоттинг). Другие анализы по настоящему изобретению включают, например, сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS), иммунофлуоресцентную микроскопию, анализ цитокинов MSD, масс-спектрометрию (МС), секвенирование РНК и функциональные анализы.

Можно проводить различные анализы для определения различных характеристик модифицированной иммунной клетки (например, моноцита, макрофага или дендритной клетки), таких как, помимо прочего, жизнеспособность иммунной клетки, экспрессия нуклеиновой кислоты (например, мРНК), продолжительность жизни нуклеиновой кислоты (например, мРНК), экспрессия белка (например, CAR), продолжительность жизни белка (например, CAR), эффекторная активность и поляризация M1.

Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, включая номера доступа GenBank, полностью 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 обычно подразумевается рядовым специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, можно использовать на практике или при тестировании данного изобретения, подходящие способы и материалы описаны 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 берут 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 антигену, ассоциированному с опухолью. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка, например, модифицированный макрофаг, моноцит или дендритная клетка, создается 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 несколько из: одного или нескольких внеклеточных лидерных доменов, одного или нескольких внеклеточных шарнирных доменов и одного или нескольких внутриклеточных костимулирующих доменов.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит спейсерный домен или шарнирный домен между внеклеточным доменом и трансмембранным доменом (например, шарнирный домен CD8 или CD28). В некоторых вариантах осуществления CAR содержит спейсерный домен или шарнир между внутриклеточным доменом и трансмембранным доменом. Используемый в данном документе 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 несколько систем управления, включая, помимо прочего: защитный переключатель (например, переключатель включения и выключения, суицидальный переключатель), логический вентиль, например, логический вентиль AND (например, два или более CAR, в каждом из которых отсутствует один или несколько сигнальных доменов, так что активация обоих/всех CAR необходима для полной активации или функционирования иммунных клеток (например, макрофагов, моноцитов или дендритных клеток)), логический вентиль OR (например, два или более CAR, каждый с внутриклеточным доменом, таким как CD3 $\zeta$ , и костимулирующим доменом) и/или логический вентиль NOT (например, два или более CAR, один из которых включает ингибирующий домен, который противодействует функции другого(их) CAR).

В настоящем изобретении также предложены иммунные клетки, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты (например, выделенную последовательность нуклеиновой кислоты), кодирующую CAR, при этом последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую внеклеточный домен, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую трансмембранный домен, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая внутриклеточный домен, при

этом клетка представляет собой моноцит, макрофаг или дендритную клетку, экспрессирующую 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, и 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, нацеленную клеточную цитотоксичность, презентацию антигена или секрецию цитокинов.

В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в настоящем документе, содержит по меньшей мере один домен (например, внеклеточный домен, трансмембранный домен и/или внутриклеточный домен), который ингибирует антифагоцитарную передачу сигналов в иммунной клетке, описанной в настоящем документе (например, макрофаге, моноците или дендритной клетке). В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в настоящем документе, улучшает эффекторную активность иммунной клетки, описанной в настоящем документе (например, макрофага, моноцита или дендритной клетки), например, путем усиления ингибирования активности CD47 и/или SIRP $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в настоящем документе, связывает CD47, например, и служит в качестве доминантно-отрицательного рецептора, ингибируя активность SIRP $\alpha$  (например, приемник CD47). В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в настоящем документе, который связывает SIRP $\alpha$ , например, содержит активирующий рецептор (например, содержит внутриклеточный домен CD3z). В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в настоящем документе, ингибирует по меньшей мере одно взаимодействие CD47 и SIRP $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой фагоцитарный логический вентиль или содержит его.

В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка, описанная в настоящем документе (например, содержащая или экспрессирующая CAR, описанный в настоящем документе), содержит или экспрессирует по меньшей мере один вариант или фрагмент из:

SIRP $\alpha$  (например, доминантно-отрицательный SIRP $\alpha$  или сконструированный высокоаффинный вариант SIRP $\alpha$  (например, CV1)), scFv 5F9, scFv B6H12 (например, гуманизированный scFv B6H12), PD1 (например, доминантно-отрицательный PD1 или HAC-I), анти-PD1 scFv (например, E27 или дурвалумаб), Siglec-10, Siglec-9, 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 экспрессирует анти-CD47 scFv, шарнирный домен CD8 и трансмембранный домен CD8). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка, описанная в настоящем документе (например, содержащая или экспрессирующая CAR, описанный в настоящем документе), содержит доминантно-отрицательный рецептор, например, блокирующий ингибирующую контрольную точку.

В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в настоящем 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 антифагоцитарной передачи сигнала. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один второй CAR содержит SIRP $\alpha$  (например, сконструированный высокоаффинный вариант SIRP $\alpha$  (например, CV1)), scFv 5F9, scFv B6H12 (например, гуманизированный scFv B6H12) или CD47-связывающий внеклеточный домен, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один второй CAR содержит трансмембранный домен SIRP $\alpha$  или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления второй CAR дополнительно содержит шарнирный домен (например, шарнирный домен CD8). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один второй CAR содержит: (i) лидерную последовательность (например, лидерную последовательность CD8); ii) внеклеточный домен (например, внеклеточный домен SIRP $\alpha$ , CV1, scFv 5F9 или scFv B6H12 (например, гуманизированный scFv B6H12)) и ii) трансмембранный домен (например, трансмембранный домен SIRP $\alpha$ ). В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в настоящем 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 настоящем документе (например, содержащая или экспрессирующая CAR, описанный в настоящем

документе), содержит или экспрессирует один или несколько неактивных доменов фосфатазы (например, неактивную фосфатазу Shp1, неактивную фосфатазу 72-5p-тазу (INPP5E), неактивную фосфатазу Shp2 и/или неактивный домен фосфатазы SHIP-1) и/или конститутивно активный домен киназы (например, конститутивно активный домен LYN). В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в настоящем документе, дополнительно содержит расщепляемый пептид (например, пептид P2A, F2A, E2A и/или T2A) и один или несколько неактивных доменов фосфатазы (например, неактивную фосфатазу Shp1, неактивную фосфатазу 72-5p-тазу (INPP5E), неактивную фосфатазу Shp2 и/или неактивный домен фосфатазы SHIP-1) и/или конститутивно активный домен киназы (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 толл-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 определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен может быть доменом, который не является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в настоящем документе).

### *Внеклеточные домены FcR*

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен FcR содержит 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 содержит внеклеточный домен FcR человека. В некоторых вариантах

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

#### *Лидерные домены*

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит один или несколько 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 внеклеточный лидерный домен человека или содержит его. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный лидерный домен может быть доменом, который является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный лидерный домен может быть доменом, который не является эндогенным для определенного типа

иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный лидерный домен содержит внеклеточный лидерный домен CD8. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный лидерный домен содержит лидерный домен из стимулирующего или костимулирующего домена (например, 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, домен 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 выступает в качестве маркера 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 интересующей опухоли или рака. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген содержит один или более антигенных эпитопов рака. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген содержит: CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (также упоминается как подгруппе 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); член семейства рецепторов TNF антиген созревание В-клеток (BCMA); антиген Tn ((Tn Ag) или (GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr)); простатспецифический мембранный антиген (PSMA); орфанный рецептор 1 типа рецепторной тирозинкиназы (ROR1); Fms-подобная тирозинкиназа 3 (FLT3); ассоциированный с опухолью гликопротеин 72 (TAG72); CD38; CD44v6; раково-эмбриональный антиген (CEA); молекула адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); субъединица альфа-2 рецептора интерлейкина-13 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелин; субъединица альфа рецептора интерлейкина-11 (IL-11Ra); антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA); сериновая протеаза 21 (тестизин или

PRSS21); рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2); антиген Льюиса (Y); CD24; бета-рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR-бета); стадияспецифический эмбриональный антиген-4 (SSEA-4); CD20; фолатный рецептор альфа; рецептор тирозин-протеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцин 1, связанный с клеточной поверхностью (MUC1); рецептор эпидермального фактора роста (EGFR); молекула адгезии нервных клеток (NCAM); простаза; кислая фосфатаза предстательной железы (PAP); мутированный фактор элонгации 2 (ELF2M); эфрин B2; белок активации фибробластов альфа (FAP); рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептор IGF-I), карбоангидраза IX (CAIX); субъединица протеасомы (просома, макропаин), бета-тип, 9 (LMP2); гликопротеин 100 (gp100); слитый белок онкогена, состоящий из кластерной области точки разрыва (BCR) и гомолог 1 вирусного онкогена мышшиного лейкоза Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназа; рецептор 2 эфрина типа A (EphA2); фукозил GM1; сиалиловая молекула адгезии Льюиса (sLe); ганглиозид GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer); трансглутаминаза 5 (TGS5); высокомолекулярный антиген, ассоциированный с меланомой (HMWMAA); о-ацетил-GD2 ганглиозид (OAcGD2); бета-рецептор фолиевой кислоты; эндотелиальный маркер опухоли 1 (TEM1/CD248); 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); хромосома X открытой рамки считывания 61 (CXORF61); CD97; CD179a; киназа анапластической лимфомы (ALK); полисиаловая кислота; плацентарный 1 (PLAC1); гексасахаридная часть гликоцерамида globoH (GloboH); антиген дифференцировки молочной железы (NY-BR-1); уроплакин 2 (UPK2); клеточный рецептор вируса гепатита A 1 (HAVCR1); адренорецептор бета 3 (ADRB3); паннексин 3 (PANX3); рецептор, связанный с G-белком 20 (GPR20); комплекс антигена 6 лимфоцитов, локус K 9 (LY6K); обонятельный рецептор 51E2 (OR51E2); белок ТКР гамма с альтернативной рамкой считывания (TARP); белок опухоли Вильмса (WT1); антиген 1 рака/яичек (NY-ESO-1); антиген 2 рака/яичек (LAGE-1a); ассоциированный с меланомой антиген 1 (MAGE-A1); ген 6 транслокационного варианта ETS, расположенный на хромосоме 12p (ETV6-AML); белок спермы 17 (SPA17); член 1A семейства антигенов X (XAGE1); рецептор 2 клеточной поверхности, связывающий ангиопоэтин (Tie 2); антиген-1 меланомы рака яичка (MAD-CT-1); антиген-2 меланомы рака яичка (MAD-CT-2); Fos-родственный антиген 1; опухолевый белок p53 (p53); мутант p53; простаин; сурвивин; теломераза; опухолевый антиген-1 карциномы предстательной железы (PSTA-1 или галектин 8), антиген 1 меланомы, распознаваемый Т-клетками (МеланА или MART1); мутант саркомы крысы (Ras); обратная транскриптаза теломеразы человека (hTERT); точки разрыва транслокации саркомы; меланомный ингибитор апоптоза (ML-IAP); ERG (слитый

ген ETS трансмембранной сериновой протеазы 2 (TMPRSS2)); N-ацетилглюкозаминилтрансфераза V (NA17); парный бокс-белок Pax-3 (PAX3); рецептор андрогена; циклин B1; гомолог белка, полученного из нейробластомы, вызванной вирусным онкогеном птичьего миелоцитоматоза v-мус (MYCN); семейство гомолога Ras, член C (RhoC); белок 2, родственник тирозиназе (TRP-2); цитохром P450 1B1 (CYP1B1); CCCTC-связывающий фактор (белок цинкового пальца)-подобный белок (BORIS или брат регулятора сайтов импринтинга), антиген плоскоклеточной карциномы, распознаваемый Т-клетками 3 (SART3); парный белок-бокс Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающий белок sp32 (OY-TES1); специфическая для лимфоцитов протеинтирозинкиназа (LCK); киназный якорный белок 4 (AKAP-4); синовиальная саркома, точка разрыва X 2 (SSX2); рецептор для конечных продуктов продвинутого гликирования (RAGE-1); почечный убиквитин 1 (RU1); почечный убиквитин 2 (RU2); легумин; вирус папилломы человека Е6 (ВПЧ Е6); вирус папилломы человека Е7 (ВПЧ Е7); кишечная карбоксилэстераза; мутированный 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 А лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LILRA2); член f семейства подобного молекуле CD300 (CD300LF); член А семейства 12 лектиновых доменов С-типа (CLEC12A); антиген 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); EGF-подобный модуль, содержащий муциноподобный гормональный рецептор, подобный 2 (EMR2); лимфоцитарный антиген 75 (LY75); глипикан-3 (GPC3); Fc-рецептор-подобный 5 (FCRL5) или иммуноглобулин-лямбда-подобный полипептид 1 (IGLL1). В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген включает ERBB2 (Her2/neu). В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген включает PSMA. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген включает мезотелин.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с неправильно свернутым белком-антигеном или белком белкового агрегата, таким как белок, специфичный в отношении представляющего интерес заболевания/расстройства. В некоторых вариантах осуществления заболевание/расстройство представляет собой нейродегенеративное заболевание/расстройство, воспалительное заболевание/расстройство, сердечно-сосудистое заболевание/расстройство, фиброзное заболевание/расстройство или амилоидоз (например, опосредованный белковыми агрегатами легких цепей иммуноглобулина или транстиретины). В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание/расстройство выбрано из группы, состоящей из таупатии, асинуклеопатии, пресенильной деменции, старческого слабоумия, болезни Альцгеймера (опосредуется белковыми агрегатами бета-амилоида),

Паркинсонизма, связанного с хромосомой 17 (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), синдрома Халлервордена-Спатца, полиглутаминовой болезни, болезни тринуклеотидных повторов, семейной деменции британского типа, фатальной семейной бессонницы, синдрома Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, наследственного кровоизлияния в мозг с амилоидозом (исландский тип) (HCHW A-I), спорадической фатальной бессонницы (sFI), варибельной протеазо-чувствительной прионопатии (VPSP<sub>r</sub>), семейной деменция датского типа и прионной болезни (например, болезни Крейтцфельдта-Якоба, CJD и варианта болезни Крейтцфельдта-Якоба (vCJD)).

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

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит один или несколько 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, которых по отдельности недостаточно для активации модифицированной клетки, но вместе они синергичны, стимулируя активацию модифицированной клетки. В некоторых вариантах осуществления такая конструкция может называться логическим вентилем «AND».

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, чтобы один антиген присутствовал, а второй, нормальный белковый антиген, отсутствовал до стимуляции активности клетки. В некоторых вариантах осуществления такая конструкция может называться логическим вентилем «NOT». В отличие от логических вентилях AND, CAR-модифицированные клетки с логическим вентилем NOT активируются путем связывания с одним антигеном. Однако связывание второго рецептора со вторым антигеном действует так, что подавляет активирующий сигнал, поддерживающийся через CAR. Как правило, такой ингибирующий рецептор нацелен на антиген, 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 внеклеточный шарнирный домен человека или содержит его. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный шарнирный домен может быть доменом, который является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный шарнирный домен может быть доменом, который не является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в настоящем

документе). В некоторых вариантах осуществления один или более внеклеточных шарнирных доменов содержат внеклеточный шарнирный домен CD8a или внеклеточный шарнирный домен IgG4 или 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, оптимальную укладку белка, оптимальную стабильность белка, оптимальное связывание, оптимальную гомодимеризация 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 несколькими 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 встречающегося в природе связанного с мембраной или трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен человека или содержит его. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может быть доменом, который является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может быть доменом, который не является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает 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-zeta, FcR  $\gamma$ , V/I/LxYxxL/V, SIRP $\alpha$ , CD45, Siglec-10, PD1, SHP-1, SHP-2, KIR-2DL, KIR-3DL, NKG2A, CD170, CD33, BTLA, CD32b, SIRP $\beta$ , CD22, PIR-B, LILRB1, CD36 или трансмембранный домен Syk.

### *Трансмембранные домены FcR*

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен FcR содержит полноразмерный внеклеточный домен FcR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен FcR содержит часть полноразмерного внеклеточного домена FcR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен FcR представляет собой или содержит 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 настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен FcR может быть доменом, который не является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен FcR содержит 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 содержит полноразмерный трансмембранный домен TLR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный TLR содержит часть полноразмерного трансмембранного домена TLR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен TLR представляет собой или содержит 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 настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен TLR может быть доменом, который не является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен TLR содержит 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 содержит 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 настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен может быть доменом, который не является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в настоящем 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 передачу 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 передачу сигнала. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен представляет собой или содержит 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 передачу сигнала в иммунной клетке.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR включает любую часть одной или более костимулирующих молекул, например, по меньшей мере один сигнальный домен из CD3, гамма-цепи Fc-эпсилон RI, любое их производное или вариант, любая их синтетическая последовательность, обладающая такой же функциональной способностью, и любая их комбинация.

#### *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 настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен FcR может быть доменом, который не является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен FcR содержит CD64 (FcγRI), CD32a (FcγRIIa), CD32b (FcγRIIb), CD32c, CD16a (FcγRIIIa), CD16b (FcγRIIIb), FcεRI, FcεRII или FcαRI (CD89).

#### *Внутриклеточные домены TLR*

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

В некоторых вариантах осуществления один или более внутриклеточных сигнальных доменов содержат Cd3-дзета, FcR  $\gamma$ , 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, SIRP $\alpha$ , CD45, Siglec-10, PD1, SHP-1, SHP-2, KIR-2DL, KIR-3DL, NKG2A, CD170, CD33, BTLA, CD32b, SIRP $\beta$ , CD22, PIR-B, LILRB1, Syk, лиганд 41BB (41BBL; TNFSF9), CD27, OX40L, CD32b, CD11b, ITGAM, SLAMF7, CD206, CD163, CD209, дектин-2 или один или более сигнальных доменов цитокинового рецептора (например, IL1R, IL2R, IL3R, IL4R, IL5R, IL6R, IL7R, IL8R, IL9R, IL10R, IL11R, IL12R, IL13R, IL14R, IL15R, IL17R, IFN $\alpha$ R, IFN $\gamma$ R, TNFR, CSF1R, CSF2R, Dap10, CD36, дектин-1 или внутриклеточный сигнальный домен ICOSL)

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR содержит двойные сигнальные домены, такие как 41BB, CD28, ICOS, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, CD116 receptor beta chain, 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*

Используемый в данном документе термин «костимулирующая молекула» или «костимулирующий домен» относится к молекуле в иммунной клетке, которая используется для усиления или ослабления первоначального стимула. Например, ассоциированные с патогенами рецепторы распознавания образов, такие как ось TLR или CD47/SIRP $\alpha$ , представляют собой молекулы на иммунных клетках, которые, соответственно, усиливают или ослабляют первоначальный стимул. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен содержит ТКР, CD3 дзета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD86, общий FcR гамма, FcR бета (Fc эпсилон R1b), CD79a, CD79b, Fc гамма RIIa, DAP10, DAP12, Т-клеточный рецептор (ТКР), CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганд, который специфически связывается с CD83, CD86, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRK1), 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 настоящем документе, любое их производное, вариант или фрагмент, любую синтетическую последовательность костимулирующей молекулы, обладающую 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 настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен может быть доменом, который не является эндогенным для определенного типа иммунной клетки (например, модифицированной иммунной клетки, как представлено в настоящем документе).

Используемый в данном документе термин «костимулирующий сигнал» относится к сигналу, который в сочетании с первичным сигналом, таким как активация CAR на иммунной клетке, приводит к активации иммунной клетки.

#### *Расщепляющие пептиды*

Используемый в данном документе термин расщепляющий пептид относится к пептиду, который может индуцировать расщепление рекомбинантного белка в клетке. В некоторых вариантах осуществления расщепляющий пептид представляет собой пептид 2A. В некоторых вариантах осуществления расщепляющий пептид представляет собой или содержит пептид P2A, F2A, E2A или T2A. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в настоящем документе, содержит одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих один или более расщепляющих пептидов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую расщепляющий 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, при этом трансляция нуклеиновой кислоты приводит к получению белка, содержащего один или более внутриклеточных доменов, отделенных от одного или более пептидных агентов расщепляющим 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 внутреннего участка посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES может представлять собой любую вирусную, хромосомную или искусственно созданную последовательность, которая инициирует кэп-независимое связывание рибосомы с мРНК, способствуя инициации 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 оптимальной передачи сигналов 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 настоящем документе, содержит одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих один или более пептидных агентов. В некоторых вариантах осуществления пептидный агент представляет собой гамма-цепь FcR или содержит ее.

В некоторых вариантах осуществления пептидный агент содержит любой пептид, белок, рецептор, секретируемое антитело или его фрагмент (например, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc или нанотело). 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- $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF или MCSF), CD40-L, доминантно-отрицательный SIRP $\alpha$ , доминантно-отрицательный PD1, доминантно-отрицательный CD45, доминантно-отрицательный SIGLEC 10 или доминантно-отрицательный LILRB.

### *Fc-рецепторы (FcR)*

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит один или более антигенсвязывающих доменов и внеклеточный домен FcR, и/или трансмембранный домен CAR содержит трансмембранный домен FcR, и/или внутриклеточный домен CAR содержит 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 содержит 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 содержит часть полноразмерного внеклеточного 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 содержит трансмембранный домен TLR, и/или внутриклеточный домен CAR содержит TLR внутриклеточный домен. 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 содержит 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 TLR содержит часть полноразмерного внеклеточного домена TLR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный TLR содержит часть полноразмерного трансмембранного домена TLR. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный TLR содержит часть полноразмерного внутриклеточного домена TLR.

#### *Конструкции нуклеиновых кислот*

В настоящем изобретении, среди прочего, предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, или его

фрагмент. Иммунная клетка может содержать молекулу нуклеиновой кислоты (например, экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты), кодирующую по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая по меньшей мере один CAR, содержит: (a) внеклеточный домен (например, внеклеточный домен, как описано в настоящем документе), (b) трансмембранный домен (например, трансмембранный домен, как описано в настоящем документе), и (c) внутриклеточный домен (например, внутриклеточный домен, как описано в настоящем 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 предоставлена 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 соединенный» 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 соединенные 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.

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 содержит или представляет собой транскрипт матричной РНК (мРНК), кодирующий по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит или представляет собой конструкцию ДНК, кодирующую по меньшей мере один CAR, описанный в настоящем документе, или его фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления весь CAR или его фрагмент, описанный в настоящем документе, кодируется молекулой нуклеиновой кислоты с оптимизированным кодоном, например, для экспрессии в клетке (например, клетке млекопитающего). В данной области известны различные способы оптимизации кодонов, например, описанные в патентах США №№ 5786464 и 6114148, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Экспрессия нуклеиновых кислот, как описано в настоящем документе, может быть достигнута путем функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид CAR или его фрагмент, с промотором в векторе экспрессии. Типичные промоторы (например, конститутивные промоторы) включают, помимо прочего, промотор фактора элонгации-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), промотор немедленного раннего цитомегаловируса (ЦМВ), промотор убиквитина С, промотор фосфоглицерокиназы (PGK), ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор длинного терминального повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор вируса мышинного лейкоза Молони (MoMuLV), промотор вируса птичьего лейкоза, ранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина или промотор креатинкиназы. Примеры индуцируемых промоторов включают в себя, помимо прочего, промотор металлотионина, промотор глюкокортикоида, промотор прогестерона и промотор тетрациклина. 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 настоящем документе, или его фрагмент, содержит 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, помимо прочего, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы или ретровирусные векторы (например, лентивирусный вектор или гаммаретровирусный вектор). В некоторых вариантах осуществления вектор содержит лентивирусный вектор (например, описанный в патенте США № 9149519 или международной публикации № WO 2017/044487, содержание которых полностью включено в настоящий 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 поражают как реплицирующиеся, так и нереплицирующиеся клетки, приспособляются к большим трансгенам и кодируют 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 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 применения рекомбинантных векторов AAV (rAAV) описаны, например, в патентах 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 серотип AAV обладает тропизмом к определенной ткани.

Недавно было показано, что в некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas9 способствует высокому уровню точного редактирования генома с использованием векторов

аденоассоциированного вируса (AAV), которые служат в качестве ДНК-матрицы донора во время гомологичной рекомбинации (ГР).

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит гаммаретровирусный вектор (например, описанный в Tobias Maetzig et al., “Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application” *Viruses*. 2011 Jun; 3(6): 677–713, который полностью включен в настоящий 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 настоящем документе, и второй CAR, например, другой CAR, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления две или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих CAR и второй CAR, кодируются одной молекулой нуклеиновой кислоты, например, в одной рамке и в виде одной полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления два или более CAR разделены одним или более сайтами расщепления пептида (например, сайтом ауторасщепления или субстратом для внутриклеточной протеазы). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептид содержит пептид свиного тешовируса-1 (P2A), пептид вируса *Thomaspennellus* (T2A), пептид вируса ринита А лошадей (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 настоящем документе, и по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один ген, коэкспрессируемый с CAR, например, цитокина, описанного в настоящем документе (например, TNF, IL-12, IFN, ГМ-КСФ, Г-КСФ, М-КСФ и/или IL-1) или стимулирующего лиганда, описанного в настоящем документе (например, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ICOS-L, ICAM, CD30L, CD40, CD40L, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, рецептор лимфотоксина бета, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, агонист или антитело, которое связывает рецептор Toll-лиганда, и/или лиганд B7-H3).

### ***Фармацевтические композиции***

В настоящем изобретении, среди прочего, предложены фармацевтические композиции, содержащие иммунные клетки, как описано в настоящем документе (например, макрофаги,

моноциты или дендритные клетки) в сочетании с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит одну или более модифицированных мРНК, при этом одна или более модифицированных мРНК содержат модифицированный нуклеотид, изменение 5'- или 3'-нетранслируемой области (UTR), кэп-структуру, поли-А-хвост или их комбинацию, и один или более ингибиторов РНКазы L. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит одну или более модифицированных мРНК, содержащих кэп-структуру AGCap1 или m6AGCap1. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит одну или более модифицированных мРНК, содержащих модифицированный нуклеотид, содержащий псевдоуридин (PsU), 5-метоксиуридин (5moU), 5-метилцитидин/псевдоуридин (5meC PsU) или N1-метил-псевдоуридин (N1mPsU). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит сунитиниб. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит ABCE1. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит макрофаг, трансфицированный мРНК, содержащей модификации m6-AGCap1 и PsU, при этом мРНК кодирует CAR, при этом макрофаг культивировали с IFN- $\beta$  и культивировали макрофаг с усиленной IFN- $\beta$  экспрессией CAR, персистенцией CAR, функцией макрофага с CAR, фенотипом M1, устойчивостью к M2-индуцирующим факторам, или их комбинацией относительно макрофага, трансфицированного идентичные мРНК, но не культивированного с IFN- $\beta$ .

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

Фармацевтические композиции, содержащие иммунные клетки, как описано в настоящем документе (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), могут содержать буферы, такие как нейтральный солевой буфер или фосфатно-солевой буфер (ФСБ); 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);

сыворотку и консерванты, такие как криопротектор. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по сути не содержит загрязнителей, например, отсутствуют определяемые уровни загрязнителя (например, эндотоксина).

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, можно вводить способом, соответствующим заболеванию, расстройству или состоянию, которое необходимо лечить или предотвращать. Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента, а также тип и тяжесть заболевания, расстройства или состояния пациента, хотя соответствующие дозы могут быть определены клиническими испытаниями.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть в различных формах. Эти формы включают в себя, 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 настоящем документе, могут быть приготовлены для введения внутривенно, подкожно, внутрикочно, внутриопухолево, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, трансартериально или внутрибрюшинно.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, описанная в настоящем 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 настоящем 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, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

Используемые в данном документе термины «парентеральное введение» и «введение парентерально» относятся к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции или инфузии, и включают, помимо прочего, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, подоболочечную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикочную,

внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную, внутриопухолевую и интрастернальную инъекцию и инфузию.

Фармацевтические композиции, содержащие иммунные клетки, как описано в настоящем 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 целочисленные значения в пределах этих диапазонов. В некоторых вариантах осуществления доза иммунных клеток, как описано в настоящем документе (например, макрофагов, моноцитов или дендритных клеток), составляет по меньшей мере около  $1 \times 10^6$ , около  $1,1 \times 10^6$ , около  $2 \times 10^6$ , около  $3,6 \times 10^6$ , около  $5 \times 10^6$ , около  $1 \times 10^7$ , около  $1,8 \times 10^7$ , около  $2 \times 10^7$ , около  $5 \times 10^7$ , около  $1 \times 10^8$ , около  $2 \times 10^8$ , около  $5 \times 10^8$ , около  $1 \times 10^9$ , около  $2 \times 10^9$  или около  $5 \times 10^9$  клеток. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, также можно вводить множество раз в определенной дозировке. Специалист в данной области техники может легко определить оптимальную дозировку и схему лечения для конкретного пациента, наблюдая за пациентом в отношении признаков заболевания, расстройства или состояния и соответствующим образом скорректировать лечение.

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 из забора крови объемом от около 10 см<sup>3</sup> до около 400 см<sup>3</sup>. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки) активируются из забора крови объемом около 20 см<sup>3</sup>, около 30 см<sup>3</sup>, около 40 см<sup>3</sup>, около 50 см<sup>3</sup>, около 60 см<sup>3</sup>, около 70 см<sup>3</sup>, около 80 см<sup>3</sup>, около 90 см<sup>3</sup> или около 100 см<sup>3</sup>. Не ограничиваясь какой-либо теорией, способы, включающие множественные заборы крови и повторные инфузии, как описано в настоящем 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 комбинации со второй терапией (например, до, одновременно или после нее). Например, вторая терапия может включать, помимо прочего, противовирусную терапию (например, цидофовир, интерлейкин-2, цитарабин (ARA-C) или натализумаб),

терапию Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR-T), терапию Т-клетками с Т-клеточным рецептором (ТКР), химиотерапию, радиацию, 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 SIRP $\alpha$ , агонистов CD40, антагониста CSF1/CSF1R или агониста STING) или иммунодеструктивный агент (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 настоящем документе (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки), вводят в комбинации (например, до, одновременно или после) с трансплантацией костного мозга или абляционной терапией лимфоцитов с использованием химиотерапевтического агента (например, флударабина, дистанционной лучевой терапии (XRT), циклофосфида или ритуксана). В некоторых вариантах осуществления субъекты проходят стандартное лечение высокодозной химиотерапией с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых вариантах осуществления после трансплантации субъекты получают инфузию фармацевтической композиции, содержащей иммунные клетки, как описано в настоящем документе.. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, можно вводить до или после операции.

Дозировка любой вышеупомянутой терапии для введения субъекту будет варьироваться в зависимости от заболевания, расстройства или состояния, которое лечат, и в зависимости от конкретного субъекта. Масштабирование доз для введения человеку можно выполнять в соответствии с принятыми в данной области практиками. Например, доза алектузумаба обычно составляет от около 1 мг до около 100 мг для взрослого человека, обычно 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 настоящий документ посредством ссылки).

### ***Способы лечения***

В настоящем изобретении, среди прочего, предложены способы лечения заболевания или расстройства (например, заболевания или расстройства, описанного в настоящем документе) у субъекта, включающие доставку фармацевтической композиции, содержащей

иммунные клетки, как описано в настоящем документе (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки). В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, вводят субъекту, страдающему заболеванием или расстройством. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для производства лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства у субъекта или для стимуляции иммунного ответа у субъекта.

Субъектом, которого лечат способами, описанными в настоящем документе, может представлять собой млекопитающее, например, примата, например, человека (например, пациент, имеющий или подверженный риску заболевания или расстройства, описанного в настоящем 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 настоящем документе, можно вводить субъекту в соответствии со схемой дозирования, описанной в настоящем документе, отдельно или в комбинации с одним или несколькими терапевтическими агентами, процедурами или методами.

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

В данном документе предложен способ лечения (например, один или несколько из уменьшения, ингибирования или замедления прогрессирования) рака или опухоли у субъекта с помощью фармацевтической композиции, содержащей иммунные клетки, как описано в настоящем документе (например, макрофаги, моноциты или дендритные клетки). Субъект может иметь взрослую или детскую форму рака. Рак может быть на ранней, промежуточной или поздней стадии или метастатическим раком. Рак может включать, помимо прочего, солидную опухоль, гематологический рак (например, лейкемию, 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, предстательная железа), глотку, ЦНС (например, мозг, нервные или глиальные клетки), голову и шею, кожу (например, меланома, например, кожная меланома), поджелудочную железу и кости (например, хордома).

В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) (например, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) с плоскоклеточным и/или неплоскоклеточным гистологическим строением, или аденокарциномы НМРЛ), или мелкоклеточного рака легкого (МРЛ)), рака кожи (например, карциномы из клеток Меркеля или меланомы (например, прогрессирующей меланомы)), рака яичников, мезотелиомы, рака мочевого пузыря, саркомы мягких тканей (например, гемангиоперицитомы (ГПК)), рака кости (саркомы кости), рака почки (например, рака почки (например, почечно-клеточной карциномы)), рака печени (например, гепатоцеллюлярной карциномы), холангиокарциномы, саркомы, миелодиспластического синдрома (МДС), рака предстательной железы, рака молочной железы (например, рака молочной железы, который не экспрессирует один, два или все рецепторы эстрогена, рецептор прогестерона или Her2/neu, например, тройной негативный рак молочной железы), колоректального рака (например, рецидивирующего колоректального рака или метастатического колоректального рака, например, микросателлитного нестабильного колоректального рака, микросателлитного стабильного колоректального рака, колоректального рака с системой восстановления несоответствия или колоректального рака с дефектной системой восстановления несоответствия), 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 (НЭО) (например, атипичной карциноидной опухоли легких), лимфопролиферативного заболевания (например, посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания), лимфомы (например, Т-клеточной лимфомы, В-клеточной лимфомы или неходжкинской лимфомы), миеломы (например, множественной миеломы) или лейкемии (например, миелоидного лейкоза или лимфоидного лейкоза).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой опухоль головного мозга, например, глиобластому, глиосаркому или рецидивирующую опухоль головного мозга. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак поджелудочной железы,

например, прогрессирующий рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак 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 рак представляет собой рак почки, например, почечно-клеточную карциному (ПКР) (например, метастатическую почечно-клеточную карциному). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы, например, метастатическую карциному молочной железы или карциному молочной железы стадии IV, например, тройной негативный рак молочной железы (TNBC). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой вирус-ассоциированный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак анального канала (например, плоскоклеточный рак анального канала). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак шейки матки (например, плоскоклеточный рак шейки матки). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудка (например, рак желудка, положительный на вирус Эпштейна-Барра (EBV), или рак желудка или желудочно-пищеводного соединения). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак головы и шеи (например, ВПЧ-положительный и отрицательный плоскоклеточный рак головы и шеи (SCCHN)). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак носоглотки (РНГ). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой колоректальный рак, например, рецидивирующий колоректальный рак, метастатический колоректальный рак, например, микросателлитный нестабильный колоректальный рак, микросателлитный стабильный колоректальный рак, колоректальный рак со способностью к репарации несоответствия или колоректальный рак с дефектной системой восстановления несоответствия.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления рак 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 рак представляет собой лимфому, например, лимфому Ходжкина (ХЛ), неходжкинскую лимфому, лимфоцитарную лимфому или диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) (например, рецидивирующую или рефрактерную ХЛ или DLBCL). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой миелому, например, множественную миелому.

Фармацевтическую композицию, содержащую иммунные клетки, как описано в настоящем 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 настоящем документе, усиливает, стимулирует или повышает иммунный ответ у субъекта (например, у субъекта, имеющего или подверженного риску заболевания или расстройства, описанного в настоящем документе). В некоторых 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 изобретения субъект имеет воспалительное заболевание или подвержен риску его развития (например, хронического или острого воспалительного заболевания). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет аутоиммунное заболевание или расстройство или подвержен риску их развития. Примеры аутоиммунных заболеваний, которые можно лечить описанными в данном документе способами, включают, помимо прочего, болезнь Альцгеймера, астму (например, бронхиальную астму), аллергию (например, атопическую аллергию), синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), атеросклероз, болезнь Бехчета, целиакию, кардиомиопатию, болезнь Крона, цирроз печени, сахарный диабет, диабетическую ретинопатию, экзему, фибромиалгию, фибромиозит, гломерулонефрит, реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ), синдром Гийена-Барре, гемолитическую анемию, рассеянный склероз, миастению, остеоартрит, полихондрит, псориаз, ревматоидный артрит, сепсис, инсульт, васкулит, вентилятор-индуцированное 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 настоящем документе, можно осуществлять любым удобным способом (например, инъекцией, приемом внутрь, переливанием, ингаляцией, имплантацией или трансплантацией). В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе фармацевтические композиции вводят путем инъекции или инфузии. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, можно вводить пациенту трансартериально, подкожно, внутривенно, внутрикочно, внутриопухолево, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно или внутрибрюшинно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, описанную в настоящем 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 внутримышечной или подкожной инъекцией. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть введены инъекцией непосредственно в очаг воспаления, очаг локального заболевания, лимфатический узел, орган, опухоль или очаг инфекции у субъекта.

Изобретение дополнительно иллюстрируется следующим примером. Пример приведен только в иллюстративных целях. Его никоим образом не следует рассматривать как ограничение объема или содержания изобретения.

## **ПРИМЕРЫ**

Следующие примеры представлены для того, чтобы описать специалисту в данной области техники, как осуществлять и применять способы и композиции, описанные в настоящем документе, и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

### **Способы**

#### Дифференциация моноцитов в макрофаги

В иллюстративных способах по настоящему изобретению нормальные донорные лейкопаки, полученные аферезом, подвергали элютриации с использованием системы разделения клеток Elutra (Terumo BCT) или сепарации клеток с использованием CliniMACS Prodigy (Milenyi Biotec) или CliniMACS Plus (Milenyi Biotec) для уменьшения количества эритроцитов, тромбоцитов, лимфоцитов и гранулоцитов. Моноциты обогащали с помощью элютриации или проводили положительный отбор с помощью селекции MACS CD14<sup>+</sup> (Milenyi Biotec) в соответствии с инструкциями производителя. Чистоту и жизнеспособность до отбора и после отбора (положительная и отрицательная фракции) проверяли с помощью проточной цитометрии. Отобранные моноциты CD14<sup>+</sup> дифференцировались в макрофаги до 7 дней. Дифференцированные макрофаги собирали на 5-7 день и хранили в замороженном виде в среде для замораживания или использовали в экспериментах в свежем виде. В некоторых случаях клетки использовали после отбора в состоянии моноцитов.

#### Электропорация

В типичных способах по настоящему изобретению свежие или размороженные макрофаги человека размораживали и культивировали при 37°C в течение ночи за один день до электропорации. Макрофаги собирали и промывали ФСБ. Жизнеспособные клетки подсчитывали с помощью NC200. Для макрофагов, трансфицированных с использованием системы трансфекции Neon, 50 нМ-300 нМ мРНК на 1e+6 макрофагов смешивали на льду в буфере для электропорации. Макрофаги подвергали электропорации с помощью системы трансфекции Neon или системы электропорации Maxcyte. Клетки выдерживали на льду в течение 10 минут после электропорации. Клетки собирали, подсчитывали и культивировали в среде для культивирования макрофагов для дальнейшего использования. Затем клетки переносили на планшет и помещали на 15 минут при 37°C для восстановления. Клетки высевали в 6-луночные планшеты со средой для культивирования макрофагов для дальнейшего использования.

#### Сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS)

Жизнеспособность оценивали с использованием набора для окрашивания Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Staining Kit (Thermo) или аналогичных реагентов. Кроме того, жизнеспособность клеток оценивали с использованием NC-200 (Chemometec).

Первичные макрофаги человека тестировали на экспрессию CAR-HER2 с использованием двухэтапного протокола окрашивания: первичное окрашивание человеческий белок HER2/ERBB2-His-метка (Sino Biological Inc., 10004-H08H-100) с последующим окрашиванием Human TruStain FcX (Biolegend, 422302) и вторичное окрашивание метка анти-His APC (R&D Systems, IC050A). TruStain FcX (Biolegend, 422302) использовали для FACS-окрашивания моноцитов, макрофагов или моноцитарных клеточных линий, экспрессирующих Fc-рецепторы. Чистоту макрофагов тестировали с использованием следующей панели: анти-CD11b антителом, конъюгированным с PE (Biolegend, 301306), анти-CD14 антителом, конъюгированным с BV711 (Biolegend, 301838), анти-CD3 антителом, конъюгированным с FITC (eBioscience, 11-0038-42), анти-CD19 антителом, конъюгированным с PE-CY7 (eBioscience, 25-0198-42), анти-CD66b антителом, конъюгированным с PerCP-CY5.5 (Biolegend, 305108), анти-CD56 антителом, конъюгированным с BV605 (Biolegend, 318334) и набором для окрашивания мертвых клеток Live/Dead Fixable Aqua (L/D aqua) Dead Cell Stain (ThermoFisher, L34957). Ту же панель использовали для проверки чистоты моноцитов после отбора CD14 MACS перед посевом для дифференциации. Маркеры M1/M2 на первичных макрофагах человека определяли с помощью следующей панели: анти-CD11B антителом, конъюгированным с

PE (Biolegend, 301306), анти-CD80 антителом, конъюгированным с BV605 (Biolegend, 305225), анти-CD86 антителом, конъюгированным с BV711 (Biolegend, 305440), анти-CD206 антителом, конъюгированным с BV421 (Biolegend, 321126), анти-CD163 антителом, конъюгированным с APC-CY7 (Biolegend, 333622), анти-HLA-DR антителом, конъюгированным с BV785 (Biolegend, 307642), анти-HLA-ABC антителом, конъюгированным с PE/CY7 (Biolegend, 311430) и набором для окрашивания Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain.

### Функциональные анализы

#### *Совместное культивирование раковых клеток-мишеней и макрофагов с CAR*

Использовали клетки-мишени, такие как клетки рака молочной железы HER2+ (CRL2351) или клетки рака яичников HER2+, стабильно экспрессирующие NucLight Green GFP (Sartorius #4475). Оценивали дополнительные клеточные линии, которые экспрессировали родственный антиген, являющийся мишенью для CAR, как описано ниже.

Макрофаги с CAR совместно культивировали с клетками-мишенями в указанных соотношениях в течение указанных периодов времени. Для количественной оценки противоопухолевого эффекта *in vitro* относительное количество раковых клеток-мишеней измеряли с использованием микроскопа Incucyte для визуализации живых клеток (Sartorius), который отслеживает интенсивность зеленой флуоресценции культивируемых лунок примерно каждый час. Противоопухолевую активность макрофагов с CAR сравнивали с активностью только контрольных макрофагов или клеток-мишеней. Graphpad Prism использовался для построения графиков данных и статистического анализа.

#### *Обработка макрофагов с CAR интерфероном (IFN)*

После трансфекции мРНК CAR макрофаги культивировали в среде для культивирования макрофагов с 10-300 нг/мл рекомбинантного человеческого IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  или IFN- $\gamma$  (protech) в течение от 4 до 24 часов, как указано. Среду, содержащую IFN, смывают через указанное время. Макрофаги с CAR, праймированные IFN, использовали для дальнейшего анализа.

#### *Обработка макрофагов с CAR провоспалительными факторами*

После трансфекции мРНК CAR макрофаги  $2 \times 10^6$  культивировали в среде для культивирования макрофагов с различными концентрациями провоспалительных медиаторов. Примеры провоспалительных медиаторов включают: агонисты TLR1/2 (например, Pam3CSK4), агонисты TLR3 (например, Poly(I:C)), агонисты TLR4 (например,

стандарт ЛПС-ЭК (липополисахарид из *Escherichia coli* K12)), агонисты TLR5 (например, стандарт ФЛА-СТ (флагеллин из *S. typhimurium*)), агонисты TLR6/2 (например, FSL-1), агонисты TLR7 (например, имиквимод), агонисты TLR8 (например, ssRNA40/LyoVec), агонисты TLR9 (например, олигонуклеотиды CpG), IFN- $\gamma$  20 нг/мл, TNF- $\alpha$  20 нг/мл,  $\beta$ -глюкан, рекомбинантный человеческий CD40-лиганд, рекомбинантный человеческий 41BB-лиганд, рекомбинантный человеческий рецептор 41BB, TNF $\alpha$ , IL6, IL12, агонисты STING , агонисты cGAS и другие провоспалительные медиаторы (цитокины, агонисты, антитела, низкомолекулярные вещества, пептиды) в течение 4–48 часов. Через указанное время среду смывали и для дальнейшего анализа использовали макрофаги, праймированные CAR.

#### Оценка фенотипа макрофагов (M1/M2)

Маркеры M1/M2 на первичных макрофагах человека определяли с помощью следующей панели: анти-CD11B антителом, конъюгированным с PE (Biolegend, 301306), анти-CD80 антителом, конъюгированным с BV605 (Biolegend, 305225), анти-CD86 антителом, конъюгированным с BV711 (Biolegend, 305440), анти-CD206 антителом, конъюгированным с BV421 (Biolegend, 321126), анти-CD163 антителом, конъюгированным с APC-CY7 (Biolegend, 333622), анти-HLA-DR антителом, конъюгированным с BV785 (Biolegend, 307642), анти-HLA-ABC антителом, конъюгированным с PE/CY7 (Biolegend, 311430) и набором для окрашивания Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain. Продукцию цитокинов (IL12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL6, IL8, IL1b, MCP-1, IL10, IL4, IL13 и других цитокинов человека) оценивали в супернатантах, собранных из макрофагов (контрольных или CAR), обработанных, как описано ниже, с использованием прибора MSD в соответствии с рекомендациями производителя (Meso Scale Discovery). В некоторых случаях макрофаги культивировали совместно с клетками-мишенями, несущими антиген, при указанных соотношениях эффектора и мишени.

#### Обнаружение экспрессии mCherry

Эффективность трансфекции, постоянство экспрессии и интенсивность экспрессии флуоресцентного репортерного гена mCherry в моноцитах или макрофагах человека оценивали с помощью микроскопии в режиме реального времени на приборе Incucyte (Sartorius) в течение указанного периода времени.

### Обработка макрофагов сунитинибом

Макрофаги обрабатывали 0-10 мкМ сунитиниба (ингибитор РНКазы-L) в течение 2 часов перед электропорацией или трансфекцией мРНК. Уровень экспрессии и постоянство экспрессии кодируемого трансгена оценивали с использованием способов, описанных выше.

### ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени кодируемого трансгена (такого как CAR) проводили с использованием стандартных способов. Вкратце, РНК выделяли с использованием набора для очистки РНК Ambion RiboPure (AM1924, Thermo Fisher) и подвергали обратной транскрипции с использованием iScript RT Supermix для ОТ-кПЦР (1708841, Bio-Rad). Для количественной ПЦР использовали кДНК-матрицу, праймеры, праймер/зонд для экспрессии гена Taqman и мастер-смесь для экспрессии гена Taqman (4369016, Applied Biosystems) в соответствии с инструкциями производителя.

### Определение продолжительности экспрессии CAR

#### *Проточная цитометрия*

В типичных способах по настоящему изобретению 50000 макрофагов с CAR высевали в лунки 96-луночного планшета. Для измерения экспрессии анти-HER2 CAR к клеткам добавляли His-меченый рекомбинантный белок HER2 вместе с буфером, таким как ФСБ, дополненный BSA, и оставляли для инкубации. Затем клетки центрифугировали при 300×g в течение 5 минут, после чего удаляли супернатант. Затем Fc-рецепторы блокировали, используя блокирующий Fc раствор, такой как Human TruStain FcX (BioLegend, Cat 422302), в течение пяти минут в ФСБ. 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, добавляли анти-His-антитела, такие как конъюгированное с APC антитело с His меткой (R&D Systems, Cat IC050A). Экспрессию CAR определяли с помощью проточной цитометрии, сначала гейтируя популяцию отдельных клеток, затем отбирали живые клетки и, наконец, измеряли APC-флуоресценцию клеток. Клетки, экспрессирующие CAR, будут более яркими в канале APC, чем контрольные клетки, которые не подвергались воздействию анти-His-антитела. Яркость CAR-положительных клеток определяла степень

экспрессии, а повторные измерения с течением времени позволяли отслеживать экспрессию CAR с течением времени.

### *Иммунофлуоресцентная (ИФ) микроскопия*

В иллюстративных способах по настоящему изобретению клетки культивировали соответствующим образом на предметном стекле. Затем среду удаляли и клетки трижды промывали ФСБ. Затем клетки фиксировали 4% параформальдегидом или метанолом. Время инкубации в фиксаторе зависело от его типа. По прошествии соответствующего времени фиксатор удаляли и клетки снова трижды промывали ФСБ. Если требовалось внутриклеточное окрашивание, клетки затем инкубировали в 1% ТритонХ-100 (ThermoFisher, кат.№ BP151-100) в ФСБ, а затем трижды промывали в ФСБ. Затем к клеткам добавляли блокирующий раствор, такой как BSA в ФСБ, и оставляли для блокировки на 60 минут. Затем блокирующий раствор удаляли и клетки промывали. Антитела, конъюгированные с флуорохромом, разводили в соответствии с инструкциями производителя и оставляли для связывания с клетками в течение ночи. Затем раствор антител удаляли, а клетки промывали. Наконец, на клетки наносили раствор для заключения препарата, такой как ProLong™ Diamond Antifade Mountant с DAPI (Invitrogen, кат. № P36966), и сверху помещали покровное стекло. Давали высохнуть в течение 24 часов перед визуализацией. Визуализация проводилась с помощью флуоресцентной микроскопии. Клетки, экспрессирующие CAR, были ярче, чем клетки, не экспрессирующие CAR, в соответствующем канале для флуорофора.

### *ОТ-ПЦР*

В типичных способах по настоящему изобретению макрофаги лизировали и РНК собирали с помощью набора для одноэтапной ОТ-ПЦР (набор для одноэтапной РВ-кПЦР SuperScript™ III Platinum™, Invitrogen кат. № 11732-020) в соответствии с инструкциями производителя. В анализе использовали праймеры, специфичные для CAR. Макрофаги с мРНК CAR показали сигнал в анализе ОТ-ПЦР, тогда как нетрансдуцированные макрофаги действительно показали сигнал.

### Определение функциональности эффекторных клеток CAR

В типичных способах по настоящему изобретению трансген CAR вводили в моноциты или макрофаги посредством электропорации/трансфекции нуклеиновой кислотой (например, ДНК, мРНК или химически модифицированной мРНК) или посредством вирусной трансдукции с помощью лентивирусного, аденовирусного или альтернативного вирусного

вектора. Экспрессию CAR подтверждают с помощью антигенспецифического окрашивания с помощью проточной цитометрии, ПЦР в реальном времени или флуоресцентной микроскопии. Эти методы также можно использовать для определения интенсивности и кинетики экспрессии CAR. Конструкции CAR, которые экспрессируются на поверхности макрофагов, тестируют на активность в анализе фагоцитоза опухоли и/или анализе уничтожения опухоли в отношении мишень-положительной клеточной линии. Конструкции, которые вызывают фагоцитоз и/или уничтожение клеток-мишеней, тестировали на секрецию цитокинов, секрецию хемокинов, способность рекрутирования иммунных клеток, фенотипическое изменение (т.е. самополяризацию до M1/M2) и функциональность стимуляции Т-клеток/презентации антигена.

### Анализ фагоцитоза

#### *Проточный анализ фагоцитоза (клетки)*

В иллюстративных способах по настоящему изобретению 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 были сконструированы для экспрессии флуоресцентного белка (например, GFP). Затем CAR-экспрессирующие и контрольные макрофаги 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 включала краситель жизнеспособности и специфический для макрофагов маркер, такой как CD11b. После гейтирования живых клеток клетки, которые были дважды положительными по CD11b/CFSE, представляли собой макрофаги, предположительно фагоцитировавшие клетку. Макрофаги с CAR должны иметь повышенный процент двойных положительных клеток при культивировании с мишень-положительными опухолевыми клетками по сравнению с макрофагами без CAR. Специфичность фагоцитоза на основе мишени тестировали с использованием контроля макрофагов, культивируемых с клетками, отрицательными в отношении мишени.

#### *Проточный анализ фагоцитоза (гранулы)*

В иллюстративных способах по настоящему изобретению полистироловые гранулы функционализировали мишенью CAR или нерелевантным белком. Кроме того, эти гранулы были помечены красным красителем pHrodo™ Red, SE (Invitrogen, кат. № P36600), который представляет собой pH-реактивный краситель. При подкислении краситель увеличивал уровень флуоресценции. Затем гранулы культивировали с макрофагами с CAR и

нетрансдуцированными макрофагами. Через некоторое время макрофаги удаляли и окрашивали для проточной цитометрии с использованием красителя для оценки жизнеспособности и специфического для макрофагов маркера, такого как CD11b. После гейтирования живых клеток клетки, которые были дважды положительными по CD11b/pHrodo, считались макрофаги, предположительно фагоцитировавшими гранулу. Макрофаги с CAR должны иметь повышенный процент двойных положительных клеток при культивировании с мишень-положительными гранулами по сравнению с макрофагами без CAR. Специфичность фагоцитоза на основе мишени тестировали с использованием контроля макрофагов, культивируемых с гранулами, отрицательными в отношении мишени.

#### *Incisocyte (клетки)*

В иллюстративных способах по настоящему изобретению мишень-положительные опухолевые клетки, экспрессирующие флуоресцентный белок, такой как GFP, культивировали с макрофагами с CAR и нетрансдуцированными макрофагами в 96-луночной планшете. Соотношение между эффекторными макрофагами и опухолевыми клетками-мишенями варьировалось от 10:1 E:T до 1:10 E:T, наряду с контролем только с клетками-мишенями 0:1 E:T. Количество макрофагов поддерживали постоянным на уровне  $10 \times 10^3$  макрофагов на лунку. Изменение флуоресценции во времени, измеряемое каждые четыре часа, измеряли для определения степени гибели опухолевых клеток, происходящей в культуре. Кроме того, методы анализа изображений использовались для определения местоположения макрофагов в культуре и определения количества макрофагов, которые фагоцитировали опухолевые клетки.

#### *Incisocyte (гранулы)*

В иллюстративных способах по настоящему изобретению функционализированные pHrodo гранулы, несущие белок-мишень для CAR, добавляли как к макрофагам с CAR, так и к нетрансдуцированным макрофагам в лунках 96-луночного планшета. Макрофаги высевали в концентрации  $20 \times 10^3$  на лунку и добавляли гранулы в соотношении 5:1 гранул 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 использовали для определения степени происходящего фагоцитоза. Ожидалось, что макрофаги с CAR будут иметь более высокое изменение флуоресценции, чем нетрансдуцированные контроли.

В типичных способах по настоящему изобретению мышей NSGS (NSG-SGM3) заражали SKOV3, HER2+ раком яичников человека, путем внутрибрюшинного введения для моделирования карциноматоза брюшины. Мышей обрабатывали макрофагами с CAR человека, которые были получены посредством электропорации мРНК с праймированием IFN- $\beta$  или без него (или отрицательные контроли). Опухолевая нагрузка контролировалась с помощью биолюминесцентной визуализации.

*Сингенная модель мыши*

Иммунокомпетентным мышам BALB-C прививали CT26-HER2, модель колоректальной карциномы HER2+, посредством подкожной инъекции. После приживления опухолей мышей обрабатывали макрофагами с CAR, которые были получены с помощью электропорации мРНК с праймированием IFN- $\beta$  или без него (или отрицательный контроль). Опухолевая нагрузка контролировалась с помощью измерения штангенциркулем массы опухоли.

**Пример 1: Влияние модификаций мРНК на экспрессию и жизнеспособность первичных макрофагов человека**

Донорные макрофаги (HC153444 и/или HC156308) дифференцировали из моноцитов CD14+ и мРНК mCherry подвергали электропорации или трансфекции. мРНК mCherry включала типичные модификации, такие как варианты кэп-структуры, содержащие AGCap1, m6AGCap1 или аналог кэп-структуры с правильной ориентацией (ARCA), и модифицированные нуклеотиды, содержащие псевдоуридин (PsU), 5-метоксиуридин (5moU) или 5-метилцитидин/псевдоуридин (5meC PsU). Экспрессию мРНК и жизнеспособность клеток определяли с помощью FACS на 1-й или 15-й день после трансфекции.

Варианты мРНК mCherry не влияли на жизнеспособность макрофагов при электропорации, однако жизнеспособность макрофагов, трансфицированных мРНК, варьировалась от 36% до 70%, в зависимости от варианта (**Фиг. 1A**). Процент клеток, экспрессирующих mCherry, составлял почти 100% в клетках, подвергшихся электропорации, и 70-90% в трансфицированных клетках (не показано). Средняя интенсивность флуоресценции mCherry (представляющая количество белков mCherry, экспрессируемых на клетку) зависела от модификации мРНК, а также от методов трансфекции (**Фиг. 1B**). AGCap1 генерировал большую интенсивность mCherry в клетках, подвергшихся электропорации, в

то время как модификация PsU и очистка ВЭЖХ генерировали большую интенсивность mCherry в трансфицированных клетках.

Как показано на **Фиг. 1С**, персистенция РНК mCherry зависела от модификаций мРНК и используемого способа доставки мРНК. мРНК mCherry сохранялась дольше в трансфицированных макрофагах по сравнению с макрофагами, подвергшимися электропорации. мРНК, содержащая AGCap1, сохранялась лучше, чем мРНК m6AGCap1 в электропорированных клетках. Очистка ВЭЖХ оказала большее влияние на трансфицированные клетки, чем на электропорированные клетки.

### **Пример 2: Влияние модификаций мРНК CAR на жизнеспособность макрофагов**

Донорные макрофаги (HC153444) дифференцировали от моноцитов CD14+, и макрофаги трансфицировали мРНК, кодирующей CAR (мРНК CAR), с помощью электропорации или трансфекции. Использовали мРНК, кодирующую CAR, включающую внеклеточный домен HER2 и внутриклеточный домен CD3zeta. Экспрессию CAR и жизнеспособность клеток определяли с помощью FACS в 1-й день.

Как показано на **Фиг. 2А**, примерная жизнеспособность макрофагов, подвергнутых электропорации с мРНК, составляла > 80% для всех оцененных модификаций мРНК. Макрофаги, трансфицированные мРНК Viromer, имели жизнеспособность >90% для большинства CAR-экспрессирующих макрофагов и необработанных макрофагов, хотя жизнеспособность составляла 65% для макрофагов, трансфицированных мРНК, содержащей модификации m6AGCap1 и PsU, и мРНК, содержащей модификации 5moU. Кроме того, как показано на **Фиг. 2В**, для электропорированных макрофагов мРНК CAR, содержащая модификации m6AGCap1 и PsU, приводила к самой высокой экспрессии CAR. Для макрофагов, трансфицированных мРНК, мРНК CAR, содержащая модификации m6AGCap1, N1mPsU и/или PsU, приводила к наибольшей экспрессии CAR. Как показано на **Фиг. 2С**, оптимизация мРНК 5'Cap до m6AGCap1 и модификация урацила до псевдоурацила (PsU) привели к примерно 3-кратному увеличению экспрессии CAR на макрофагах человека.

### **Пример 3: Влияние модификаций мРНК CAR на функцию макрофагов**

Макрофаги человека дифференцировали из моноцитов CD14+, и макрофаги подвергали электропорации с мРНК, кодирующей HER2 CAR (мРНК CAR). Клетки рака молочной железы HER2+ с флуоресцентной меткой (CRL2351) совместно культивировали с

макрофагами CAR через два дня после их трансфекции мРНК CAR при соотношении эффектора (макрофаг CAR) к мишени (раковая клетка) 5:1. Рост клеток CRL2351 контролировали каждые четыре часа по их флуоресценции.

Как показано на **Фиг. 3А**, макрофаги, которые были трансфицированы мРНК CAR HER2, содержащей модификации m6AGCap1PsU, демонстрировали сильную активность уничтожения, сравнимую с макрофагами, трансдуцированными Ad5f35. Макрофаги, которые были трансфицированы мРНК CAR HER2, содержащей модификации m6AGCap1PsU, показали наилучшую активность по уничтожению клеток-мишеней по сравнению с макрофагами, трансфицированными мРНК CAR HER2, содержащей модификации 5moU (**Фиг. 3В-3Д**). Эти результаты также показывают, что макрофаги, трансфицированные оптимальной модификацией мРНК, обладали большей противоопухолевой активностью при более низких соотношениях эффектора (CAR-M) к мишени (раковая клетка).

#### **Пример 4: Поляризация M1 усиливает персистенцию мРНК и функцию макрофагов/CAR-макрофагов**

Макрофаги человека подвергали электропорации мРНК CAR 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 (ЛПС), TNF-альфа, IL-6 или лиганд STING (STING-L) в течение до 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. Клетки рака молочной железы HER2+ с флуоресцентной меткой (CRL2351) совместно культивировали с макрофагами CAR HER2 через два дня после трансфекции макрофагов. Рост раковых клеток контролировали по их флуоресценции на микроскопе Incucyte для визуализации живых клеток каждые четыре часа. Отношение эффектора (макрофага CAR) к мишени (раковой клетке) составляло 5:1.

Как показано на **Фиг. 4А**, тестируемые интерфероновые цитокины 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. 4В**). Как показано на **Фиг. 4С**, обработка макрофагов интерфероновыми цитокинами 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- $\alpha$  или IFN- $\gamma$ , что демонстрирует, что IFN- $\beta$  увеличивает продолжительность экспрессии кодируемых мРНК трансгенов, таких как CAR, в макрофагах человека (**Фиг. 4D**). Кроме того, обработка макрофагов CAR, трансфицированных мРНК, с помощью IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  или IFN- $\gamma$  приводила к индукции фенотипа M1 (на основе экспрессии CD86; **Фиг. 4E**) и снижению маркеров M2 (на основе экспрессии CD163; **Фиг. 4F**). IFN- $\beta$  приводил к сильнейшему фенотипу M1 среди оцениваемых интерферонов, и фенотип M1 сохранялся по меньшей мере в течение 7 дней после обработки (**Фиг. 4E**).

#### **Пример 5: Влияние обработки IFN на экспрессию CAR, функцию макрофагов с CAR, 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 с мРНК CAR HER2, содержащей различные модификации мРНК. Экспрессию CAR и маркеры M1 определяли с помощью проточной цитометрии (Attune) на четвертый день после электропорации. Клетки макрофагов CAR на 4-й день затем совместно культивировали с меченой Nuc-Light линией клеток рака молочной железы HER2+ (CRL2351) при соотношении эффектора (макрофаг с CAR) к мишени (раковая клетка) 5:1. Рост раковых клеток контролировали по их флуоресценции на микроскопе Incucyte для визуализации живых клеток каждые четыре часа.

Как показано на **Фиг. 5A**, макрофаги, трансфицированные всеми оцененными химическими препаратами с обработкой IFN- $\beta$  или без нее, продемонстрировали высокую жизнеспособность. Макрофаги, трансфицированные AGCap1 или m6AGCap1 и PsU или N1mPsU, модифицированными мРНК CAR, продемонстрировали самый высокий уровень экспрессии, а IFN- $\beta$  незначительно увеличил процент клеток, экспрессирующих CAR для всех модификаций, на 4-й день (**Фиг. 5B**). Однако обработка IFN- $\beta$  привела к заметному увеличению количества CAR, экспрессируемых на клетку, на основе MFI CAR для всех оцениваемых модификаций мРНК, при этом ко-модифицированная мРНК m6AGCap1/PsU приводила к самой высокой экспрессии (**Фиг. 5C**).

Для дальнейшей оценки влияния IFN- $\beta$  на персистенцию CAR макрофаги человека, подвергнутые электропорации с мРНК m6AGCap1/PsU, кодирующей CAR HER2, оценивали на 2-й и 7-й день. Обработка IFN- $\beta$  привела к значительному повышению уровня

экспрессии CAR на 7-й день по сравнению с макрофагами CAR, не обработанными IFN- $\beta$  (Фиг. 6).

Чтобы подтвердить влияние обработки IFN- $\beta$  на улучшенную экспрессию CAR и оптимизировать концентрацию IFN- $\beta$ , макрофаги, трансфицированные модифицированной мРНК M6AGCap1/PsU, обрабатывали 0, 3, 10, 30 или 100 нг/мл IFN- $\beta$  в течение 4 часов, а жизнеспособность, процент CAR и MFI CAR оценивали на 4-й и 7-й день после электропорации. Наблюдался дозозависимый эффект IFN- $\beta$  на экспрессию CAR макрофагами человека (Фиг. 7А). Как описано в Примере 4, обработка макрофагов CAR IFN- $\beta$  индуцировала фенотип M1, поэтому были проведены дополнительные эксперименты, чтобы определить, зависит ли эффект от дозы. Как показано на Фиг. 7В, индукция маркеров M1 CD80, CD86 и HLA-DR зависела от дозы IFN- $\beta$ .

Учитывая, что фенотип макрофагов считается пластичным, и известно, что иммуносупрессивные цитокины, такие как IL-10, индуцируют фенотип M2, оценивали влияние обработки IL-10 на обработанные IFN- $\beta$  или необработанные макрофаги, трансфицированные мРНК CAR HER2. Макрофаги CAR, обработанные IFN- $\beta$ , сопротивлялись действию IL-10 и не экспрессировали маркер M2 CD163, но вместо этого сохраняли экспрессию маркера M1 CD86 через 48 часов после обработки (Фиг. 8А) и через 7 дней после обработки IL-10 (Фиг. 8В). Макрофаги CAR, праймированные IFN- $\beta$ , также сопротивлялись другим факторам, индуцирующим M2.

Для оценки противоопухолевой функции макрофагов, трансфицированных мРНК, кодирующей CAR HER2, с или без праймирования IFN- $\beta$ , нетрансдуцированные (UTD) макрофаги или макрофаги с CAR праймировали 0, 3, 10, 30 или 100 нг/мл IFN- $\beta$  в течение 4 часов или 20 часов. Затем эти эффекторные клетки совместно культивировали с линией клеток рака молочной железы HER2+ 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 визуализации живых клеток. Праймирование IFN- $\beta$  приводило к улучшенной способности макрофагов CAR убивать раковые клетки (Фиг. 9А). Чтобы оценить, улучшает ли обработка IFN- $\beta$  противоопухолевую активность макрофагов с CAR с мРНК, содержащей модификации, оценивали противоопухолевую активность макрофагов, подвергнутых электропорации мРНК, содержащей уникальные модификации, с обработкой IFN- $\beta$  или без нее. Обработка IFN- $\beta$  привела к улучшению противоопухолевой активности для всех макрофагов с CAR, за исключением тех, которые были трансфицированы мРНК 5moU (Фиг. 9В). Чтобы оценить, является ли улучшенный противоопухолевый эффект макрофагов с CAR, 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. Макрофаги с CAR, обработанные IFN-β, приводили к лучшему уничтожению раковых клеток с более сильным эффектом, чем IFN-α или IFN-γ (**Фиг. 9C**).

Чтобы оценить, улучшает ли обработка интерфероном макрофагов другие противоопухолевые функции, оценивали секрецию цитокинов обработанными или необработанными мРНК-трансфицированными макрофагами с CAR HER2, после совместного культивирования с клетками рака молочной железы HER2+. Макрофаги человека подвергали электропорации 150 нМ мРНК CAR HER2, содержащей модификации m6AGCap1 и PsU. Клетки рака молочной железы HER2+ (CRL2351) совместно культивировали с макрофагами с CAR после того, как макрофаги были трансфицированы мРНК CAR при соотношении эффектора (макрофаг с CAR) 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. 10**, обработка макрофагов IFN-α, IFN-β или IFN-γ приводила к увеличению секреции цитокинов IL-6, IL-8 и TNFα из макрофагов.

Были проведены дополнительные исследования, чтобы определить, может ли обработка интерферонами дополнительно улучшить персистенцию мРНК CAR в макрофагах и можно ли расширить функциональность макрофагов с CAR. 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 линией клеток рака молочной железы HER2+ (CRL2351) при соотношении эффектора к мишени 3:1. Рост раковых клеток контролировали по их флуоресценции на микроскопе Incucyte для визуализации живых клеток. Экспрессию CAR и маркеры M1 в макрофагах определяли с помощью проточной цитометрии (Attune) на 7-й день после трансфекции.

Как показано на **Фиг. 11A**, через два дня после трансфекции мРНК CAR жизнеспособность макрофагов с CAR и экспрессия CAR были очень высокими, за исключением макрофагов, обработанных IFN-γ. Кроме того, как показано на **Фиг. 11B** и **Фиг. 11C**, обработка IFN усиливала активность макрофагов с CAR в отношении уничтожения клеток-мишеней. На **Фиг. 11C** показано уничтожение клеток-мишеней после совместного культивирования раковых клеток и макрофагов в течение 72 часов. Обработка интерфероном также влияла

на жизнеспособность макрофагов, экспрессию CAR, экспрессию маркера M1 и функциональность макрофагов с CAR. Как показано на **Фиг. 12А**, обработка трансфицированных макрофагов IFN- $\beta$  приводит к повышению жизнеспособности клеток, экспрессии CAR HER2 и экспрессии маркеров M1 CD80, CD86 и HLA-DR по сравнению с макрофагами, которые не были обработаны интерфероном в более поздний момент времени, на 7-й день. На **Фиг. 12А** показано, что все макрофаги имели высокую жизнеспособность на 7-й день, но макрофаги, обработанные IFN- $\beta$ , экспрессировали самый высокий уровень CAR со значительным отрывом. На **Фиг. 12В** показано, что из всех макрофагов с CAR, которые были протестированы в анализе уничтожения раковых клеток через 7 дней после электропорации, макрофаги, обработанные IFN- $\beta$ , приводили к наивысшему уровню уничтожения рака (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. 12С**, все интерфероны улучшали активность макрофагов с CAR по уничтожению раковых клеток по сравнению с макрофагами с CAR, которые не подвергались обработке интерфероном.

#### **Пример 6: Трансфицированные макрофаги чувствительны к IFN $\gamma$**

Макрофаги человека трансфицировали мРНК mCherry, содержащей модификации m6AGCap1 и PsU или N1mPsU, а затем культивировали в течение одного дня с различными дозами IFN- $\gamma$ . Экспрессию mCherry контролировали с помощью микроскопа Incucyte для визуализации живых клеток. Как показано на **Фиг. 13А**, IFN- $\gamma$  снижал экспрессию мРНК mCherry, когда макрофаги трансфицировали с помощью мРНК.

Ранее было показано, что транскрибируемая *in vitro* мРНК распознается различными эндосомальными рецепторами врожденного иммунитета (например, Toll-подобный рецептор (TLR) 3, TLR7 и TLR8) и цитоплазматическими рецепторами врожденного иммунитета (протеинкиназа, активируемая РНК (PKR), белок гена I, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-I), белок 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы (MDA5), и 2'-5'-олигоаденилатсинтаза (OAS)). Передача сигналов через эти различные пути приводит к воспалению, связанному с интерфероном типа 1 (IFN), фактором некроза опухоли (TNF), интерлейкином-6 (IL-6), IL-12 и активацией каскадов транскрипционных программ. В целом, они создают провоспалительное микроокружение, способное вызывать специфические иммунные ответы. Более того, последующие эффекты, такие как снижение трансляции с помощью фосфорилирования эукариотического фактора инициации трансляции 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), усиленное расщепление РНК рибонуклеазой L (РНКазой L),

сверхэкспрессия и ингибирование самоамплифицирующейся репликации мРНК, имеют отношение к фармакокинетике и фармакодинамике мРНК IVT.

Активация IFN- $\gamma$  через пути TLR может активировать 2'-5'-олигоденилатсинтазу (ОАС), которая продуцирует 2'-5'-олигоденилат (2-5A), который, в свою очередь, может активировать РНКазу L, что приводит к расщеплению РНК и апоптозу.

### **Пример 7: Влияние ингибиторов РНКазы L, сунитиниба и ABCE1, на макрофаги CAR**

Чтобы определить, может ли ингибитор РНКазы L устранить индуцированную IFN- $\gamma$  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- $\gamma$ . Экспрессию mCherry контролировали с помощью микроскопа Incucyte для визуализации живых клеток. Как показано на **Фиг. 14А**, сунитиниб устранял IFN- $\gamma$ -индуцированное расщепление мРНК.

Чтобы оценить, может ли ингибирование РНКазы L улучшить противоопухолевую функцию мРНК-трансфицированных макрофагов с CAR, макрофаги трансфицировали мРНК, содержащей модификации, и предварительно обрабатывали сунитинибом перед оценкой в качестве эффекторных клеток в анализе уничтожения раковых клеток. Макрофаги с CAR, предварительно обработанные 1 нМ сунитинибом, приводили к более высокому уровню уничтожения раковых клеток, чем макрофаги с CAR, предварительно не обработанные сунитинибом, или нетрансфицированные контрольные макрофаги, обработанные или не обработанные сунитинибом (**Фиг. 14В**). Улучшенная способность к уничтожению рака макрофагов с CAR, праймированных сунитинибом, в 48-часовом анализе уничтожения клеток рака молочной железы CRL2351 показана на **Фиг. 14С**.

Эффект другого ингибитора РНКазы L (RLI или ABCE1) также был протестирован для дальнейшего подтверждения концепции. Макрофаги человека совместно трансфицировали мРНК, кодирующей mCherry, содержащей модификации m6AGCap 1 и PsU, и мРНК, кодирующей ABCE1.

Как показано на **Фиг. 15**, коэкспрессия ABCE1 значительно улучшала экспрессию представляющего интерес трансгена, кодируемого мРНК, через 48 часов после электропорации. Жизнеспособность макрофагов, совместно трансфицированных ABCE1, не пострадала и оставалась высокой. Совместная трансфекция ABCE1 увеличила

экспрессию mCherry примерно в 2 раза, а предварительная обработка сунитинибом еще больше усилила этот эффект.

### **Пример 8: Влияние генетически кодируемого ингибитора РНКазы L на макрофаги с CAR**

Чтобы оценить, могут ли другие генетически кодируемые ингибиторы РНКазы L улучшать экспрессию CAR, оценивали совместную трансфекцию мРНК CAR, содержащей модификации, и мРНК, кодирующей NS1. NS1 представляет собой ген, полученный из вируса гриппа А, который кодирует белок NS1A. Как показано на **Фиг. 16**, совместная трансфекция мРНК CAR с ABCE1 или мРНК CAR с NS1 повышала уровень экспрессии CAR по сравнению с котрансфекцией CAR с контрольным геном mCherry. Совместная трансфекция NS1 приводила к более высокой экспрессии CAR, чем котрансфекция ABCE1.

Чтобы оценить механизм, с помощью которого ABCE1 и/или NS1 влияют на экспрессию CAR, распад электропорированной мРНК, кодирующей CAR HER2, содержащий модификации, оценивали с помощью ОТ-кПЦР. Относительное содержание мРНК CAR в макрофагах, трансфицированных CAR плюс mCherry, CAR плюс ABCE1 или CAR плюс мРНК NS1 через 8 часов, сравнивали с содержанием мРНК CAR через 2 часа. Как показано на **Фиг. 17**, уровни мРНК CAR, совместно трансфицированной mCherry (отрицательный контроль), снизились более чем на 50% за 6 часов, в то время как уровни мРНК CAR, котрансфицированных мРНК ABCE1 или NS1, продолжали расти.

### **Пример 9: Праймирование макрофагов**

Для создания макрофагов, экспрессирующих CAR Her2-Zeta, первичные макрофаги человека суспендировали в буфере для ЭП (MaxCyte), содержащем 300 нМ мРНК (TriLink) в концентрации  $90 \times 10^6$  клеток/мл. 100  $\mu$ кл клеточной смеси добавляли в кассету для электропорации (OC100x2; MaxCyte) и подвергали электропорации с использованием настройки «Экспериментальная Т-клетка 1». Клетки извлекали из кассеты, помещали в 3 мл среды TechMACS (Miltenyi Biotech), содержащей 20 % ФСБ (Gibco), на чашки UpCell (Thermo Scientific) и инкубировали в течение ночи при 37°C и 5 % CO<sub>2</sub>.

Рекомбинантный лиганд CD40 (Peprotech), лиганд 4-1BB (Enzo Life Sciences) и рецептор 4-1BB (Peprotech) ресуспендировали в сверхчистой воде, пригодной для молекулярно-биологических исследований, до исходной концентрации 100  $\mu$ кг/мл. Затем исходный раствор использовали для создания рабочих растворов в ФСБ в диапазоне от 2 до 0,002

мг/мл. В лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл рабочего раствора и оставляли при комнатной температуре на 4 часа.

Планшеты вынимали из инкубатора и оставляли при комнатной температуре на 30 минут. Клетки отделяли от планшета, подсчитывали с использованием автоматического счетчика клеток NC-200 (Chemomtech) и повторно суспендировали в среде TechMACS с 10% ФБС. Покрытые белком планшеты дважды промывали ФБС с последующим добавлением макрофагов в конечном объеме 100 мкл среды TechMACS с 10% ФБС. Планшеты инкубировали в течение 3 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Через 3 часа в каждую лунку добавляли 10000 клеток CRL-2351, экспрессирующих ядерный GFP. Конечная концентрация ГМ-КСФ составила 10 нг/мл во всех лунках. Лизис клеток определяли с помощью 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 200 мкл среды TechMACS + 10% ФБС + 10 нг/мл ГМ-КСФ и инкубировали в течение 3 дней при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки инкубировали в 300 мкл Accutase (Sigma) в течение 30 минут и переносили в 96-луночный круглодонный планшет для окрашивания. Клетки инкубировали в буфере 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. Обнаружение экспрессии поверхностных белков завершали с использованием проточного цитометра Attune NxT (Thermo Fischer).

Обработка макрофагов с CAR с помощью CD40L значительно улучшала способность макрофагов и макрофагов с CAR уничтожать опухоли (**Фиг. 18А**). Праймирование CD40L также индуцировало фенотип M1 в макрофагах, трансфицированных мРНК CAR (**Фиг. 18В**). Обработка 4-1BB и 4-1BBL вызывала аналогичные результаты, хотя и менее эффективна, чем CD40L (**Фиг. 19А-19В** и **Фиг. 20А-В**). Эти результаты показывают, что предварительная обработка или праймирование макрофагов с CAR агонистами CD40, такими как CD40L, может привести к повышению эффективности и что комбинированная терапия, включающая макрофаги с CAR с агонистами CD40, может иметь повышенную эффективность.

#### **Пример 10: Влияние модификаций мРНК на моноциты человека**

Также оценивали доставку мРНК CAR, содержащей модификации, в моноциты человека. В частности, мРНК, кодирующую CAR HER2, содержащую модификации M6AGCap1 и PsU, электропорировали в моноциты, полученные от пяти доноров-людей. Как показано на **Фиг. 21**, была достигнута высокая экспрессия CAR как по интенсивности, так и по процентному содержанию.

#### **Пример 11. Эффективность CAR-макрофагов, полученных с помощью электропорации мРНК, в мышинной модели солидной опухоли с ксенотрансплантатом**

Для оценки эффективности CAR-макрофагов, полученных электропорацией мРНК, в мышинной модели ксенотрансплантата солидной опухоли использовали пять групп. Исследовательские группы включали группу отрицательного контроля (без обработки), группу положительного контроля (с обработкой), группу положительного контроля (с обработкой) с IFN- $\beta$ , группу, получавшую мРНК CAR-макрофагов (мРНК-CAR), и группу, получавшую мРНК CAR-макрофагов с IFN- $\beta$  (мРНК-CAR + IFN $\beta$ ).

Мышам NSGS вводили  $6 \times 10^5$  клеток SKOV3 ( $n=5$  мышей в группе). Затем мышей обрабатывали  $8 \times 10^6$  макрофагов посредством внутрибрюшинной инъекции в 0, 4 и 8 день, как показано стрелками на **Фиг. 22**. Опухолевая нагрузка измерялась с помощью биолуминесцентной визуализации с использованием системы визуализации IVIS (Perkin Elmer). Мышей визуализировали каждые 2-3 дня.

Как показано на **Фиг. 22**, у мышей, обработанных макрофагами с мРНК CAR или IFN- $\beta$ -праймированными макрофагами с мРНК CAR, наблюдалось подавление роста опухоли по сравнению с контрольными группами.

#### **Пример 12: Эффективность CAR-макрофагов, полученных с помощью электропорации мРНК, в мышинной модели сингенной солидной опухоли**

Для оценки эффективности CAR-макрофагов, полученных электропорацией мРНК, в мышинной модели сингенной солидной опухоли использовали пять групп. Исследовательские группы включали группу отрицательного контроля (без обработки), группу положительного контроля (с обработкой), группу положительного контроля (с обработкой) с IFN- $\beta$ , группу, получавшую мРНК CAR-макрофагов (мРНК CAR), и группу, получавшую мРНК CAR-макрофагов с IFN- $\beta$  (мРНК CAR + IFN $\beta$ ).

Мышам BALB/c подкожно вводили  $7,5 \times 10^5$  клеток рака толстой кишки CT26-HER2 ( $n=12-13$  мышей на группу). Через 12 дней после инъекции опухоли (когда средняя масса опухоли

составляла 50 мм<sup>3</sup>) внутриопухолево вводили примерно 3еб макрофагов. Дополнительные макрофаги вводили на 16-й и 20-й день (приблизительно 3еб на мышь на инъекцию, как показано стрелками на **Фиг. 23**). Объемы опухоли измеряли штангенциркулем раз в две недели, и объем опухоли оценивали по следующей формуле: объем опухоли = длина x ширина <sup>2</sup>/2, где длина представляет собой наибольший диаметр опухоли, а ширина представляет собой перпендикулярный диаметр опухоли.

Как показано на **Фиг. 23**, почти 80% мышей, которым вводили обработанные IFN-β макрофаги с мРНК CAR, отторгали свои опухоли, в то время как около 60% мышей с контролем, обработанным IFN-β контролем или макрофагами с мРНК CAR, отторгали опухоли. IFN-β-праймированные макрофаги с мРНК CAR значительно подавляли рост опухоли по сравнению с отрицательным контролем. Примечательно, что в контексте иммунокомпетентной мышинной модели, IFN-β-праймированные макрофаги с мРНК CAR превосходили по эффективности макрофаги с мРНК CAR или контрольные IFN-β-праймированные макрофаги, демонстрируя синергизм между конструированием CAR и IFN-β-праймированием.

## ЭКВИВАЛЕНТЫ

Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что различные изменения, модификации и усовершенствования настоящего изобретения легко придут на ум специалистам в данной области техники. Предполагается, что такие изменения, модификации и усовершенствования являются частью настоящего изобретения и находятся в пределах сущности и объема изобретения. Соответственно, вышеприведенное описание и графические материалы приведены только в качестве примера, и любое изобретение, описанное в настоящем описании, дополнительно описано подробно в нижеприведенной формуле изобретения.

Специалисты в данной области техники поймут типичные стандарты отклонения или ошибки, связанные со значениями, полученными в анализах или других процессах, как описано в данном документе. Публикации, веб-сайты и другие справочные материалы, на которые даны ссылки в данном документе для описания предпосылок создания изобретения и предоставления дополнительных подробностей относительно его практического применения, включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ модификации иммунной клетки, включающий стадии:
  - (a) модификации матричной РНК (мРНК), кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR),
  - (b) очистки мРНК, и
  - (c) доставки мРНК в иммунную клетку,при этом иммунная клетка представляет собой макрофаг, моноцит или дендритную клетку, и  
при этом модифицированная иммунная клетка содержит CAR.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что стадия модификации включает осуществление включения в мРНК модифицированного нуклеотида, изменение 5'- или 3'-нетранслируемой области (UTR), кэп-структуры и/или поли(А)-хвоста.
3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что кэп-структура включает AGCap1, m6AGCap1 или аналог кэп-структуры с правильной ориентацией (ARCA).
4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что модифицированный нуклеотид включает псевдоуридин (PsU), 5-метоксиуридин (5moU), 5-метилцитидин/псевдоуридин (5meC PsU), N1-метилпсевдоуридин (N1mPsU) или их комбинации.
5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что стадия очистки включает очистку на кремнезёмной мембране и/или высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).
6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что стадия доставки включает трансфекцию.
7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что стадия модификации включает осуществление включения в мРНК AGCap1 и 5moU, стадия очистки включает очистку на кремнезёмной мембране, а стадия доставки включает электропорацию.
8. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что стадия модификации включает осуществление включения в мРНК AGCap1 и PsU, стадия очистки включает ВЭЖХ, а стадия доставки включает электропорацию.

9. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что стадия модификации включает осуществление включения в мРНК AGCap1 и N1mPsU, стадия очистки включает ВЭЖХ, а стадия доставки включает электропорацию.
10. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что стадия модификации включает осуществление включения в мРНК m6-AGCap1 и N1mPsU, стадия очистки включает ВЭЖХ, а стадия доставки включает электропорацию.
11. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что стадия модификации включает осуществление включения в мРНК m6-AGCap1 и PsU, стадия очистки включает ВЭЖХ, а стадия доставки включает электропорацию.
12. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что стадия модификации включает модификацию мРНК для включения AGCap1 и PsU, стадия очистки включает ВЭЖХ, а стадия доставки включает трансфекцию.
13. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что стадия модификации включает осуществление включения в мРНК m6-AGCap1 и PsU, стадия очистки включает ВЭЖХ, а стадия доставки включает трансфекцию.
14. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что стадия модификации включает осуществление включения в мРНК m6-AGCap1 и N1mPsU, стадия очистки включает ВЭЖХ, а стадия доставки включает трансфекцию.
15. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что стадия модификации включает осуществление включения в мРНК AGCap1 и 5moU.
16. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что стадия модификации включает осуществление включения в мРНК m6AGCap1 и 5moU.
17. Способ по любому из пп. 1-16, дополнительно включающий стадию обработки иммунной клетки ингибитором РНКазы L.
18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что ингибитор РНКазы L включает сунитиниб.

19. Способ по п. 17, отличающийся тем, что ингибитор РНКазы L включает ABCE1.
20. Способ по п. 17, отличающийся тем, что стадия обработки предшествует стадии доставки.
21. Способ по любому из пп. 1-20, дополнительно включающий стадию культивирования иммунной клетки с цитокином или иммуностимулирующим рекомбинантным белком.
22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что цитокин представляет собой IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, STNGL, LPS, агонист CD40, лиганд 4-1BB, рекомбинантный рецептор 4-1BB, агонист TLR, бета-глюкан, IL-4, IL-13, IL-10, TGF- $\beta$ , глюкокортикоид, иммунный комплекс или их комбинацию.
23. Способ по п. 21 или п. 22, отличающийся тем, что цитокин включает IFN- $\beta$ .
24. Способ по любому из пп. 21-23, отличающийся тем, что стадия культивирования происходит после стадии доставки.
25. Способ по любому из пп. 1-24, отличающийся тем, что модифицированная иммунная клетка экспрессирует CAR.
26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что экспрессия CAR повышена по сравнению с экспрессией CAR в модифицированной иммунной клетке того же типа, в которую была доставлена немодифицированная мРНК, кодирующая CAR.
27. Способ по п. 25, отличающийся тем, что модифицированная иммунная клетка проявляет повышенную эффекторную активность по сравнению с эффекторной активностью модифицированной иммунной клетки того же типа, в которую была доставлена немодифицированная мРНК, кодирующая CAR.
28. Модифицированная иммунная клетка, полученная способом по любому из пп. 1-27.

29. Модифицированная иммунная клетка по п. 28, отличающаяся тем, что модифицированная иммунная клетка проявляет повышенную жизнеспособность по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR.

30. Модифицированная иммунная клетка по п. 28 или п. 29, отличающаяся тем, что модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышенную экспрессию мРНК, кодирующей CAR, по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR.

31. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 28-30, отличающаяся тем, что модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышенную экспрессию CAR по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR.

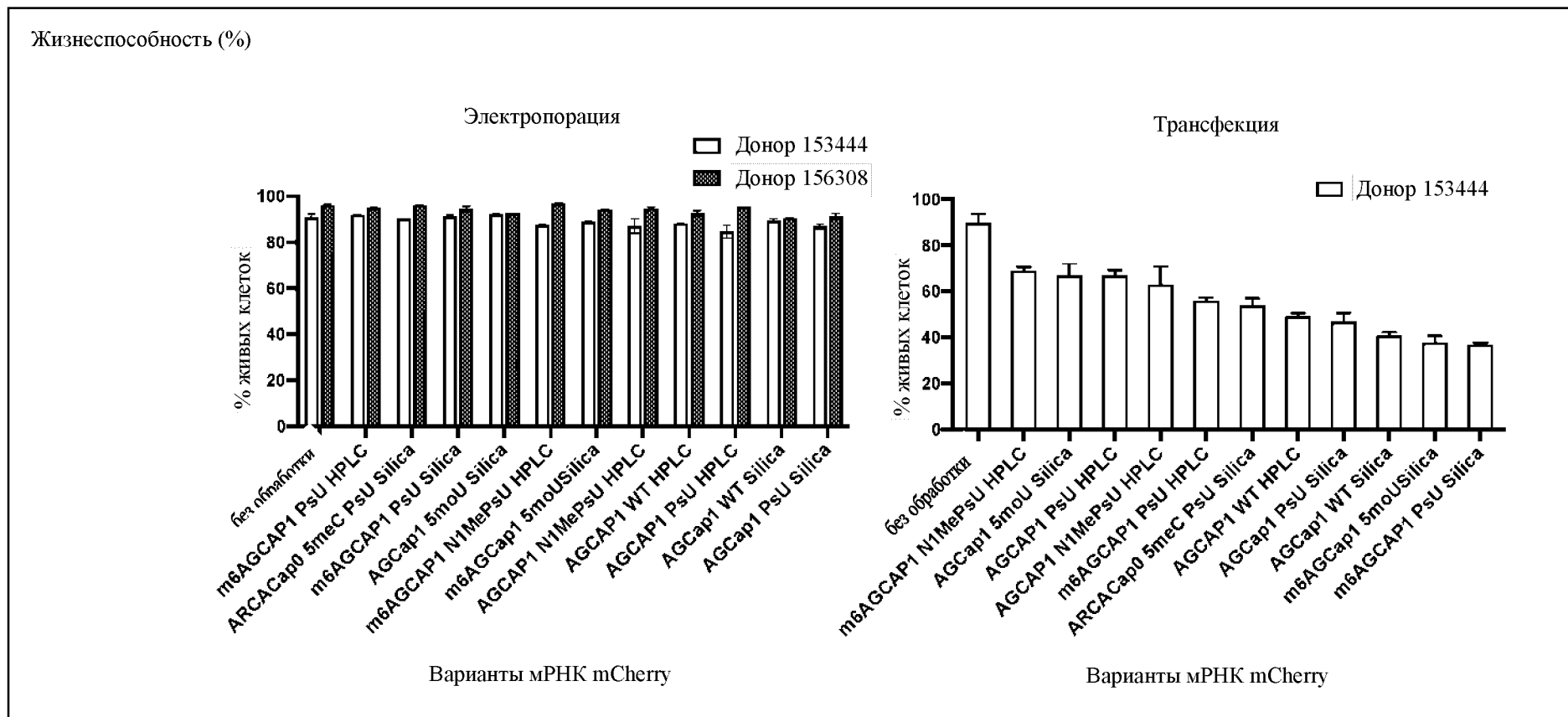
32. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 28-31, отличающаяся тем, что модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышенную продолжительность жизни мРНК, кодирующей CAR, по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR.

33. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 28-32, отличающаяся тем, что модифицированная иммунная клетка демонстрирует повышенную продолжительность жизни CAR по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR.

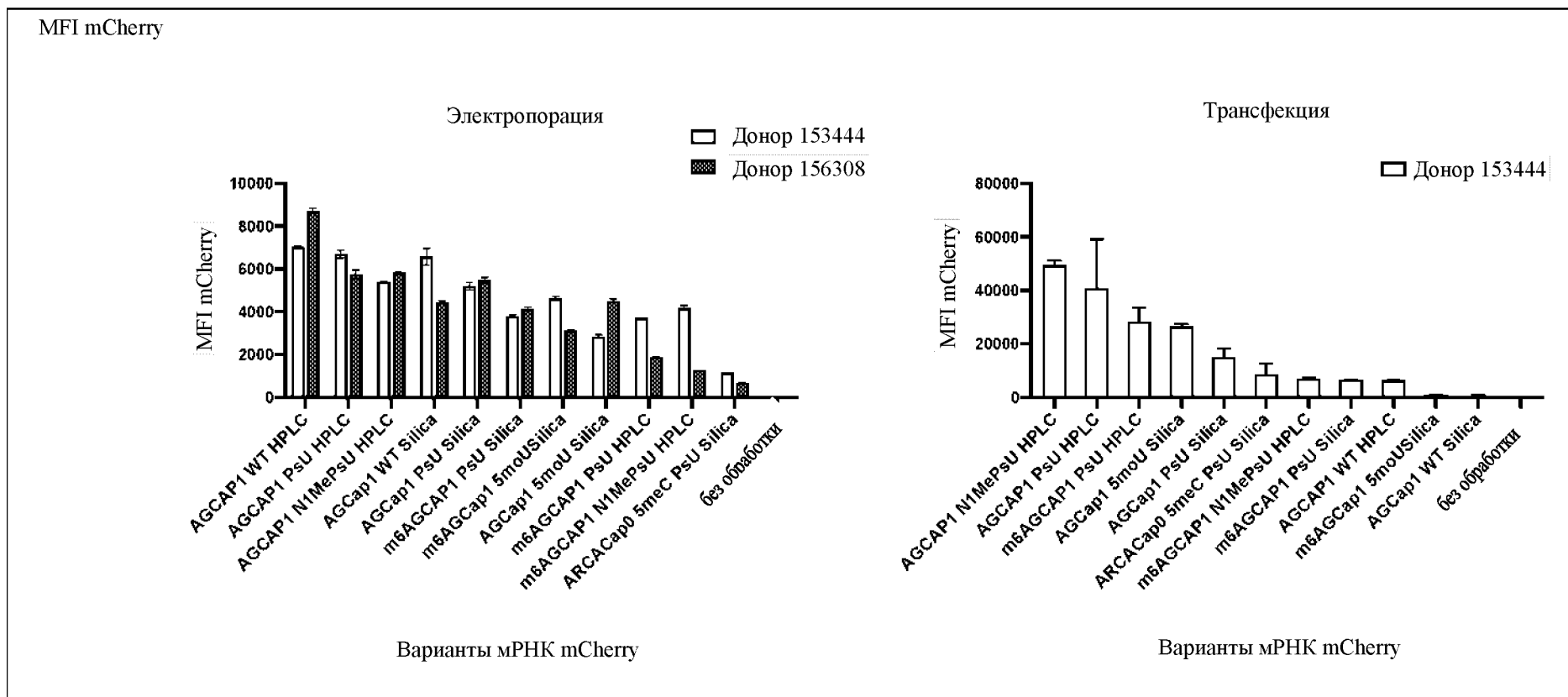
34. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 28-33, отличающаяся тем, что модифицированная иммунная клетка проявляет повышенную эффекторную активность по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR.

35. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 28-34, отличающаяся тем, что модифицированная иммунная клетка проявляет повышенную поляризацию M1 по сравнению с модифицированной иммунной клеткой того же типа, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую CAR.

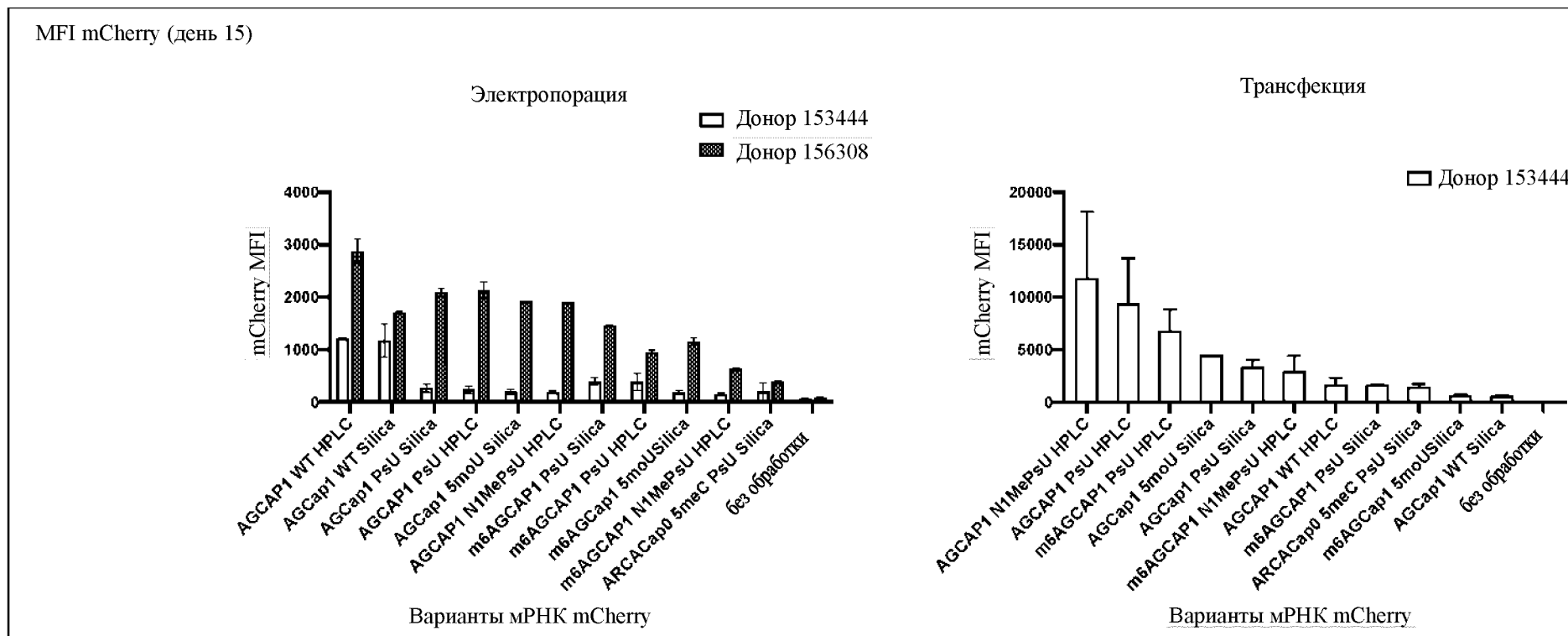
36. Композиция, содержащая:  
одну или более модифицированных мРНК, при этом одна или более модифицированных мРНК содержат модифицированный нуклеотид, изменение 5'- или 3'-нетранслируемой области (UTR), кэп-структуру, поли-А-хвост или их комбинацию, и один или более ингибиторов РНКазы L.
37. Композиция по п. 36, отличающаяся тем, что кэп-структура включает AGCap1 или m6AGCap1.
38. Способ по п. 36 или п. 37, отличающийся тем, что модифицированный нуклеотид включает псевдоуридин (PsU), 5-метоксиуридин (5moU), 5-метилцитидин/псевдоуридин (5meC PsU) или N1-метилпсевдоуридин (N1mPsU).
39. Способ по любому из пп. 36-38, отличающийся тем, что один или более ингибиторов РНКазы L включают сунитиниб.
40. Способ по любому из пп. 36-38, отличающийся тем, что один или более ингибиторов РНКазы L включают ABCE1.



ФИГ. 1А

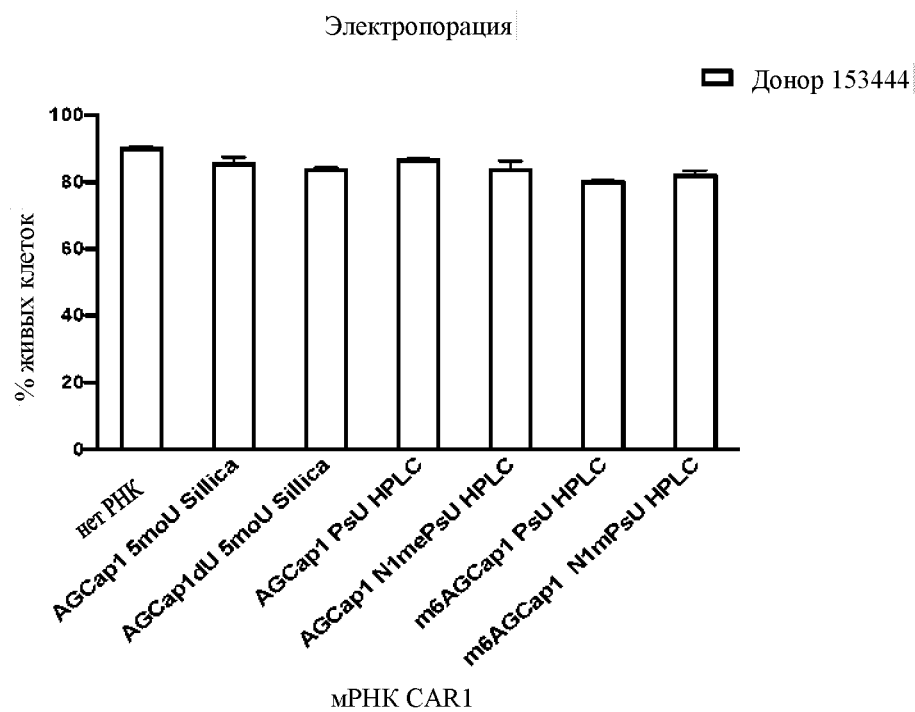


ФИГ. 1В

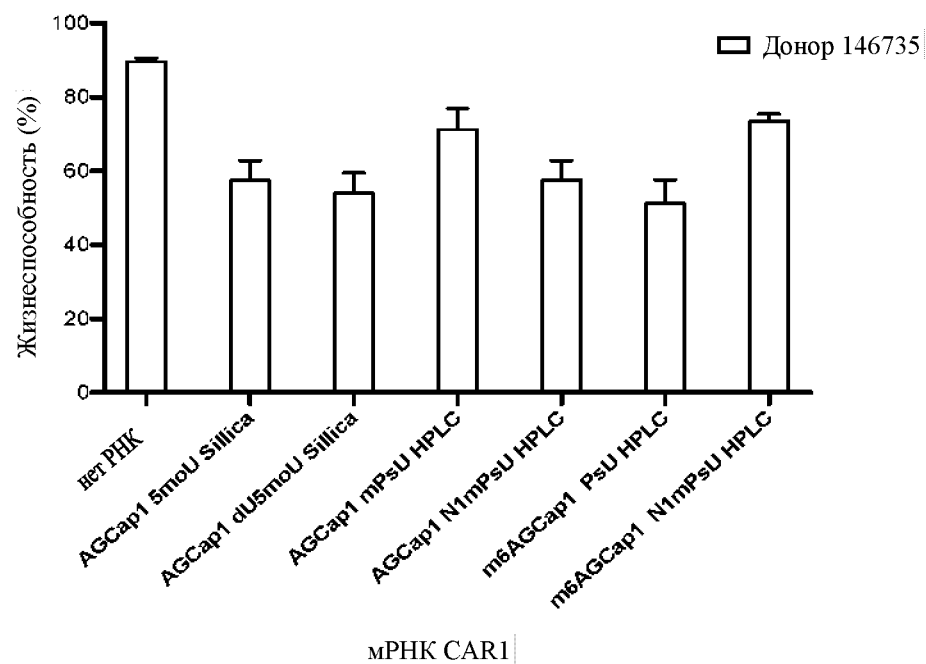


ФИГ. 1С

Жизнеспособность (%)

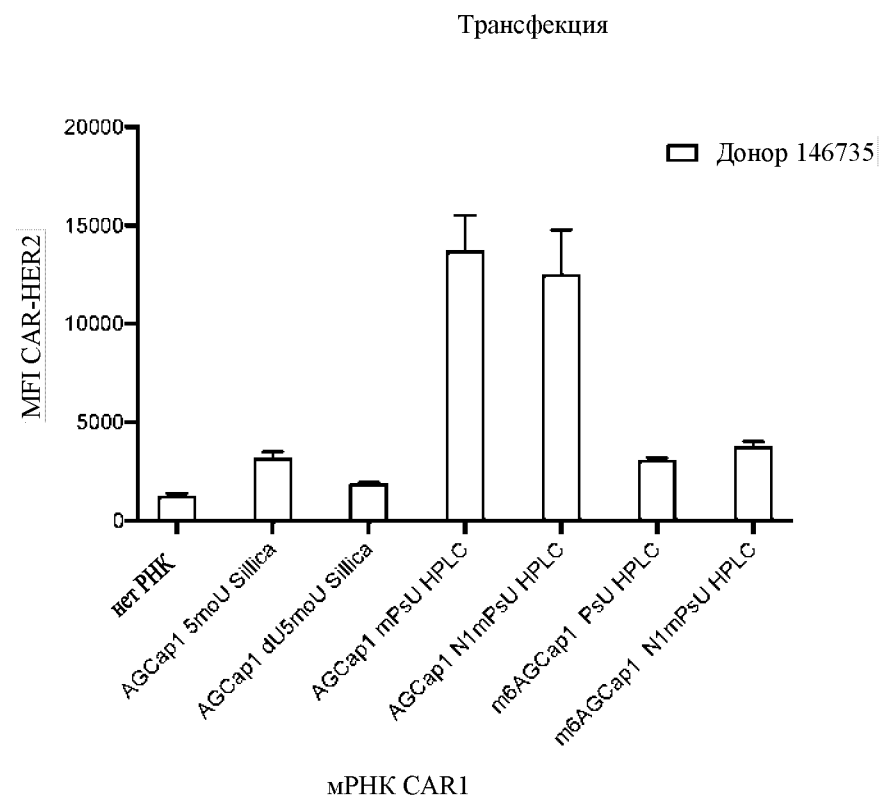
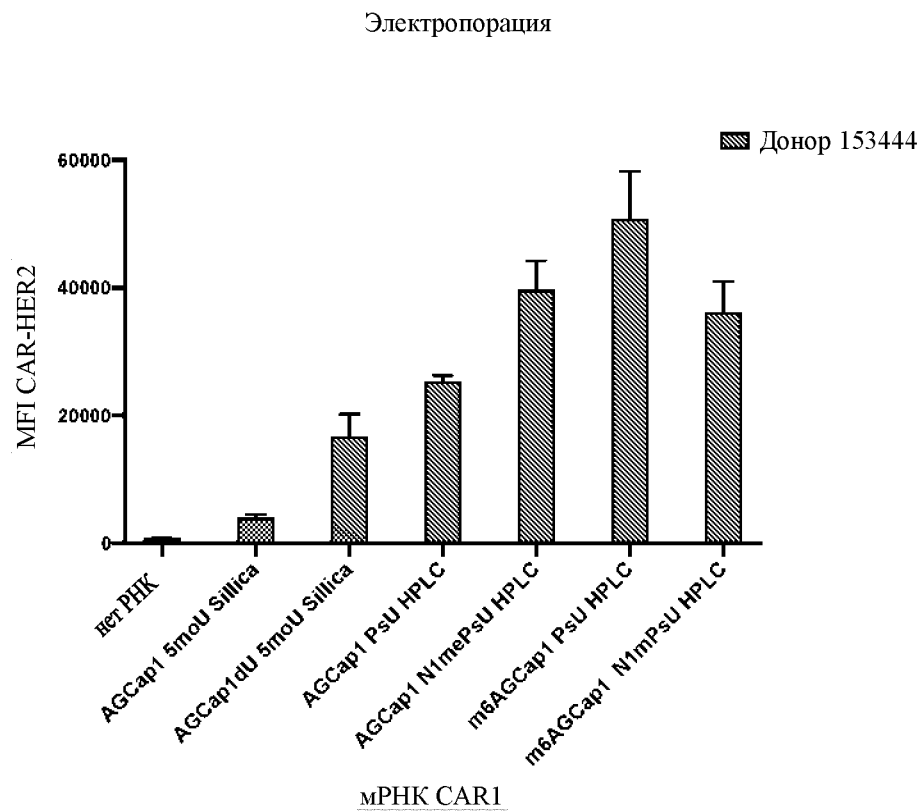


Трансфекция

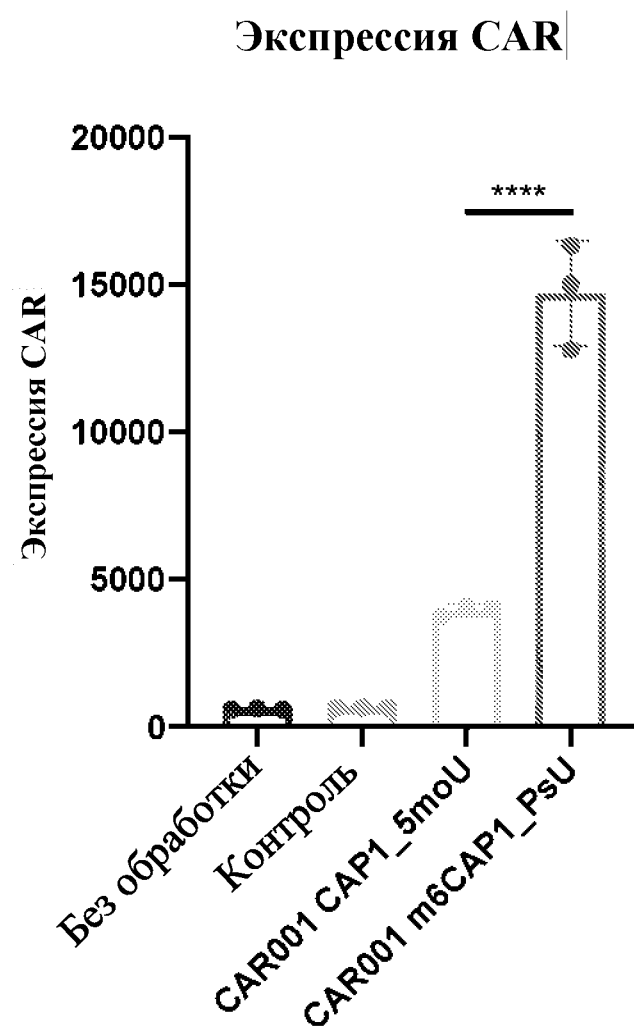


ФИГ. 2А

# ЭКСПРЕССИЯ CAR

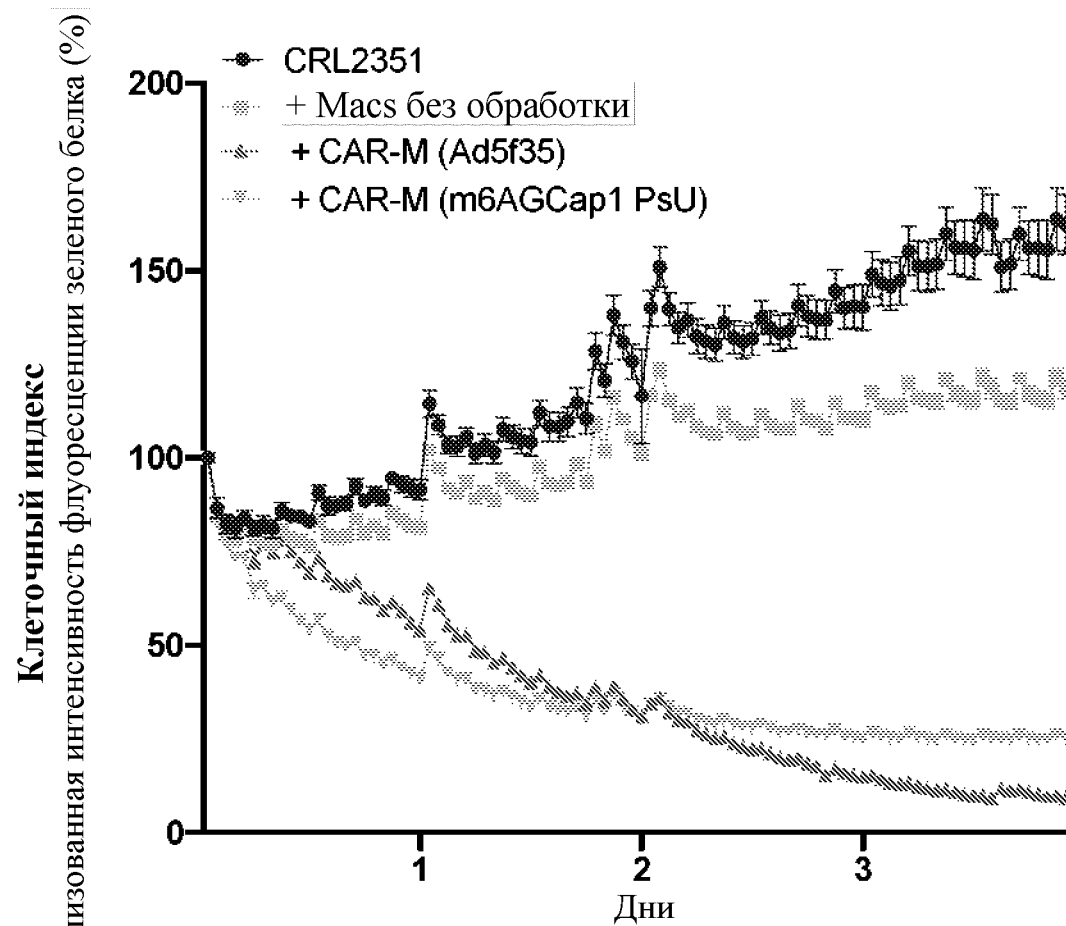


ФИГ. 2В



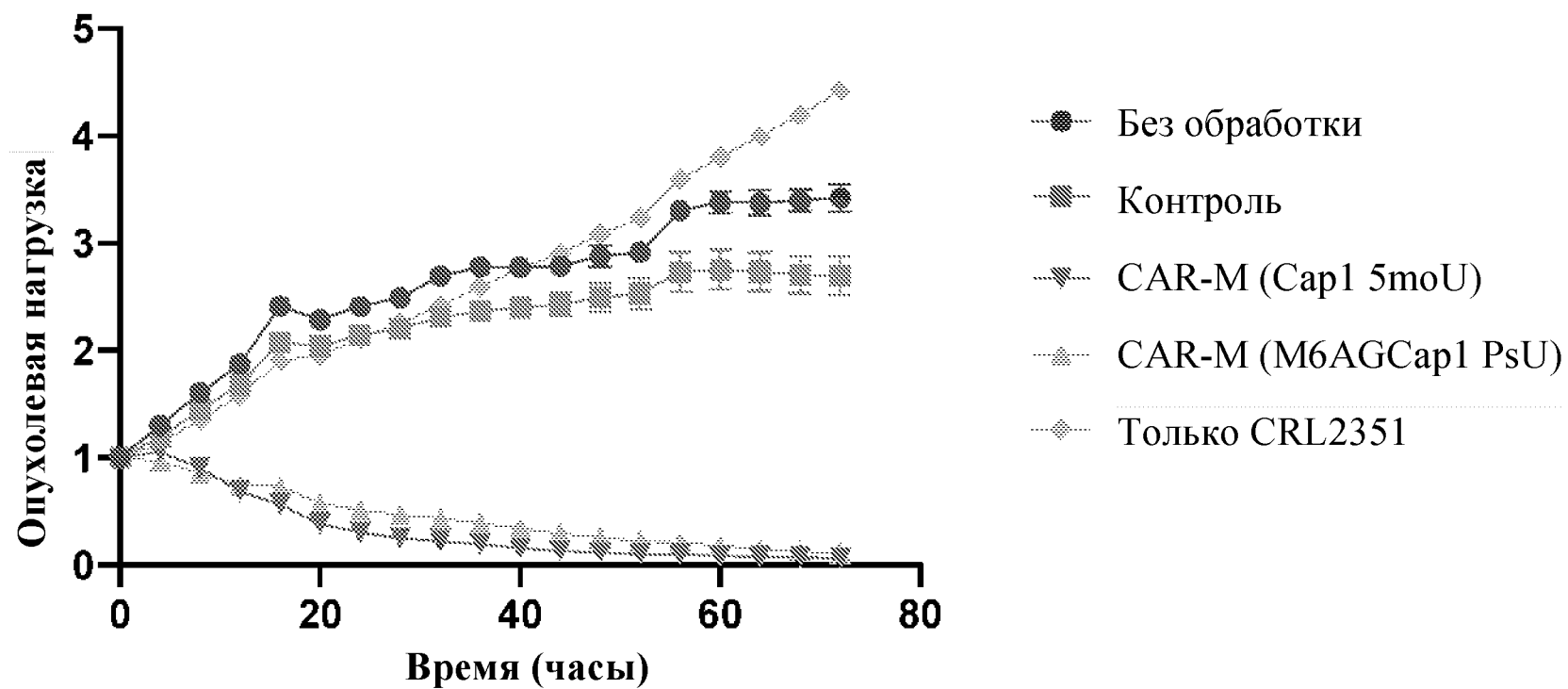
ФИГ. 2С

# Кривая роста опухоли [2 дня после ЭП]

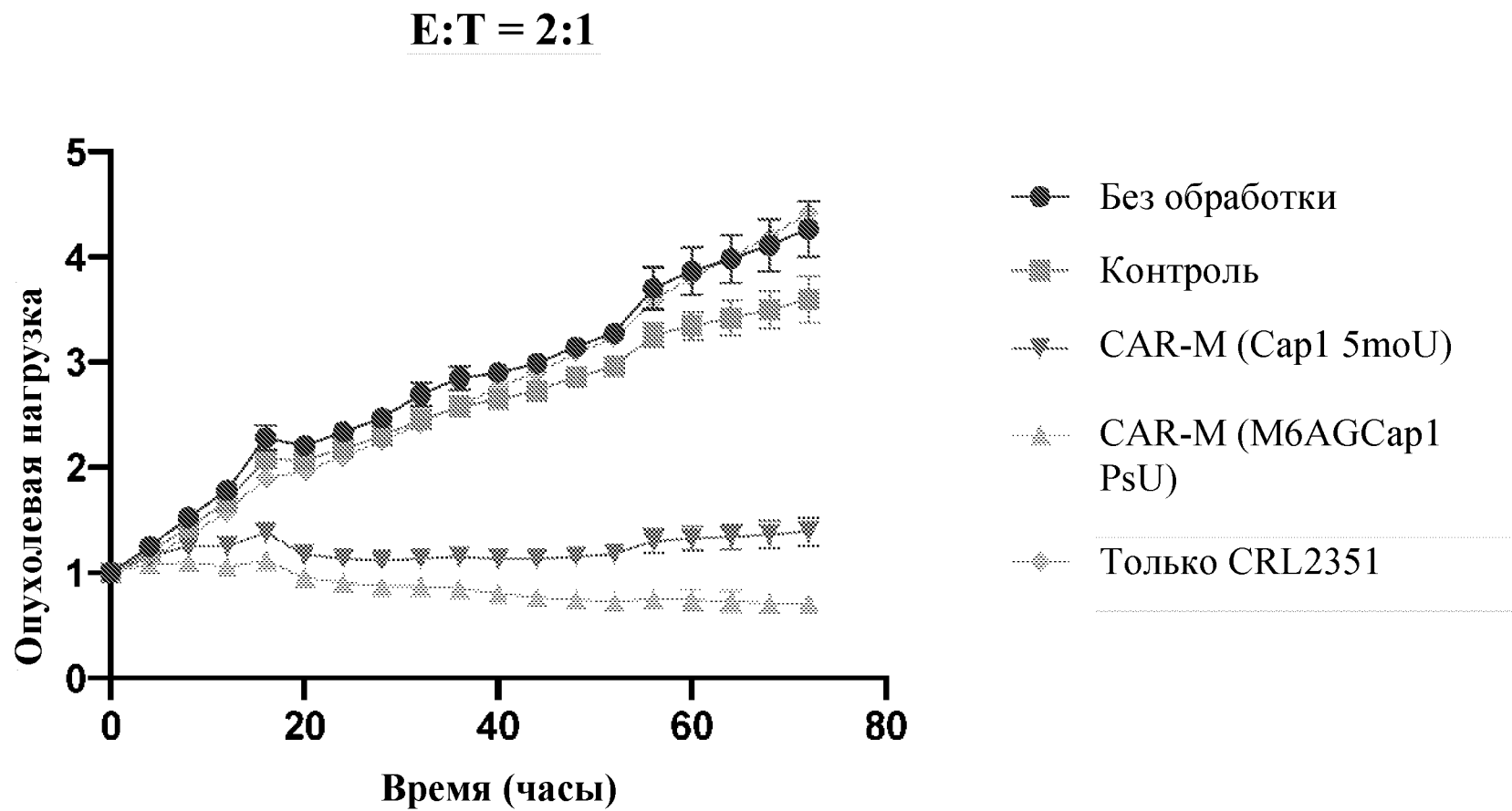


ФИГ. 3А

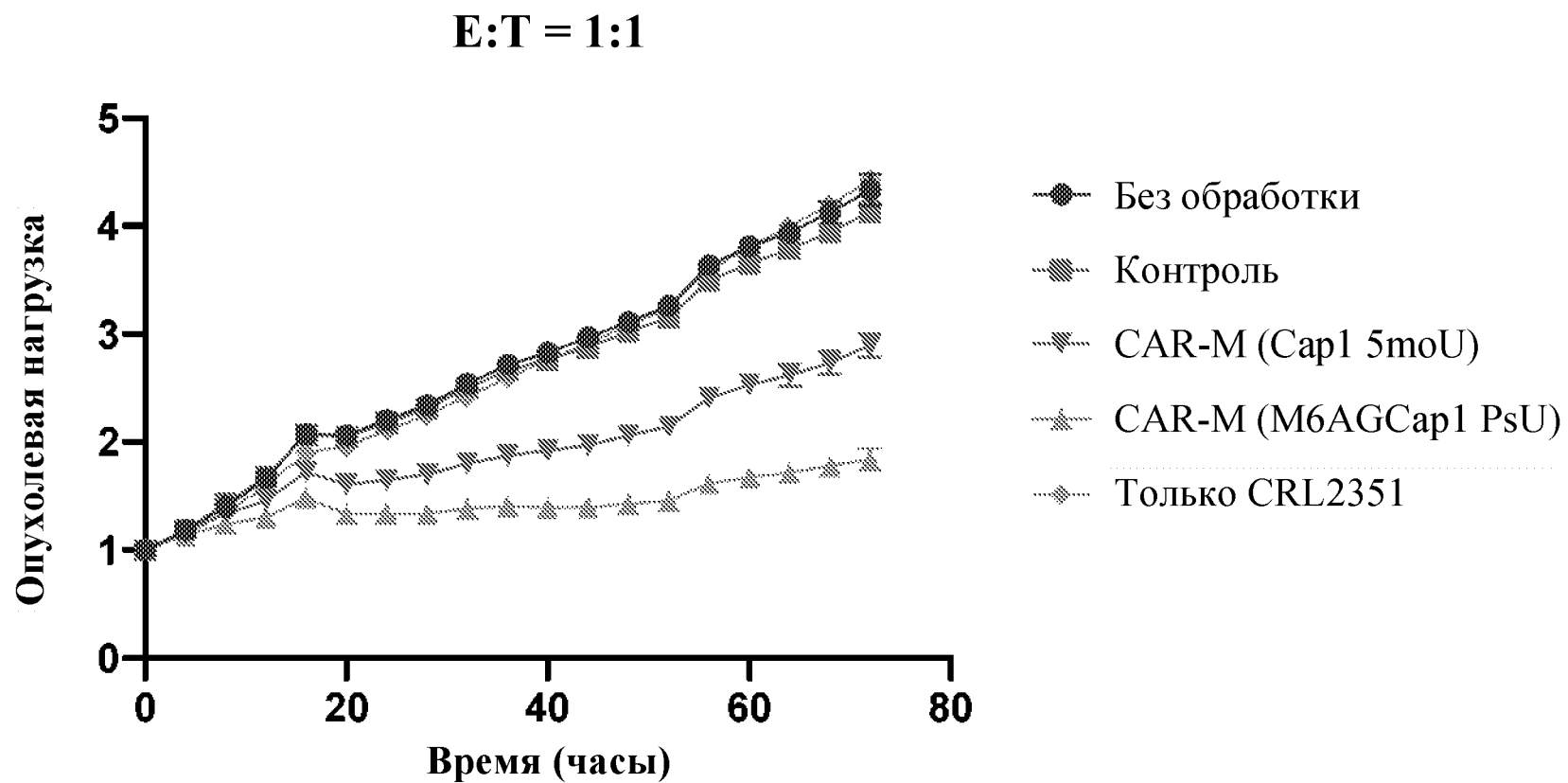
**E:T = 4:1**



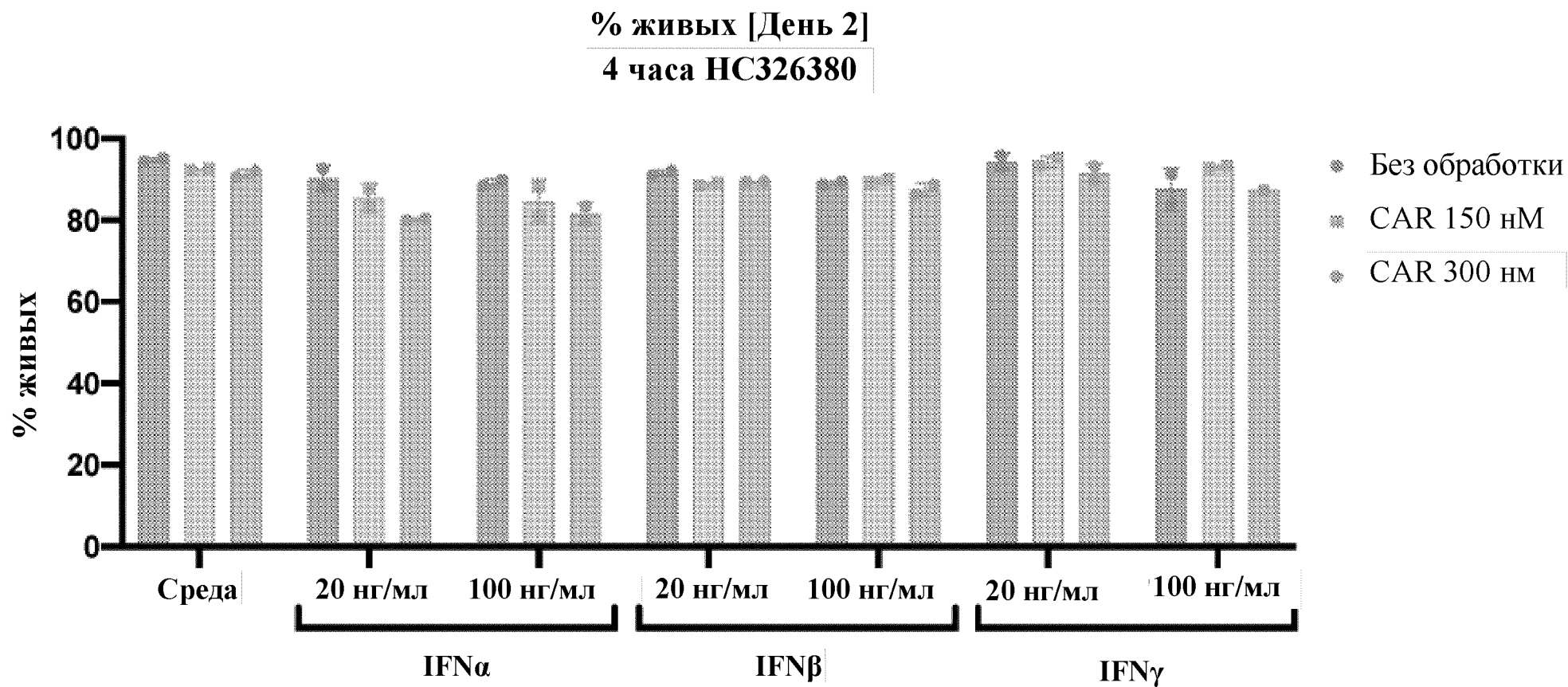
ФИГ. 3В



ФИГ. 3С

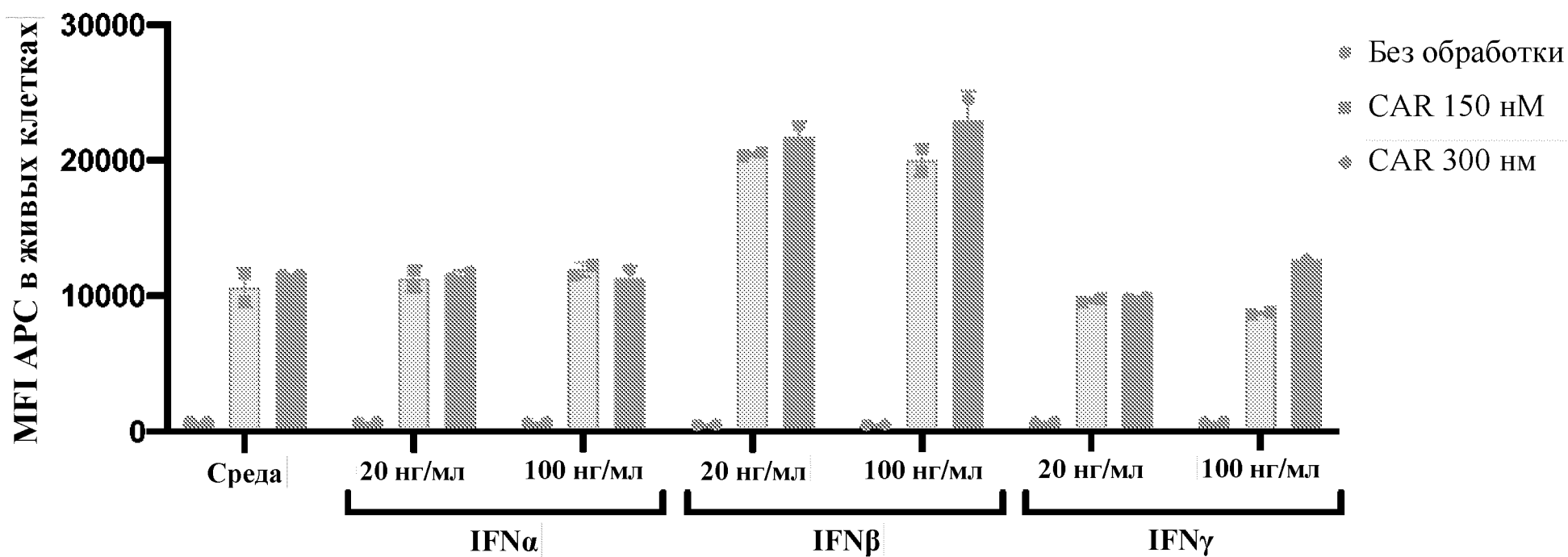


ФИГ. 3D

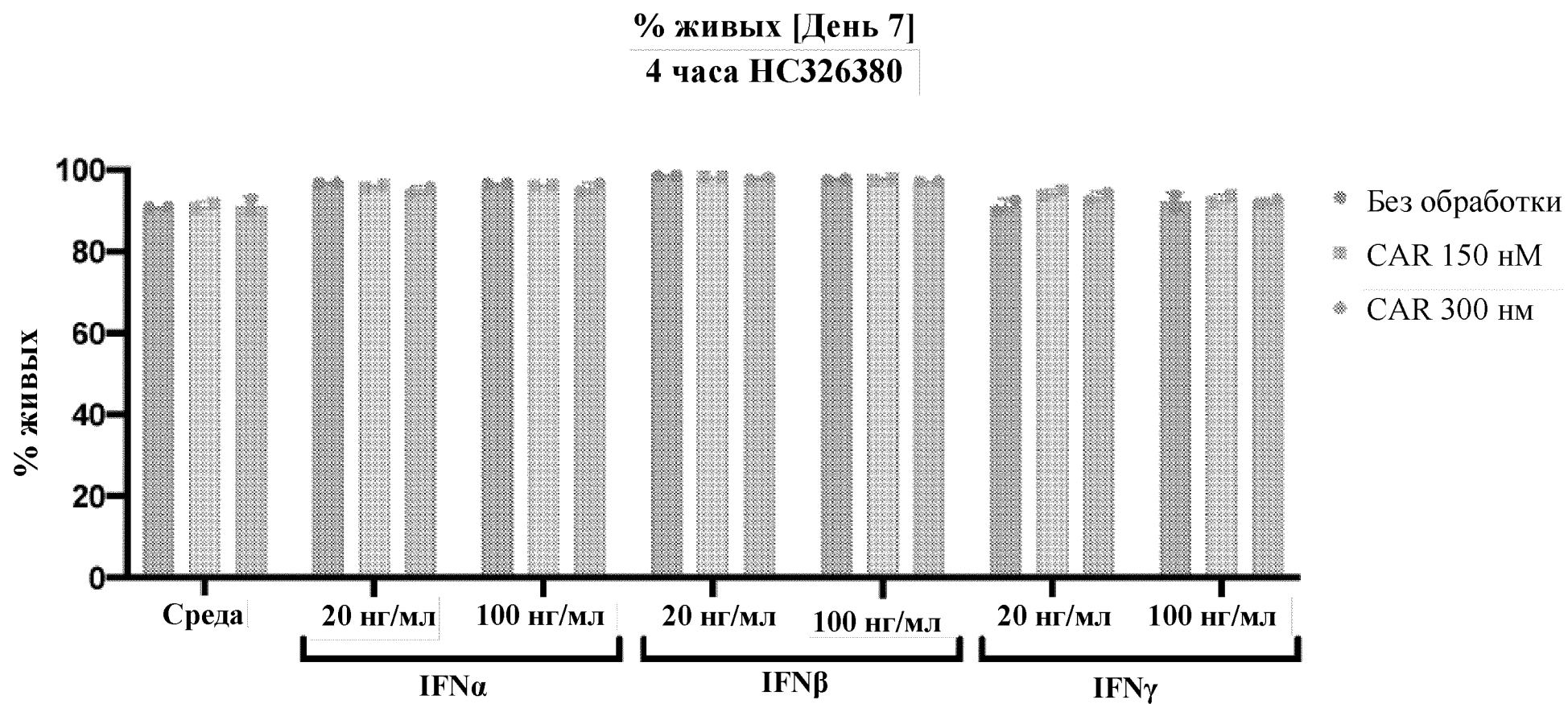


ФИГ. 4А

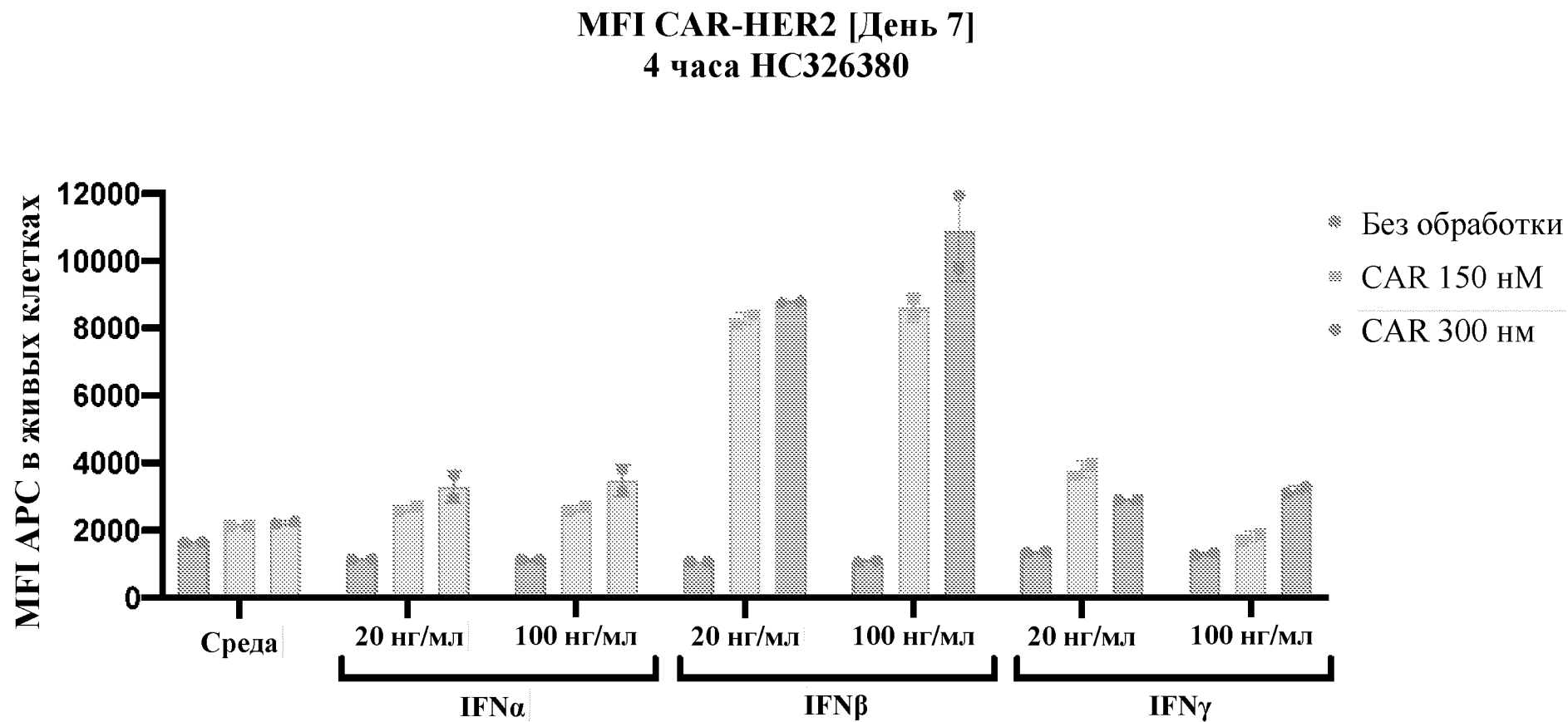
**MFI CAR-HER2 [День 2]**  
**4 часа HC326380**



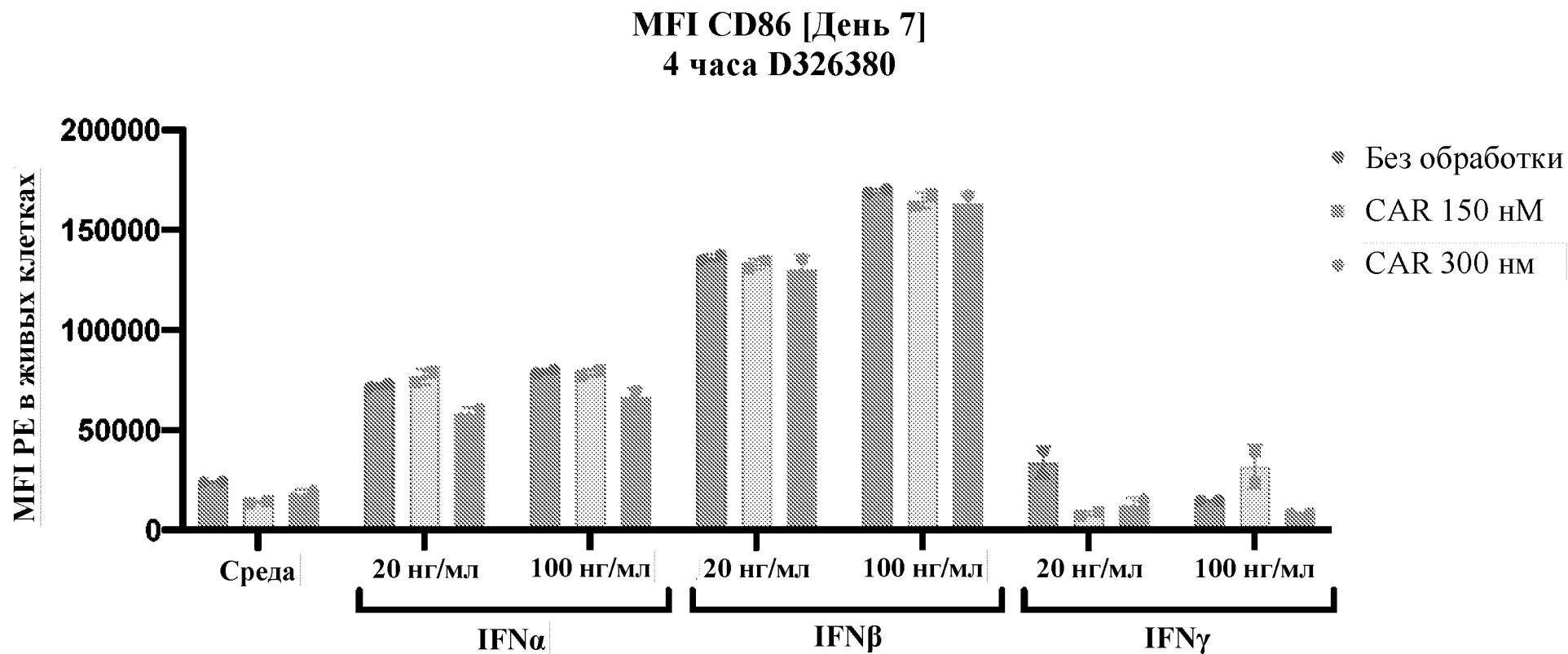
ФИГ. 4В



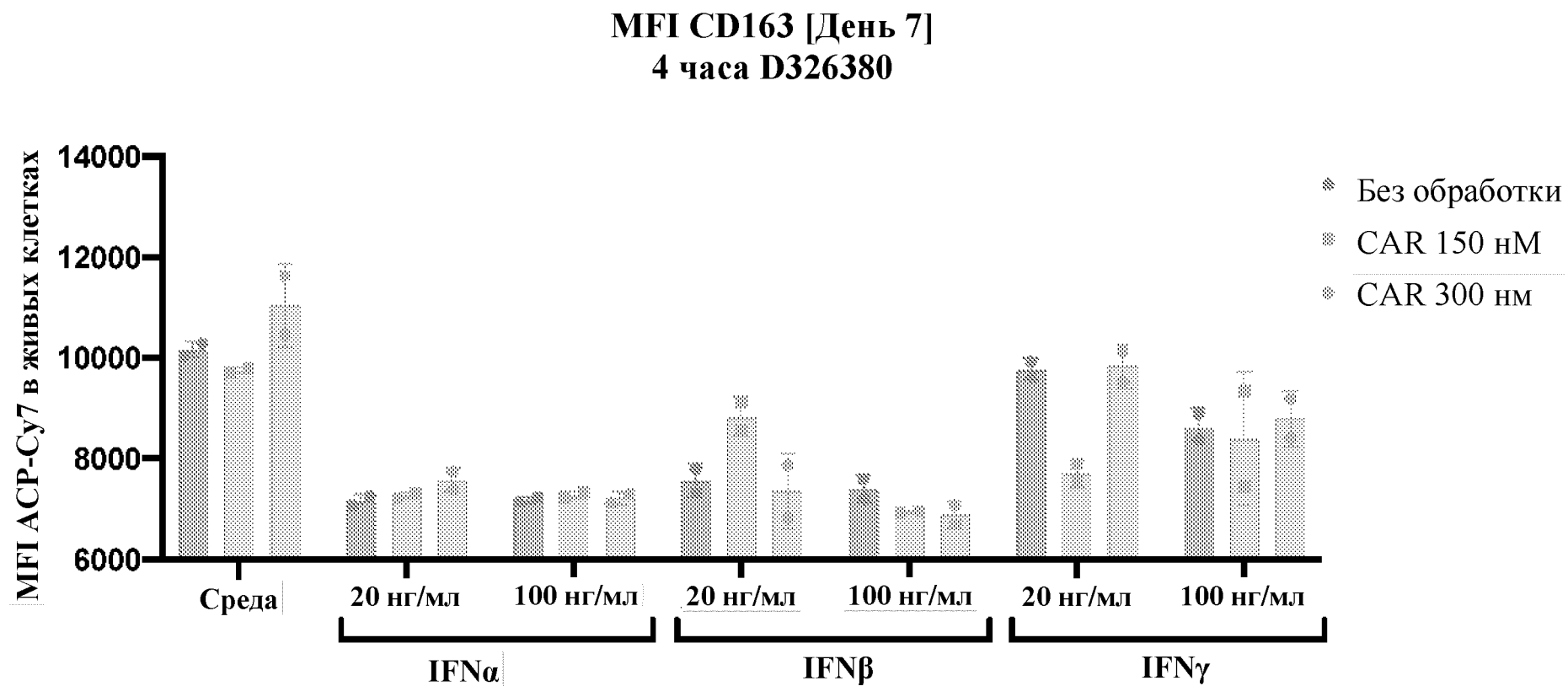
ФИГ. 4С



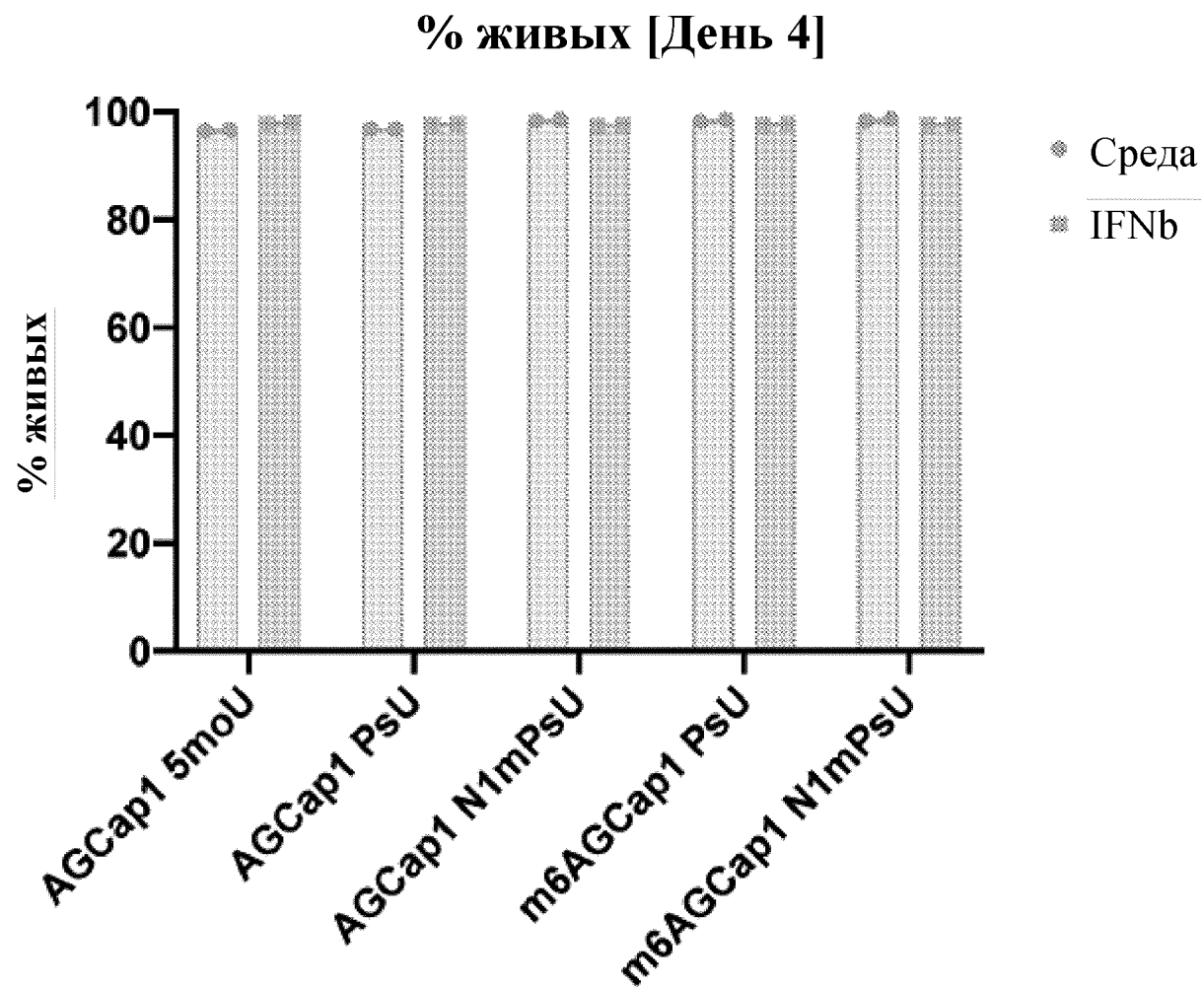
ФИГ. 4D



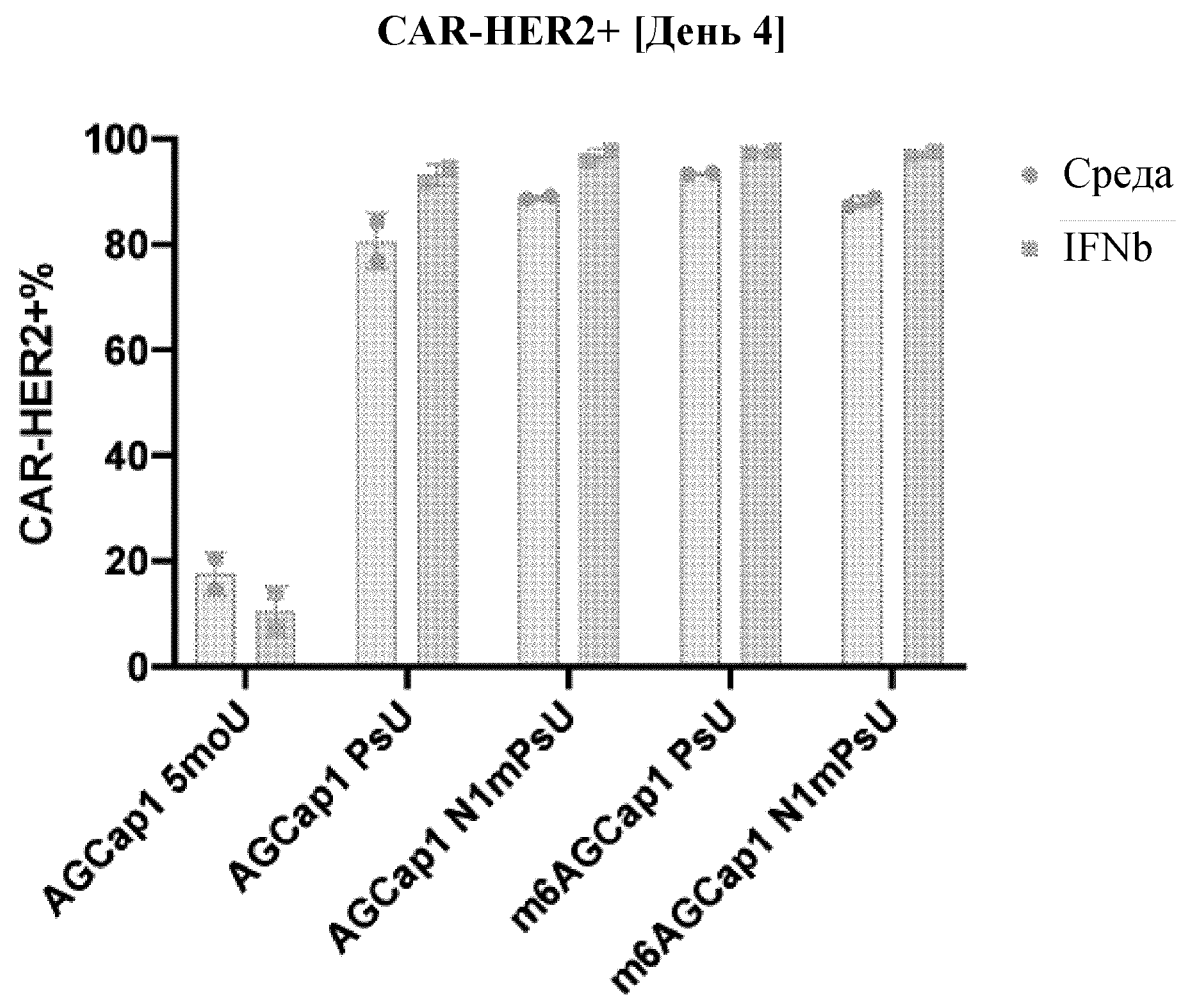
ФИГ. 4Е



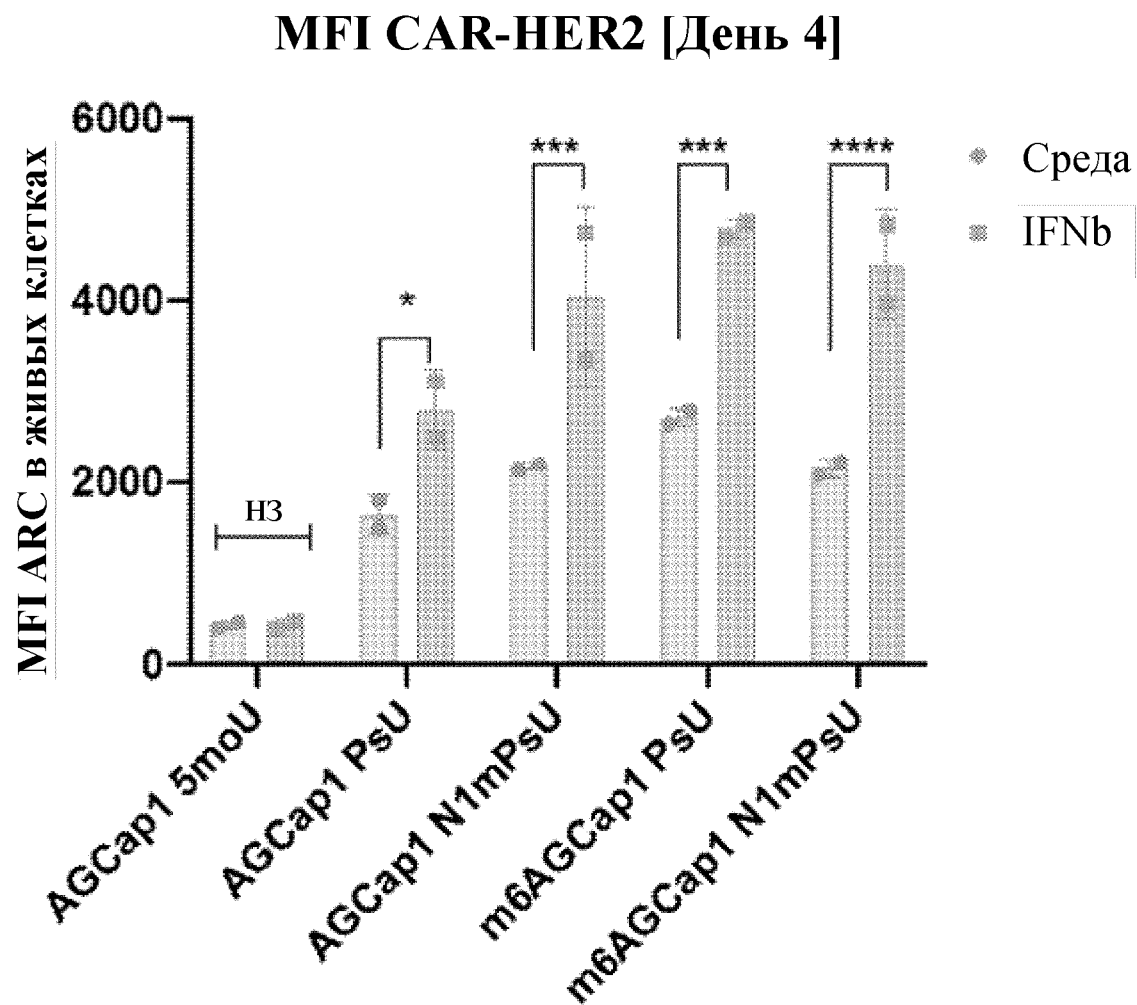
ФИГ. 4F



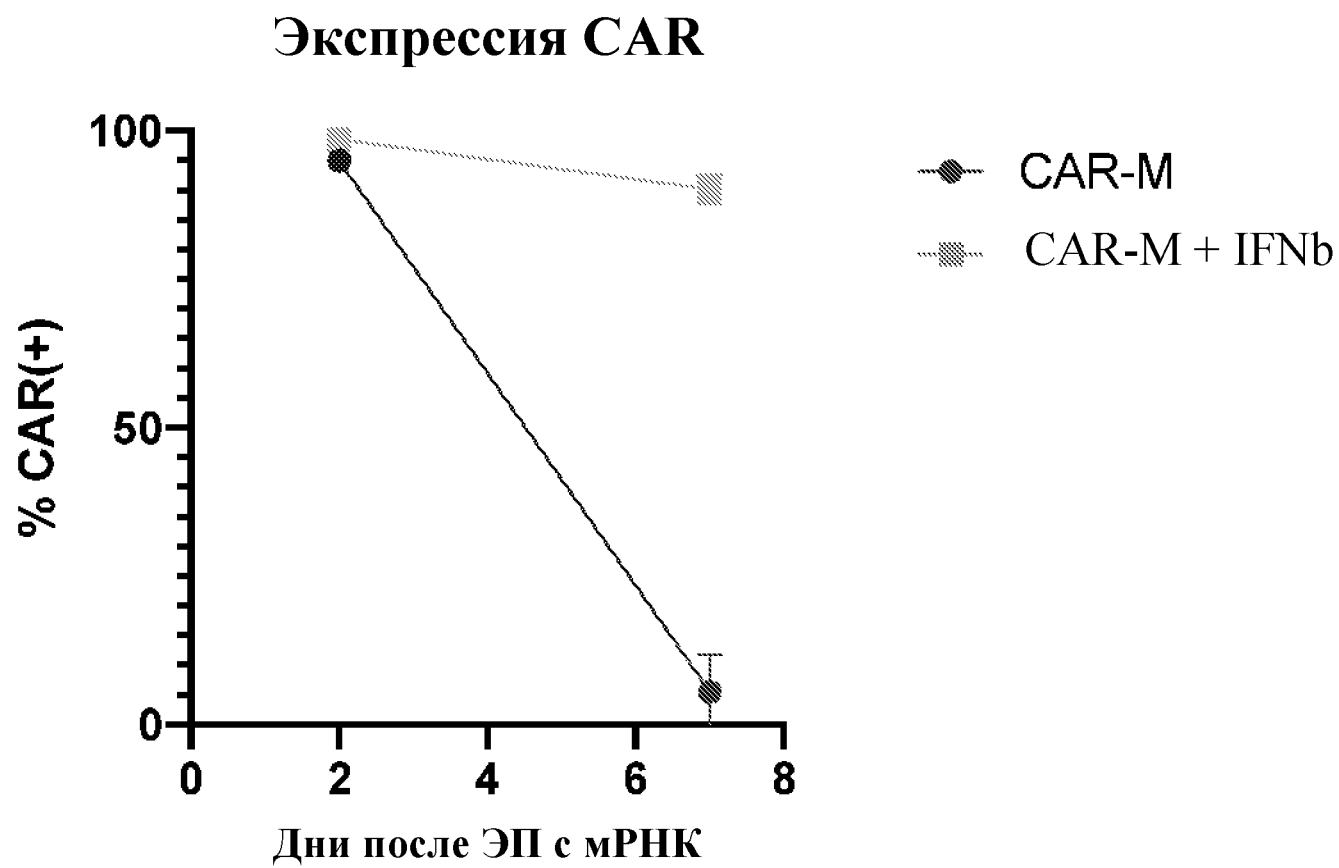
Фиг. 5А



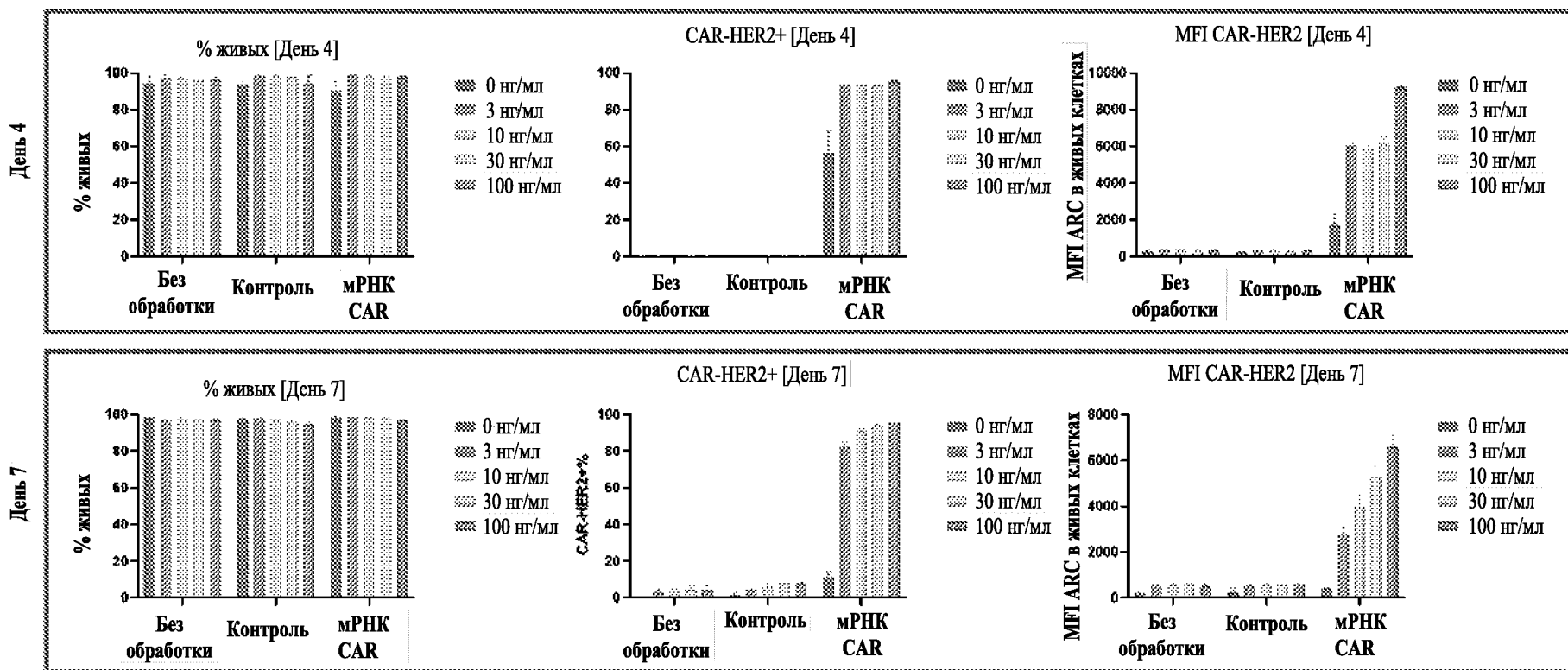
Фиг. 5В



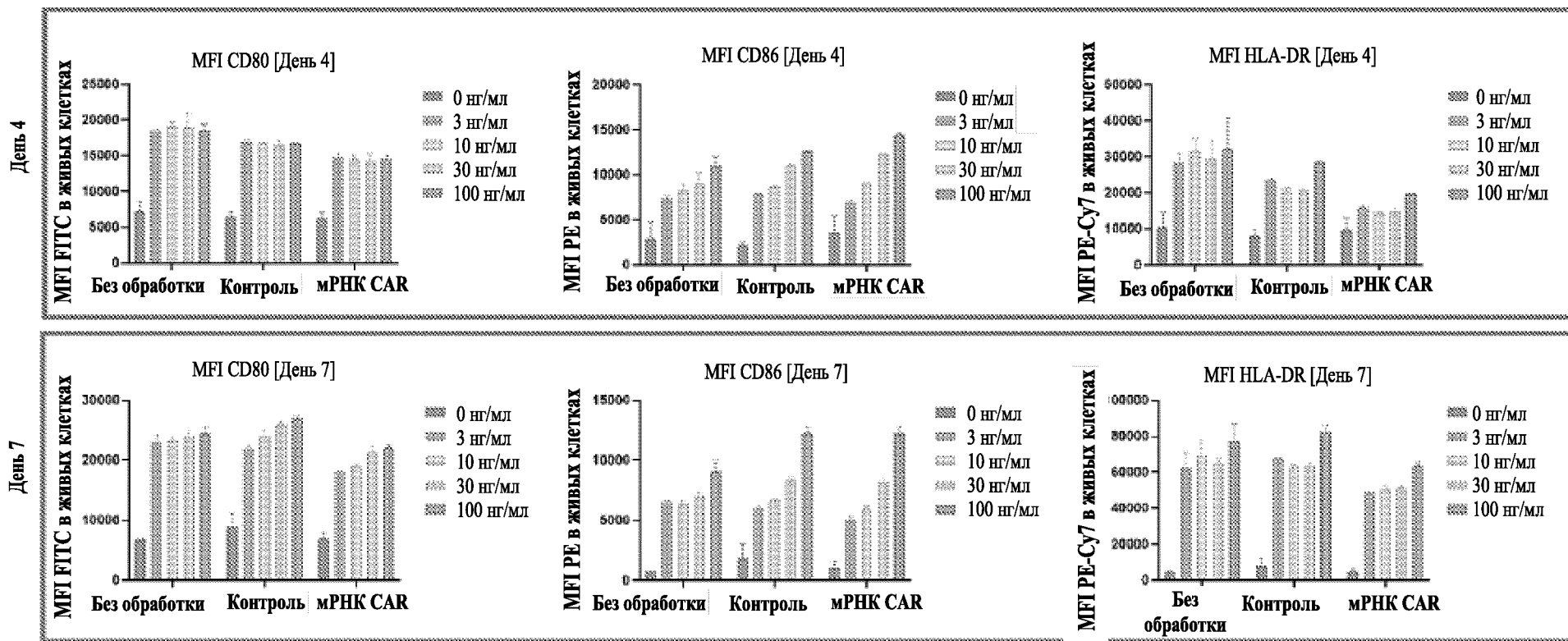
ФИГ. 5C



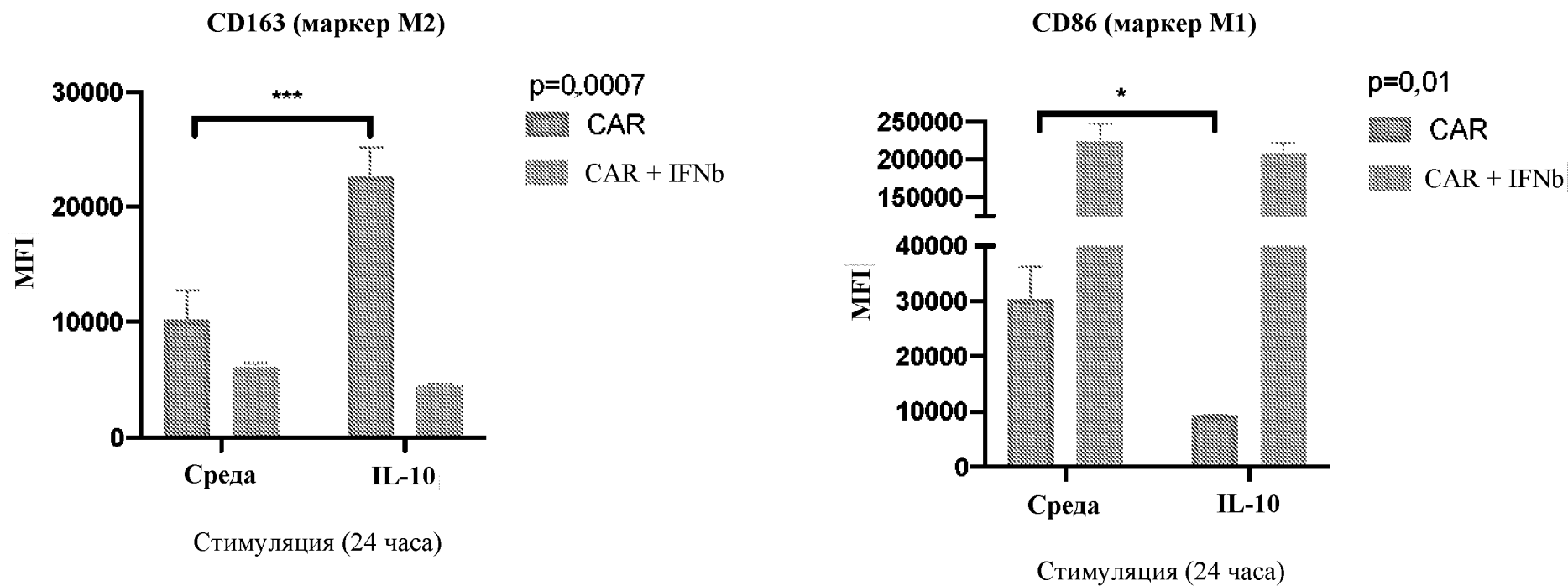
Фиг. 6



ФИГ. 7А

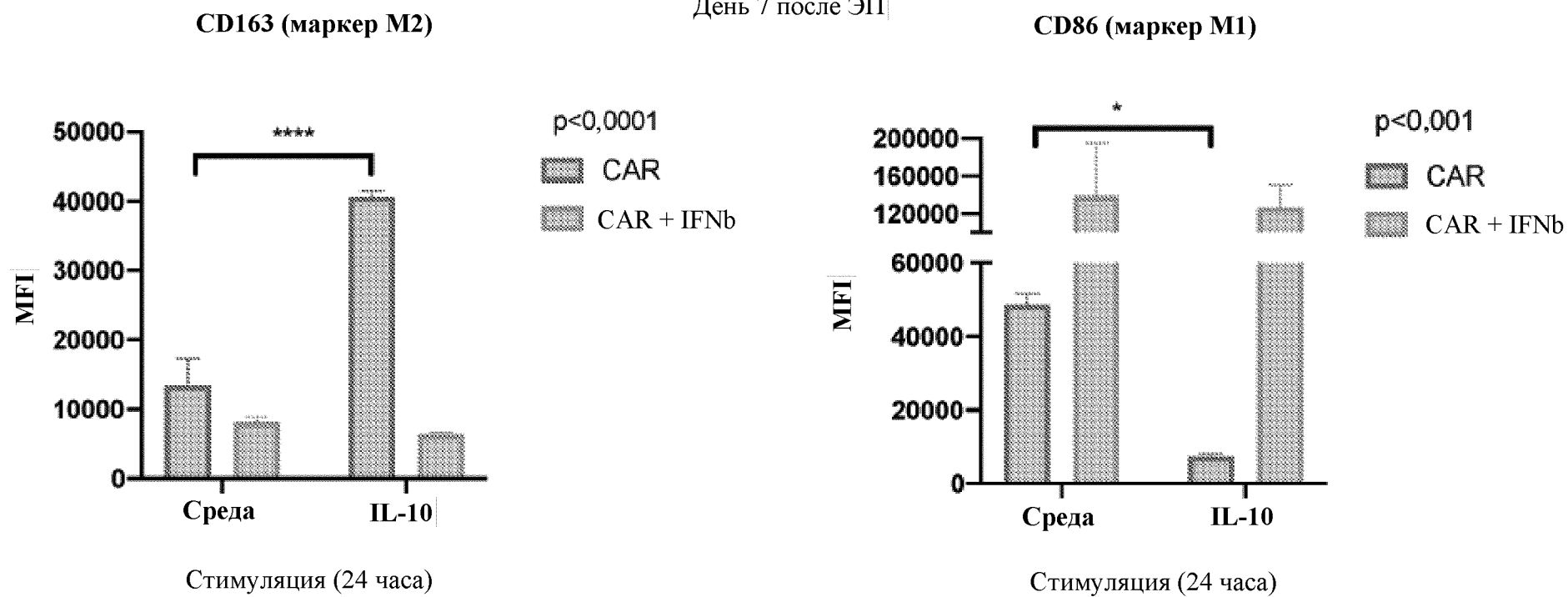


День 2 после ЭП

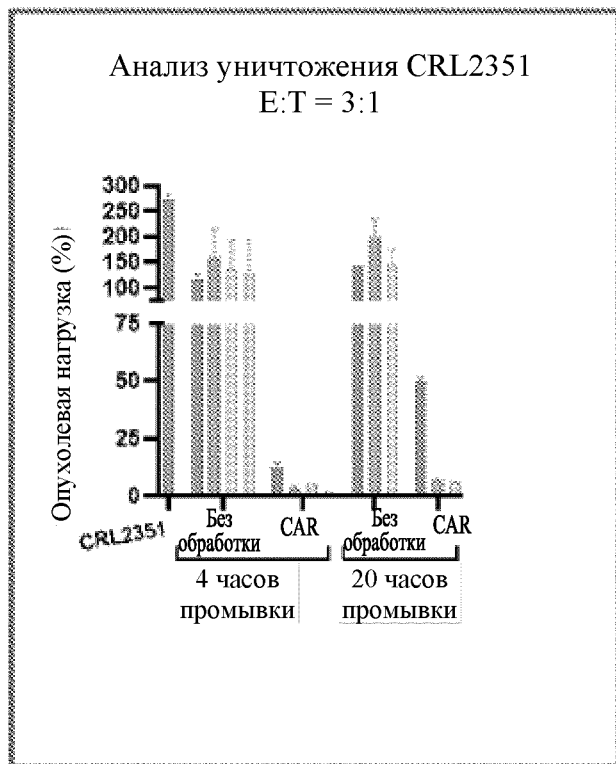


ФИГ. 8А

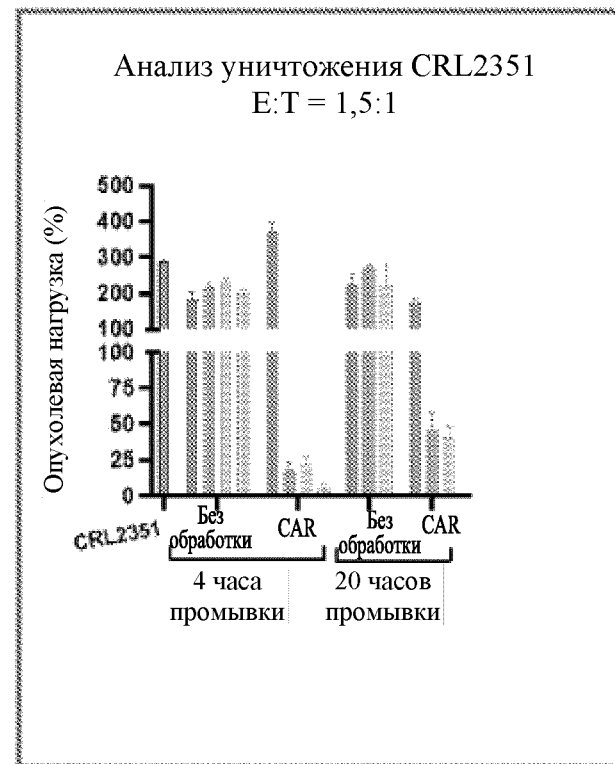
День 7 после ЭП



Фиг. 8B



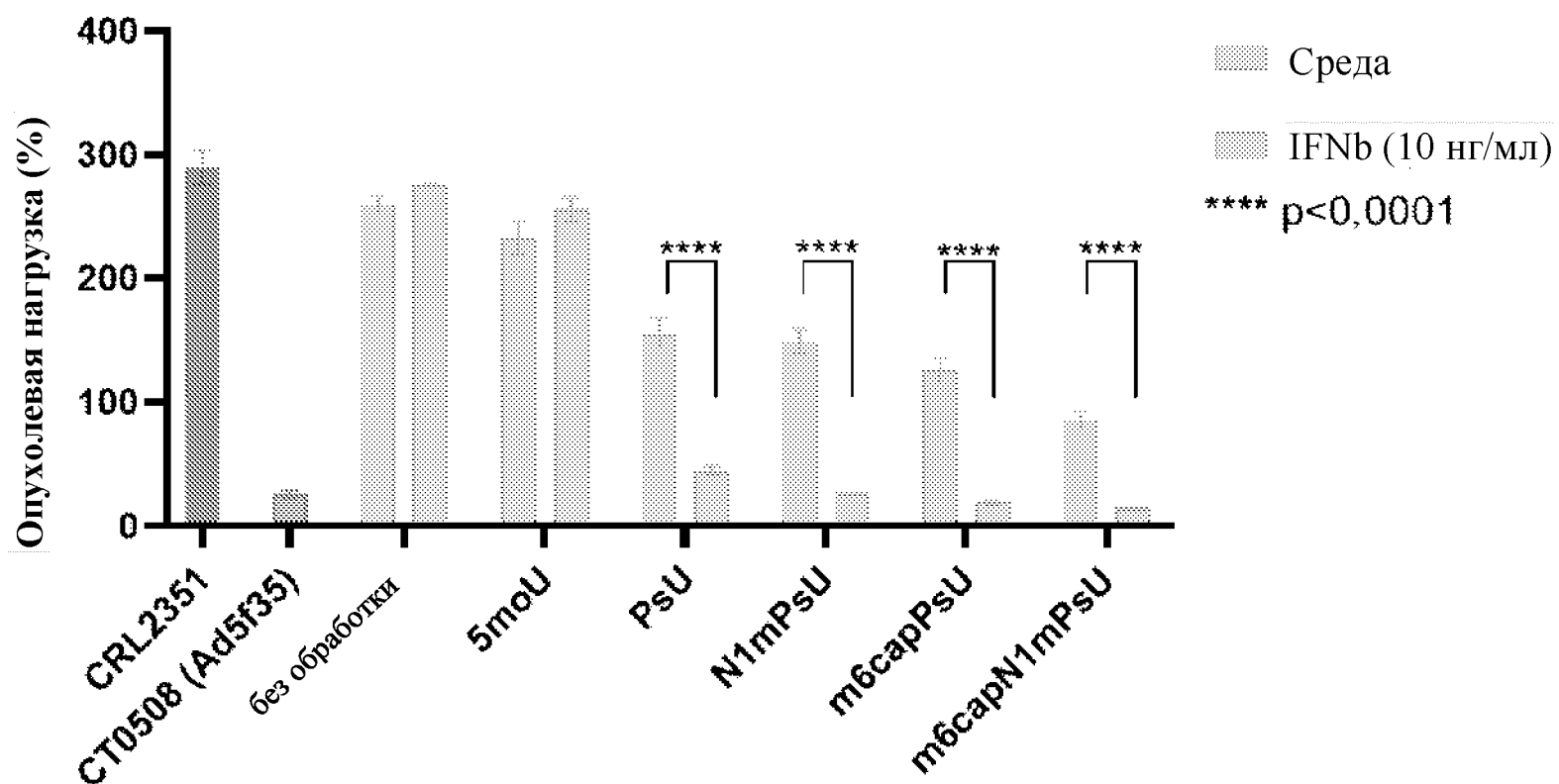
0 нг/мл IFNб  
3 нг/мл IFNб  
10 нг/мл IFNб  
30 нг/мл IFNб  
CRL2351



0 нг/мл IFNб  
3 нг/мл IFNб  
10 нг/мл IFNб  
30 нг/мл IFNб  
CRL2351

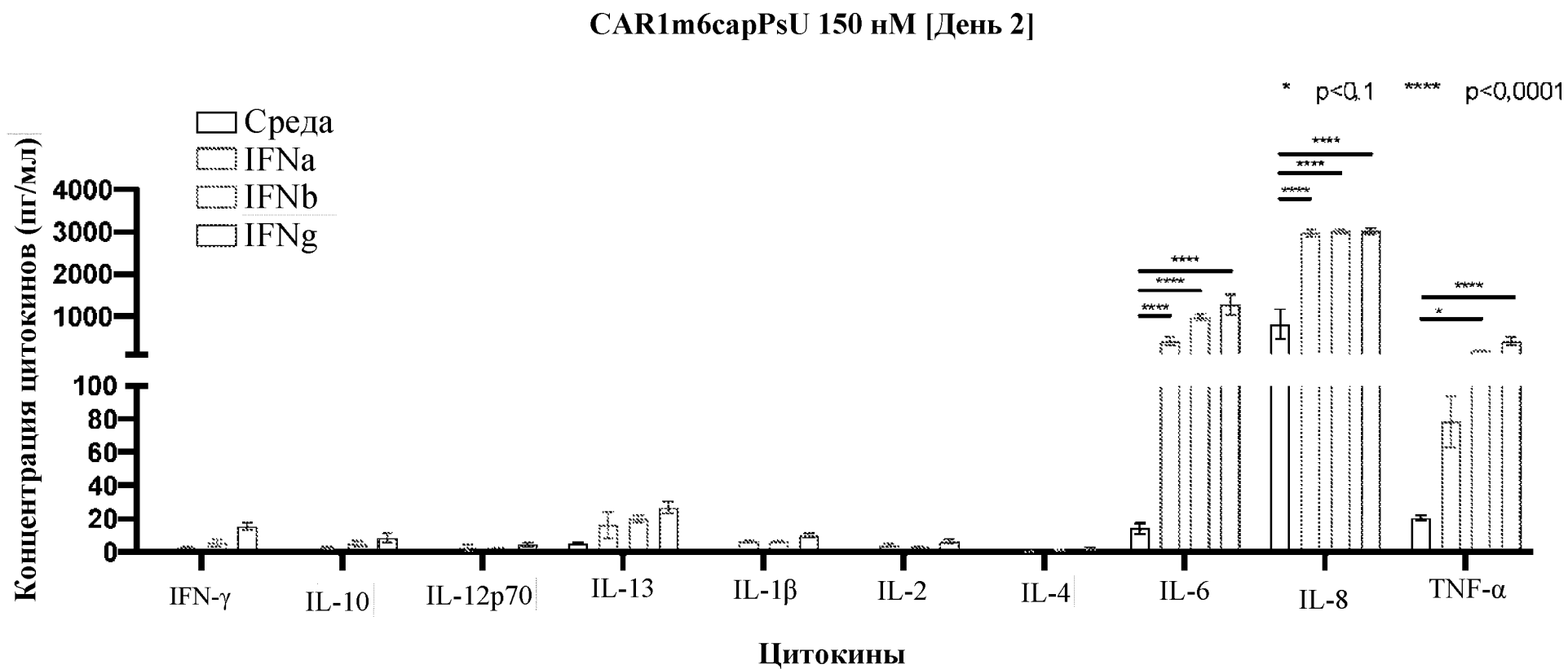
ФИГ. 9А

## Анализ уничтожения CRL2351 через 48 часов

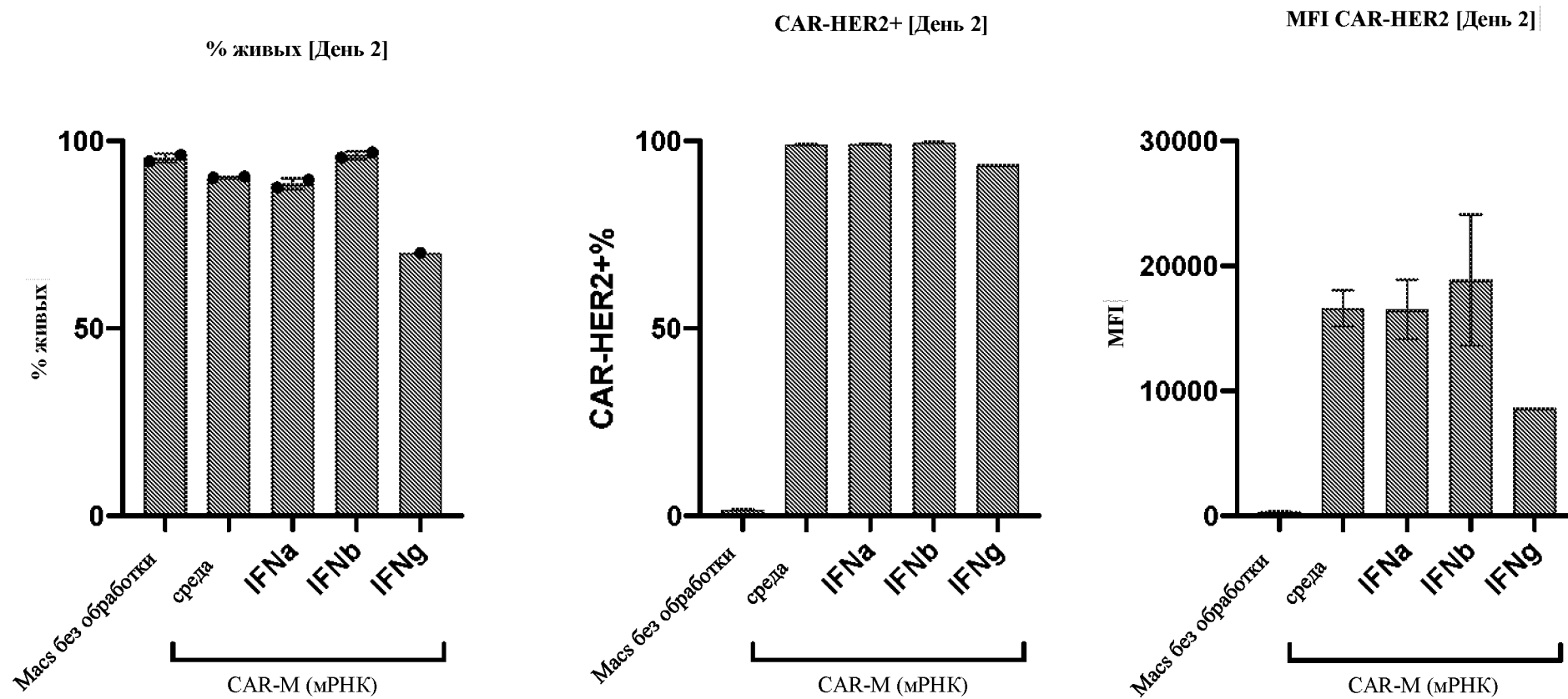


ФИГ. 9В



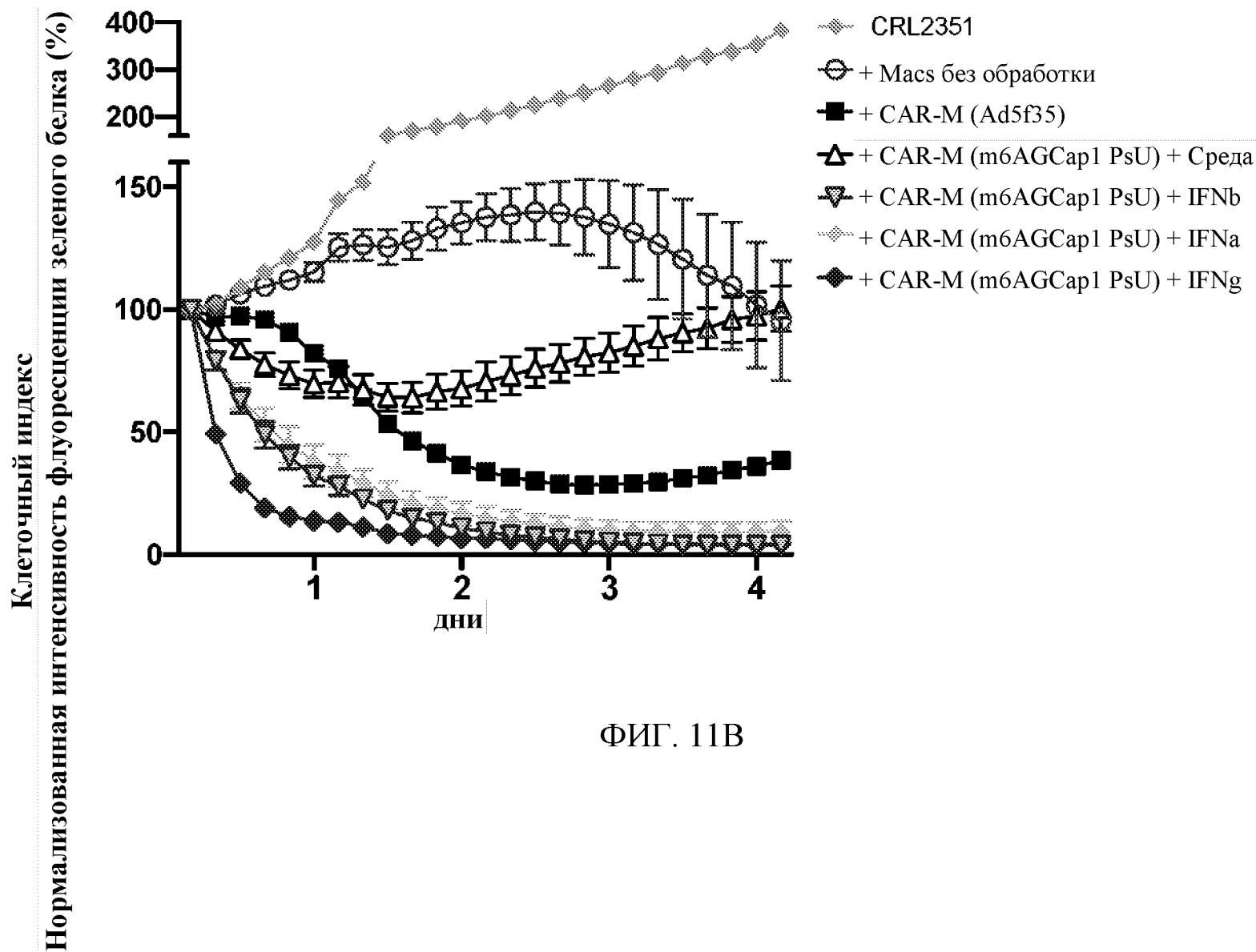


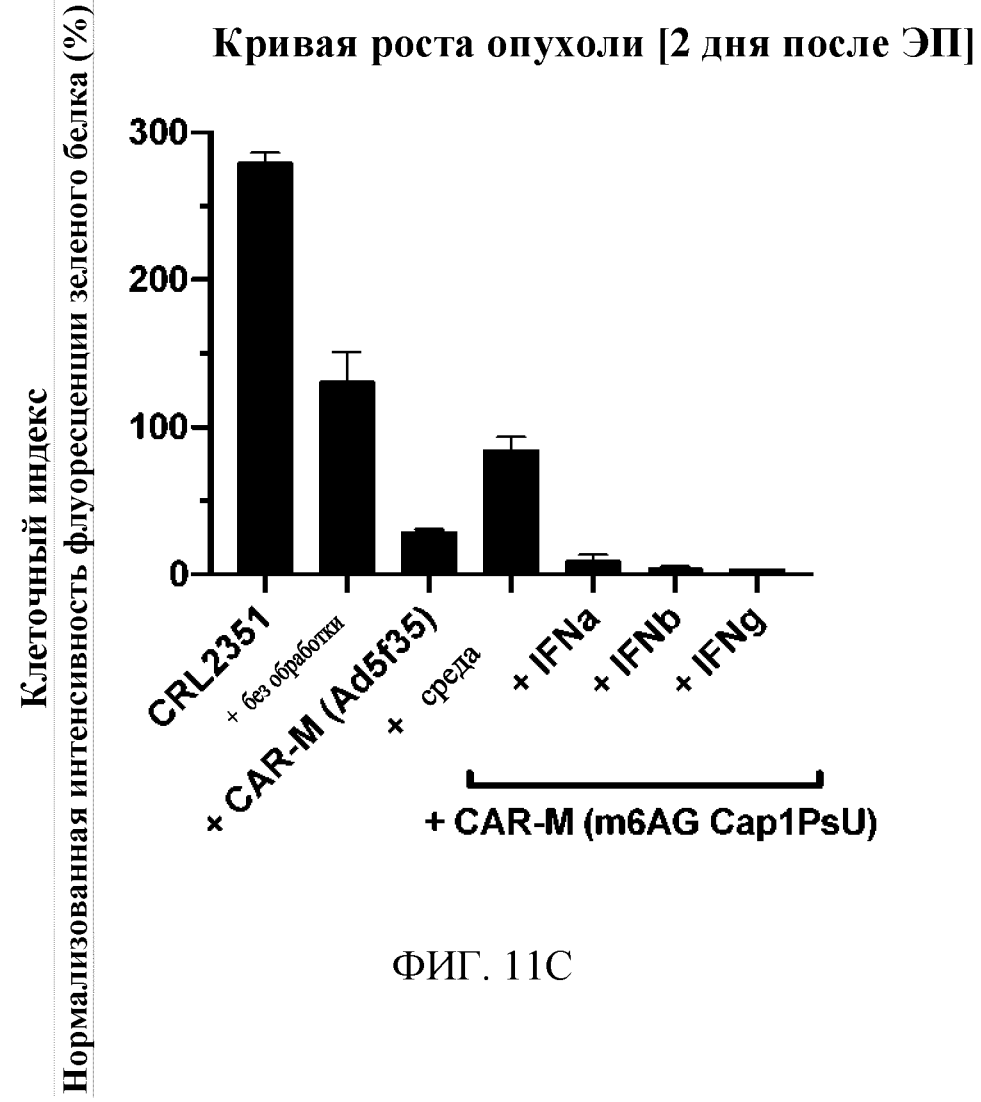
Фиг. 10

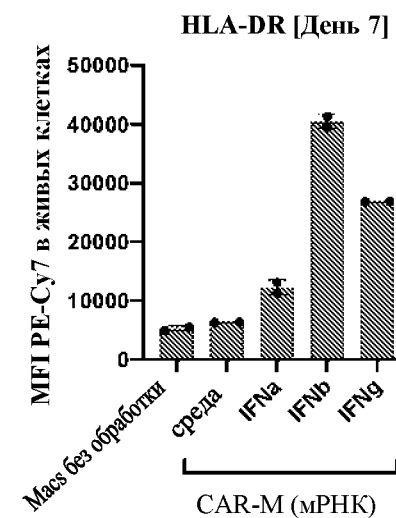
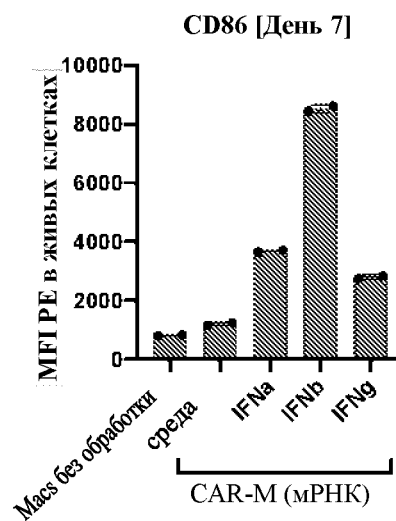
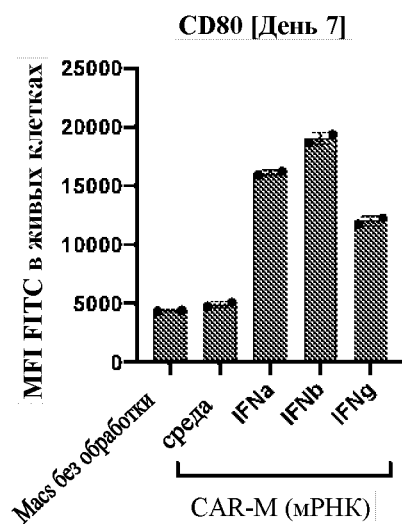
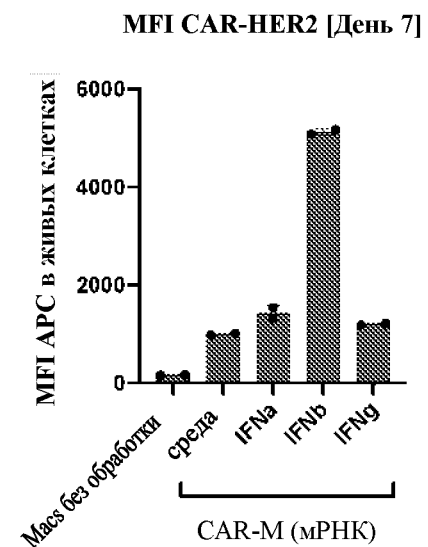
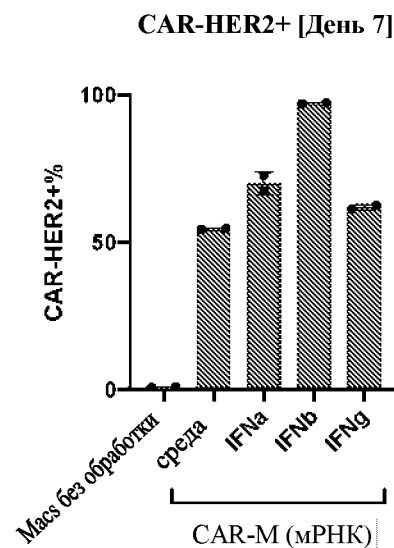
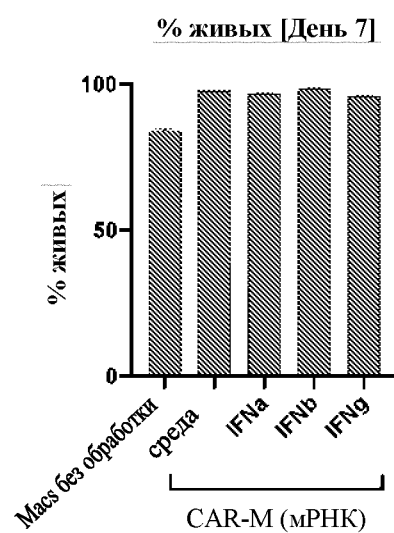


ФИГ. 11А

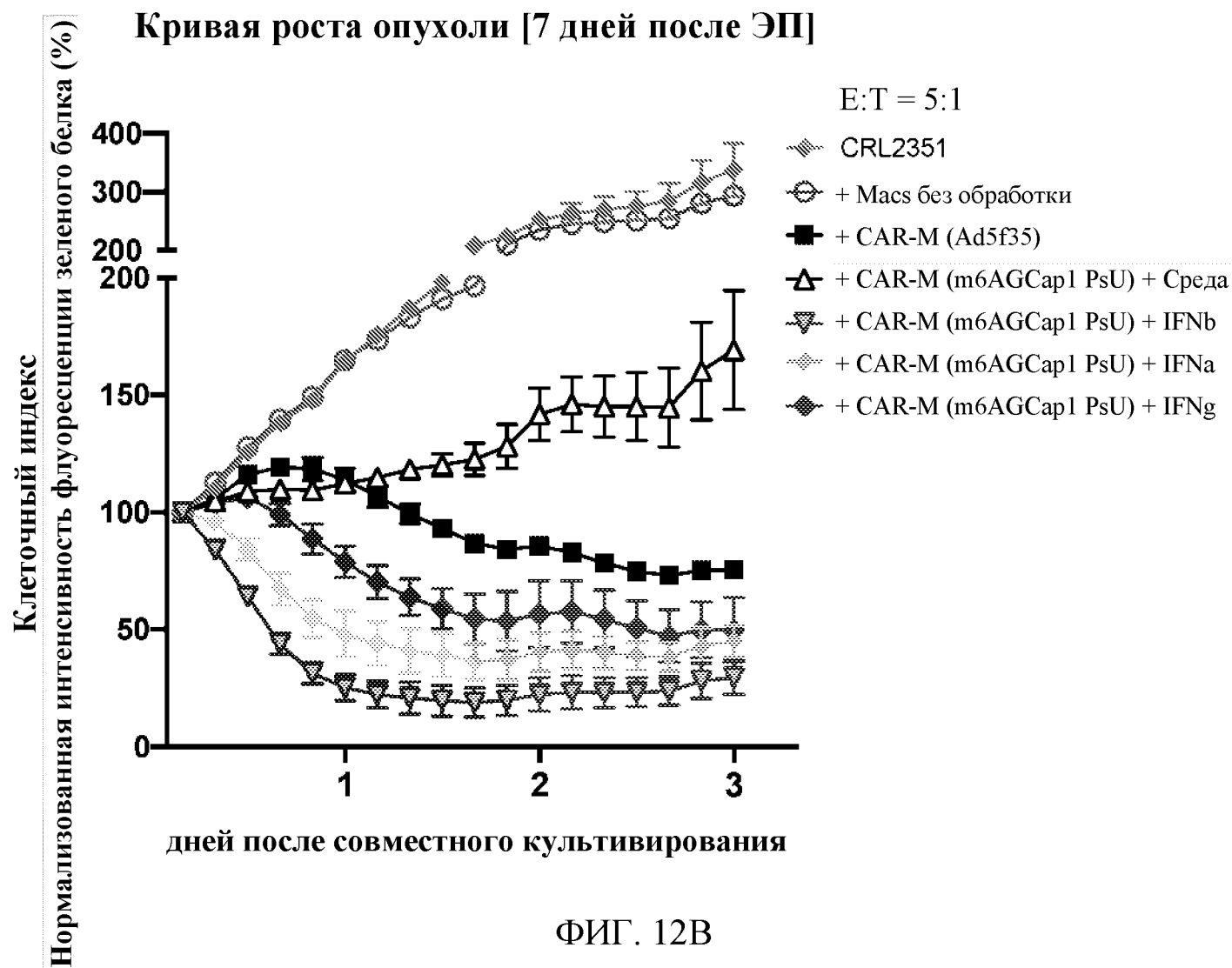
Кривая роста опухоли [2 дня после ЭП]





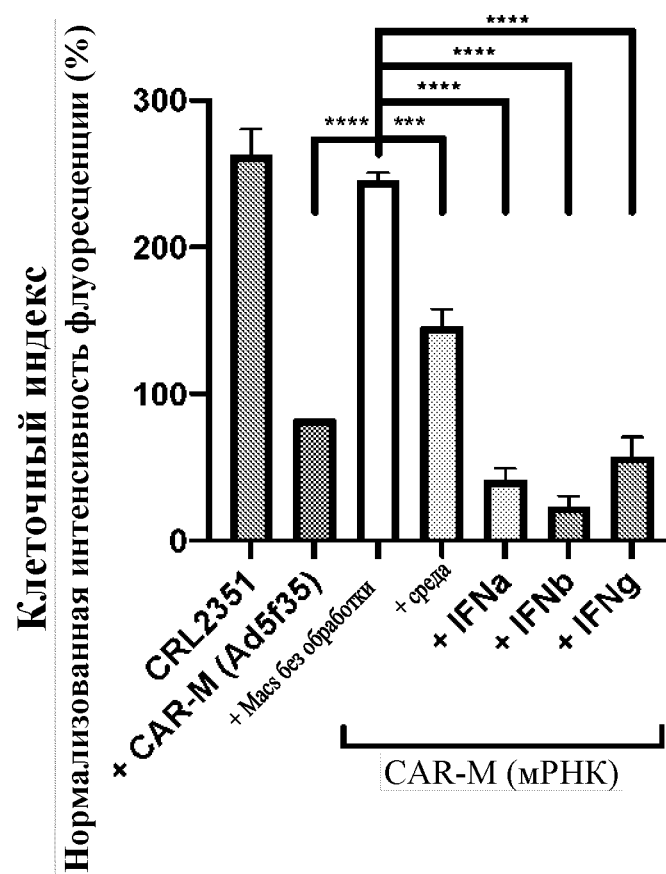


ФИГ. 12А

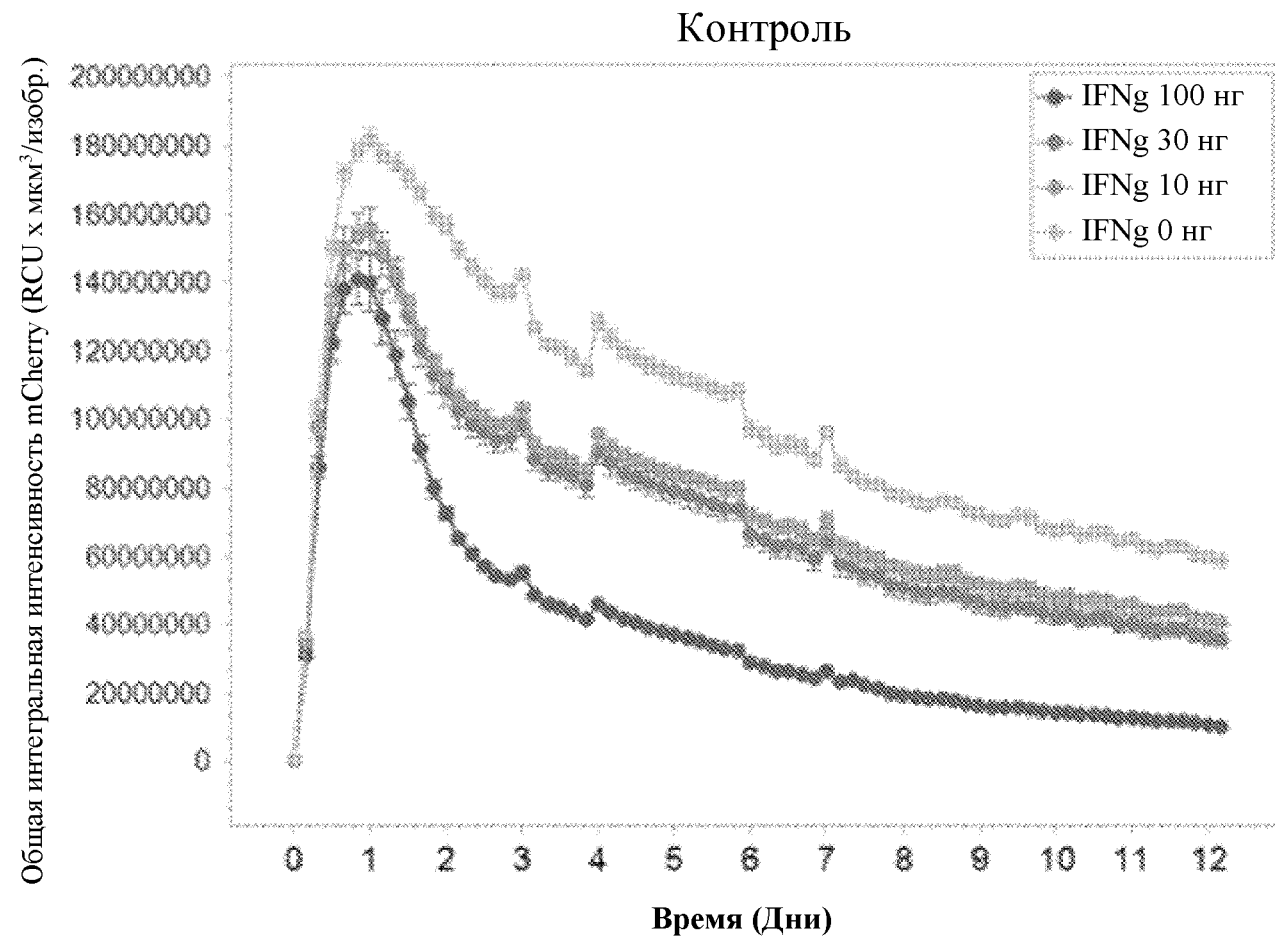


Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA)\*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p = 0,0002$

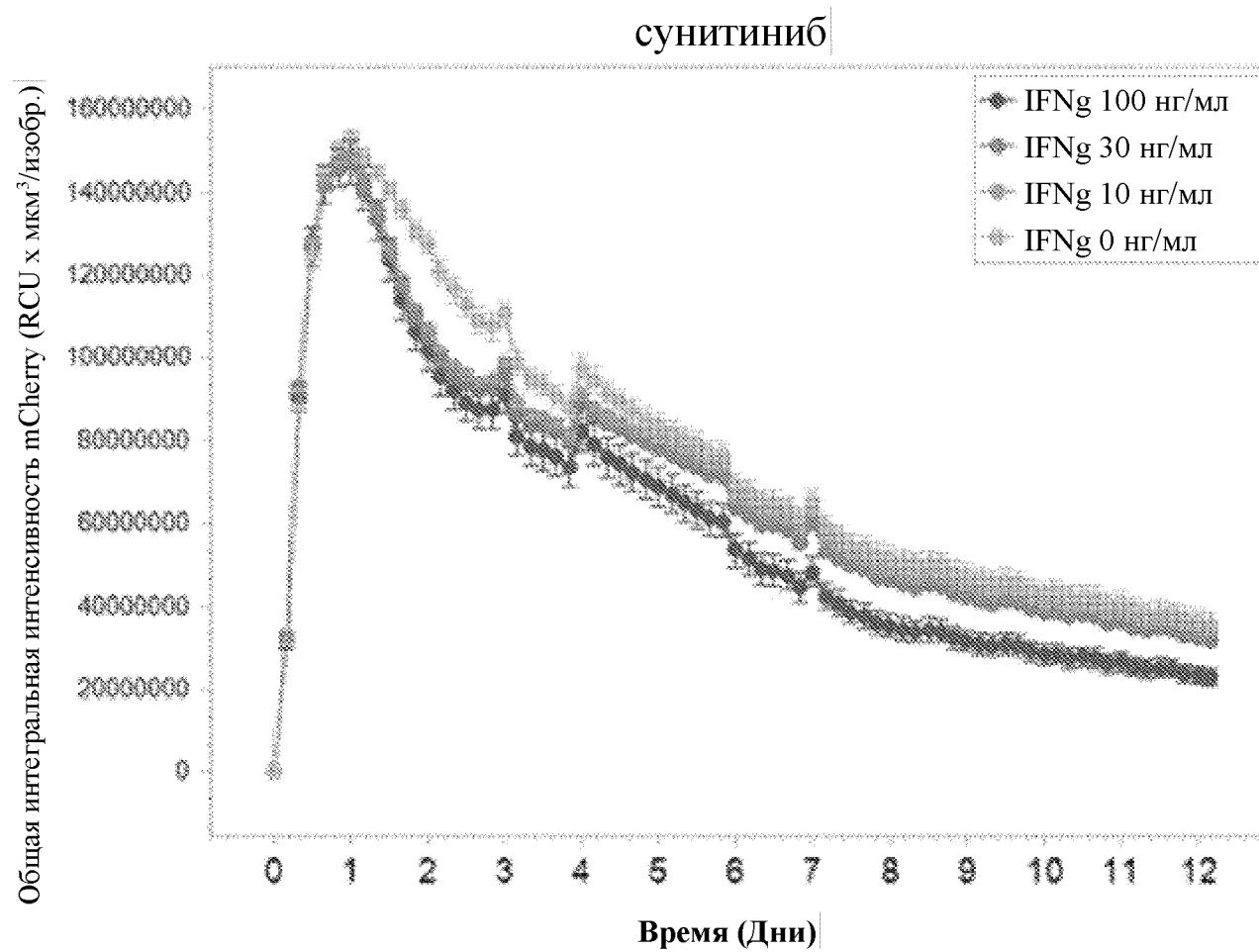
Активность уничтожения опухолей [7 дней]



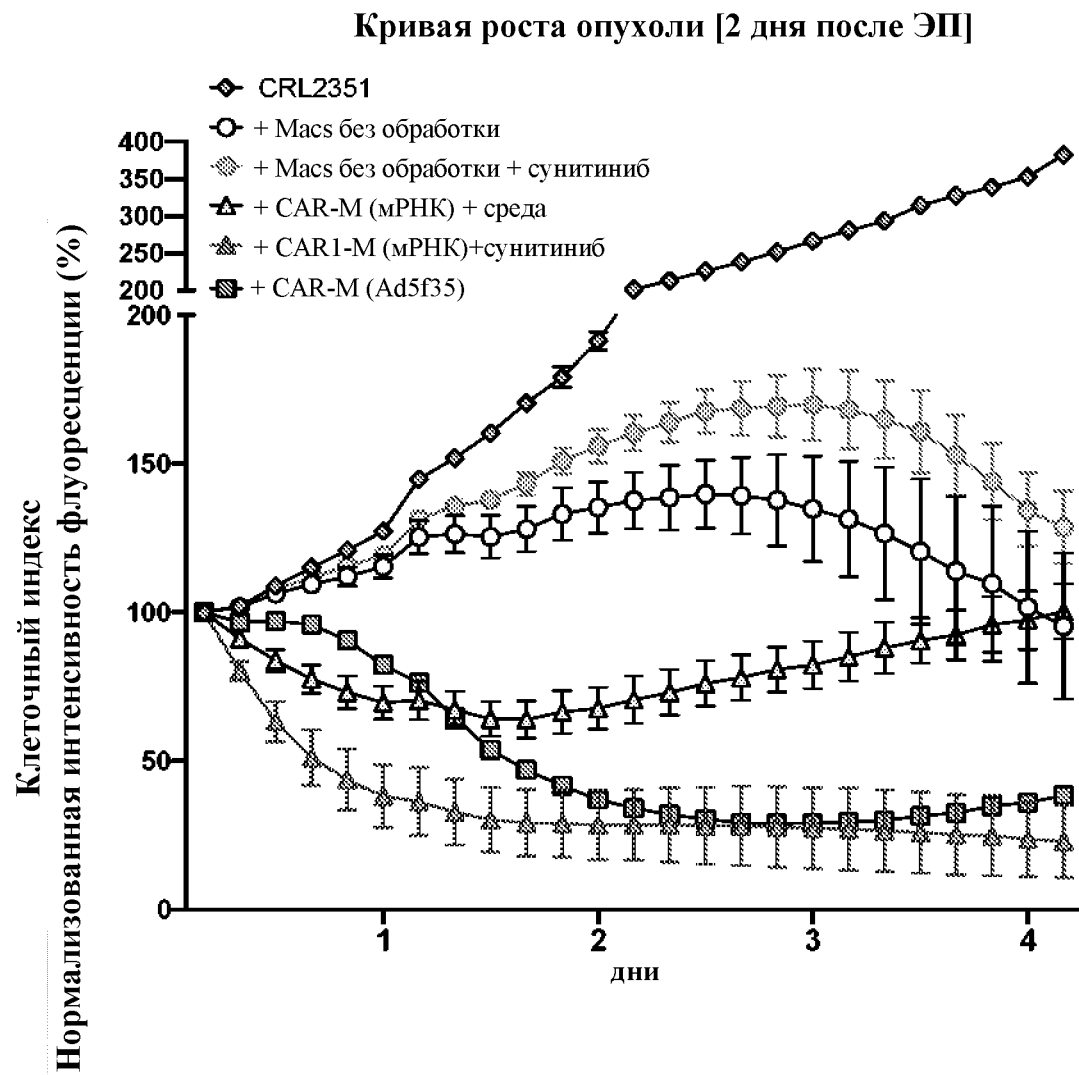
ФИГ. 12С



Фиг. 13



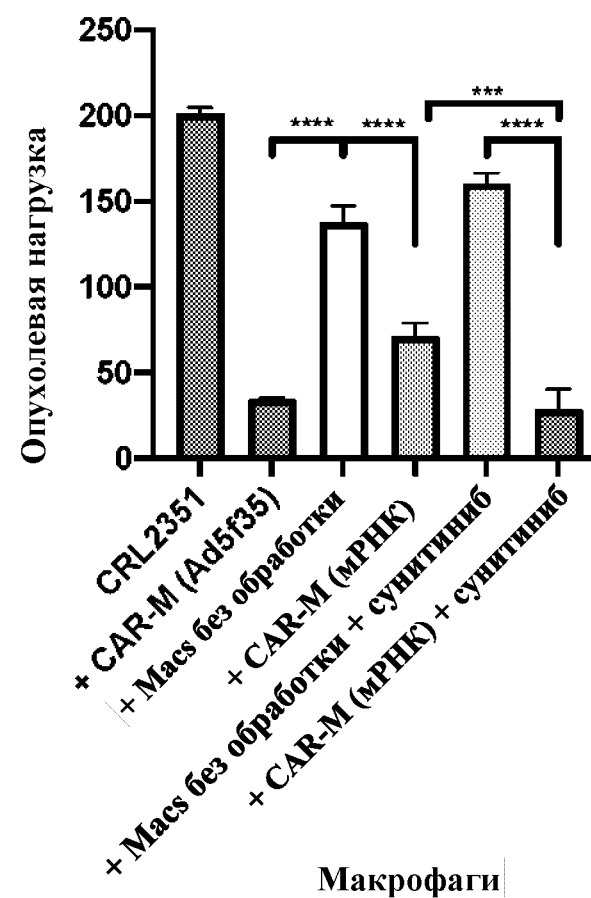
ФИГ. 14А



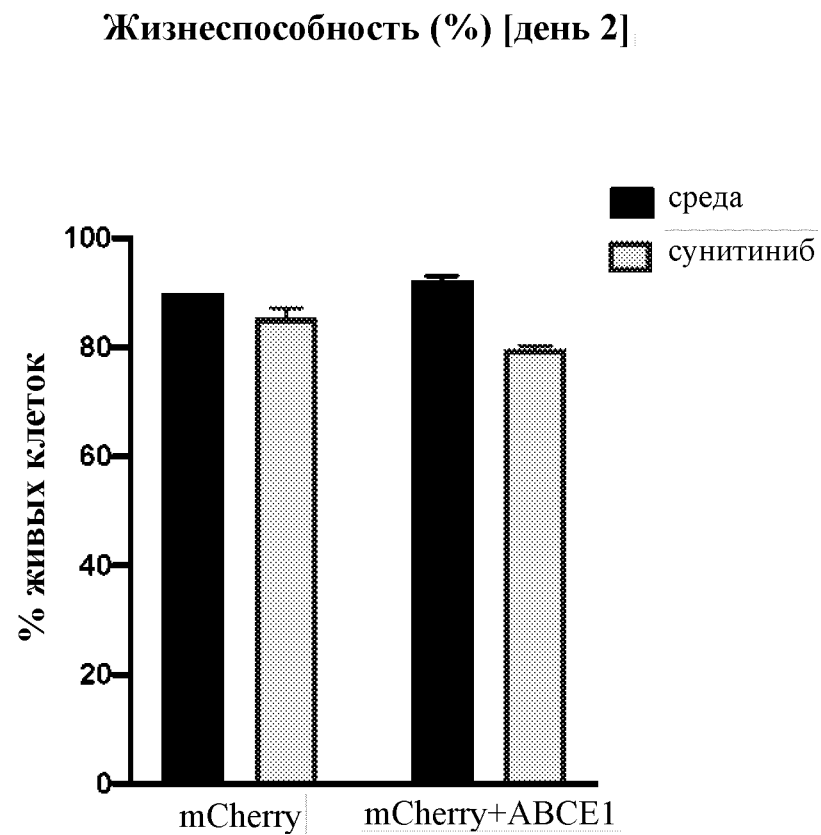
ФИГ. 14В

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA)\*\*\*\* p<0,0001, \*\*\* p=0,0005

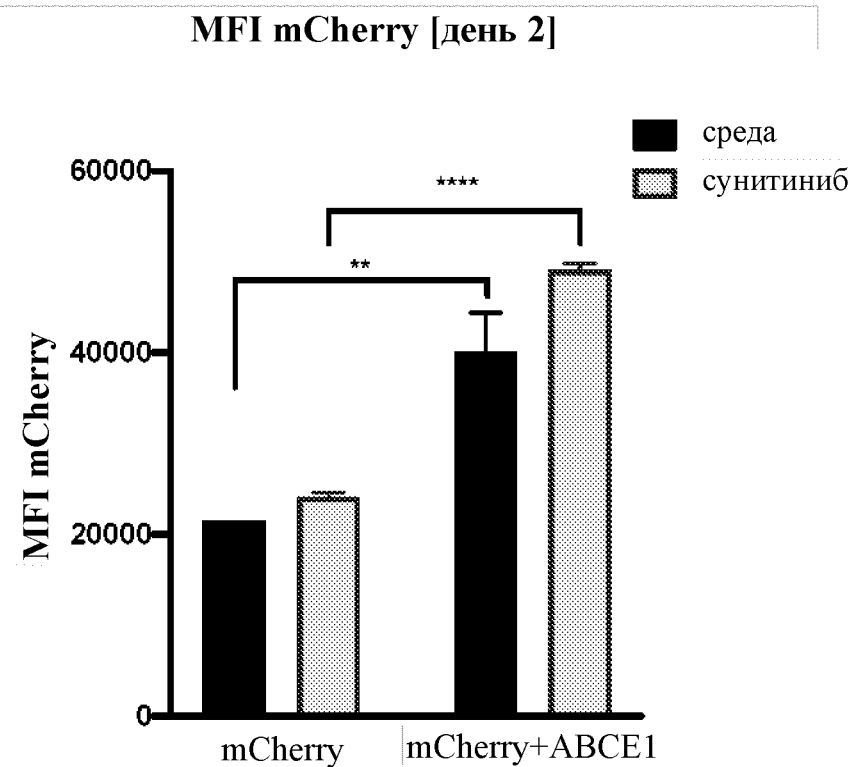
Активность уничтожения опухолей [2 дня]



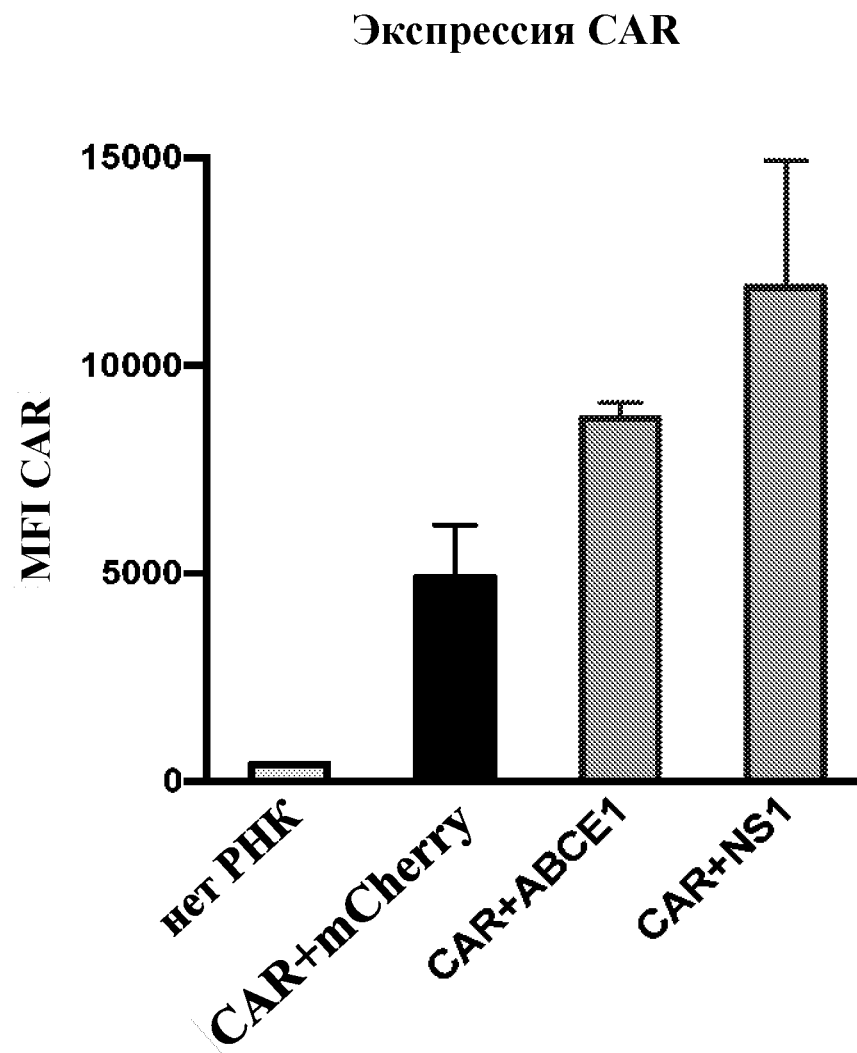
ФИГ. 14С



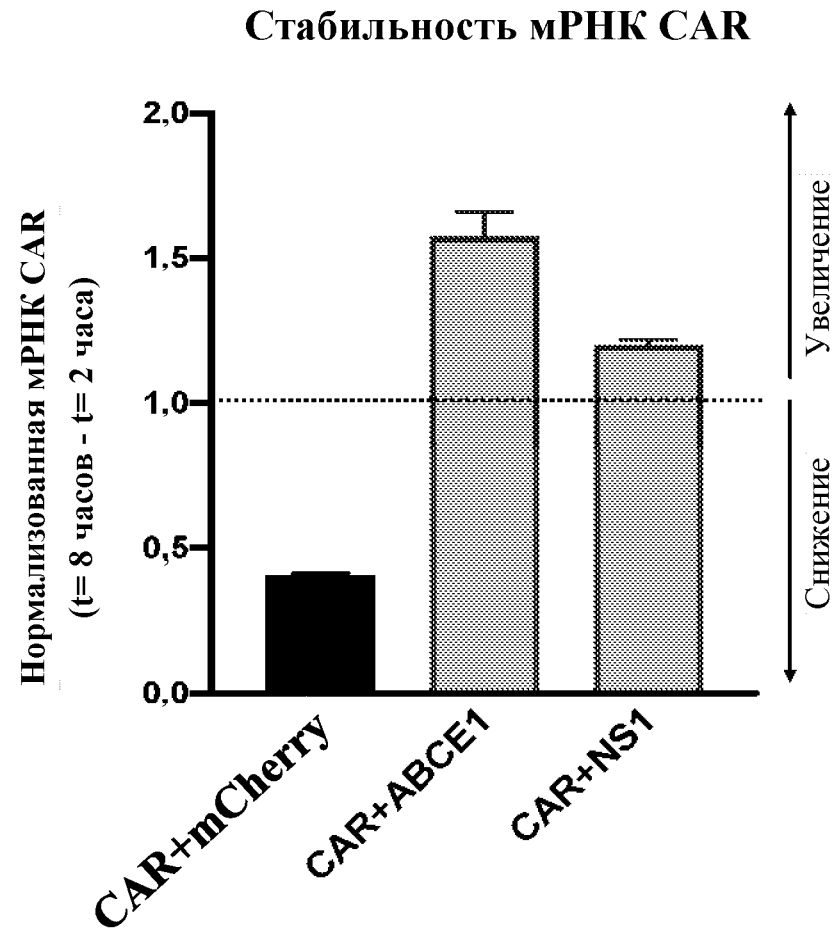
Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA)\*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p = 0,0011$



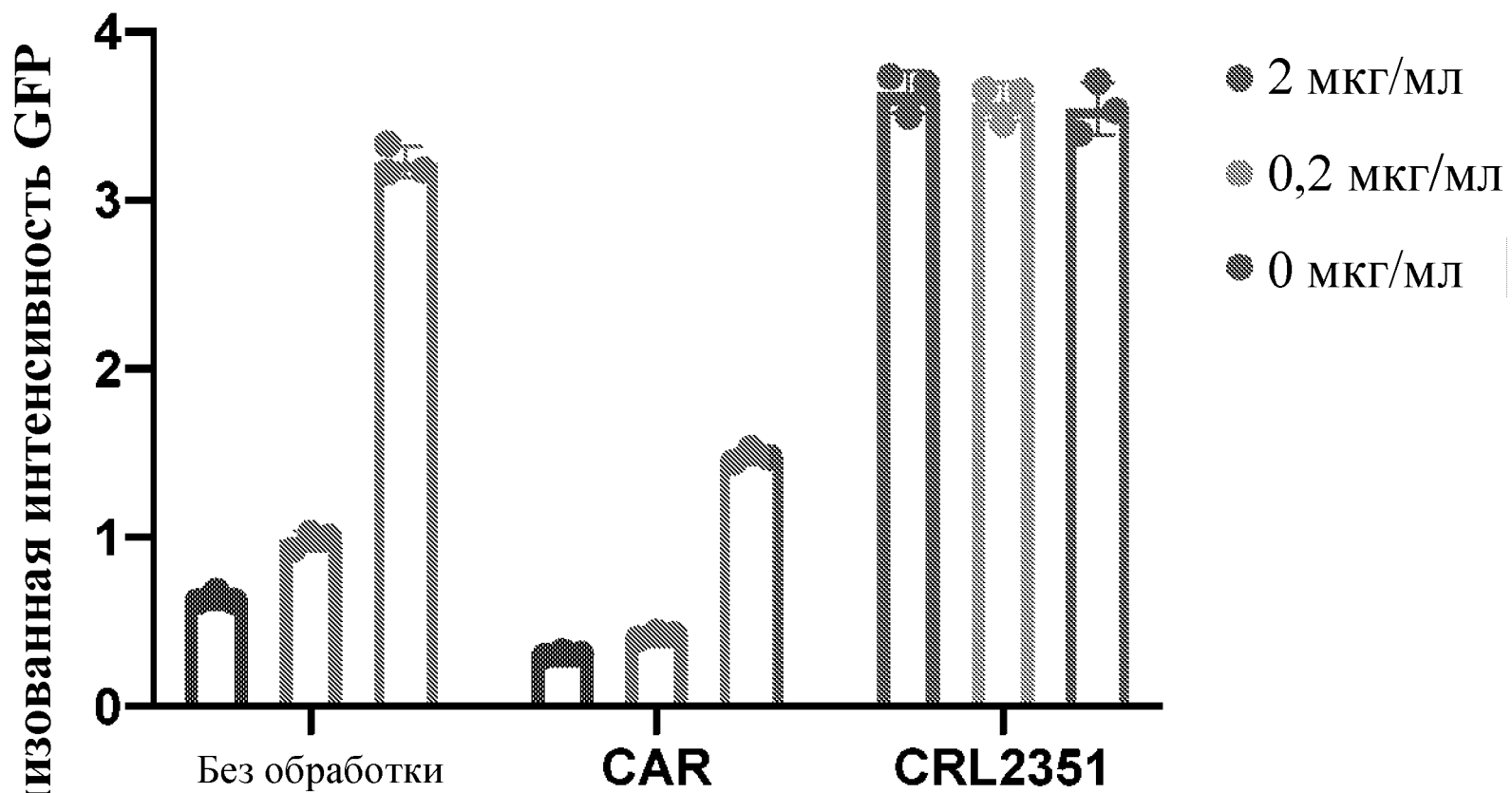
Фиг. 15



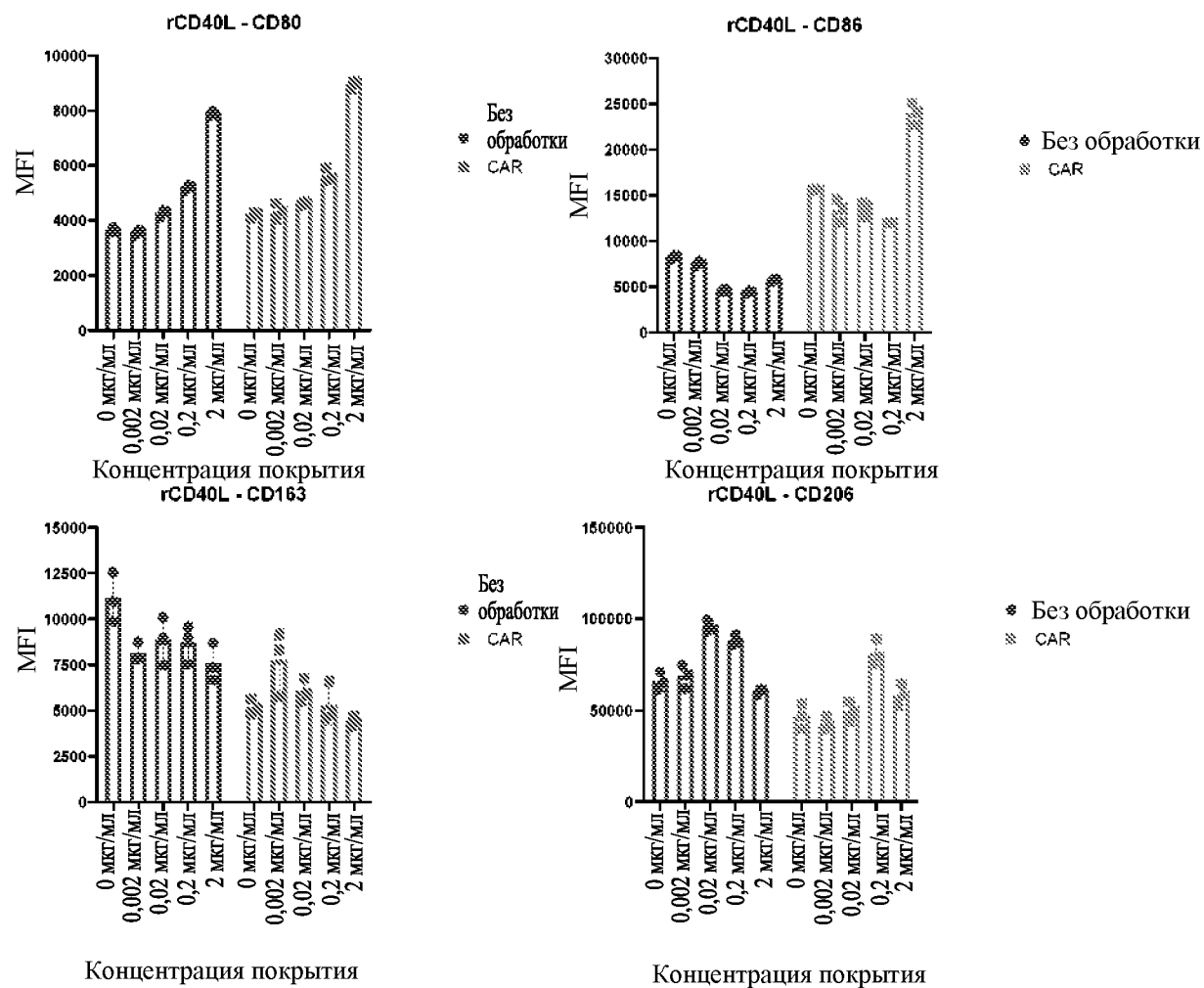
ФИГ. 16



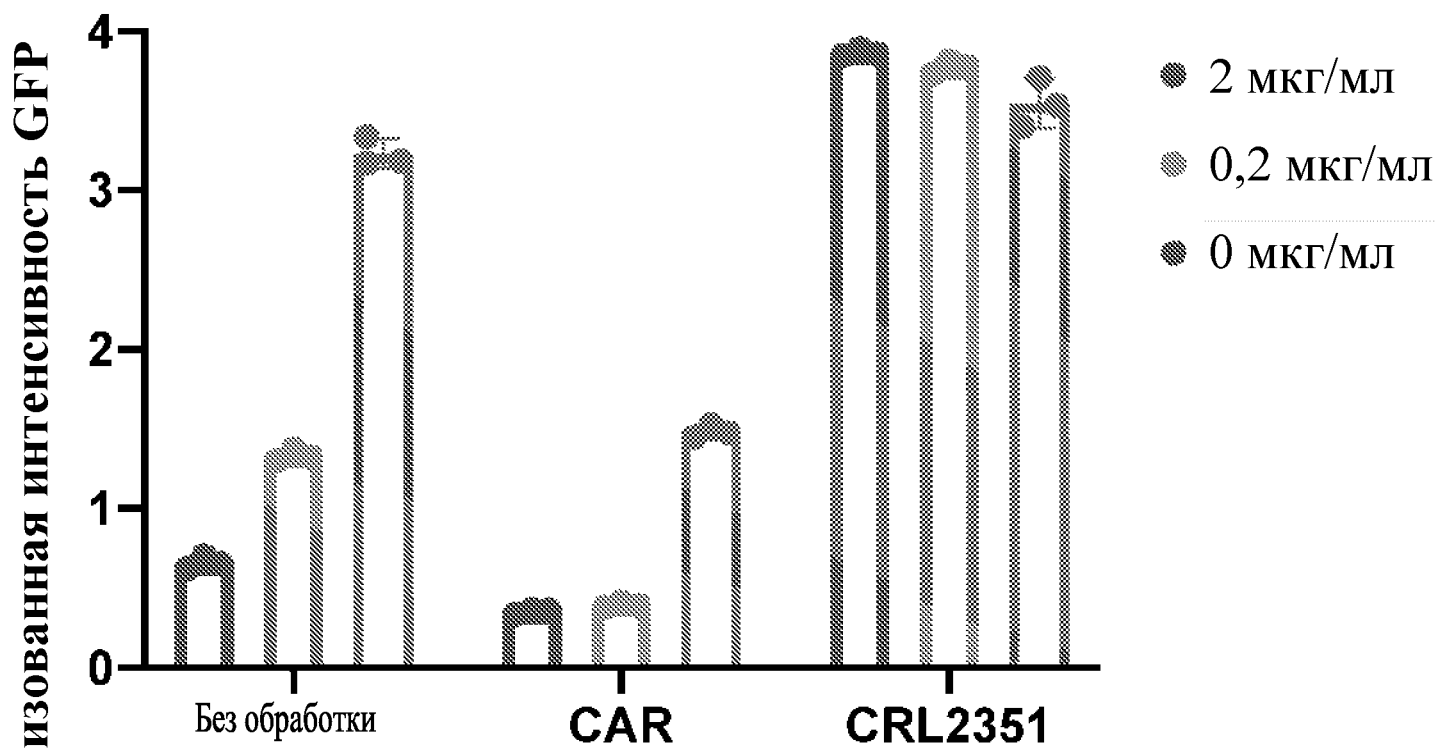
ФИГ. 17



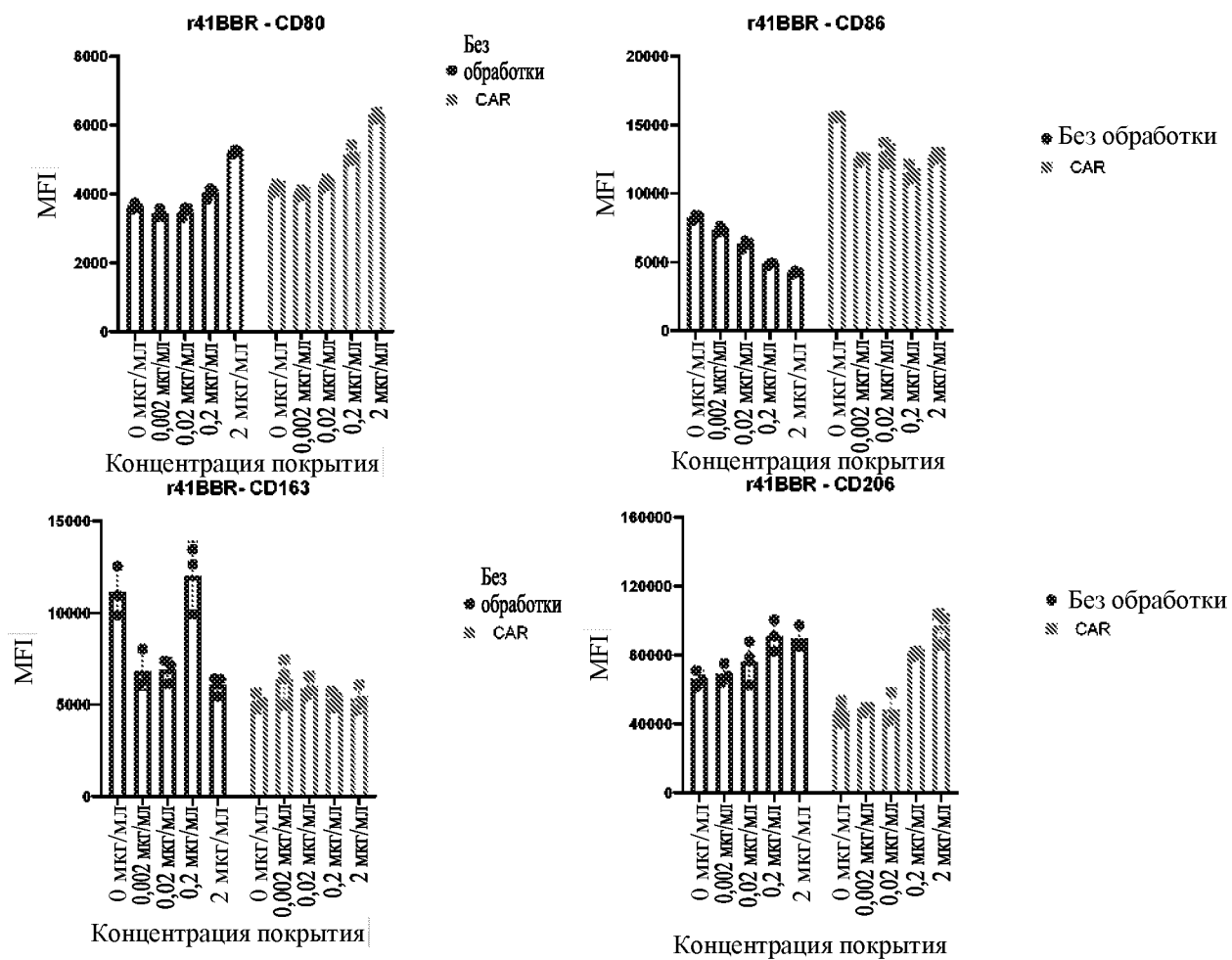
ФИГ. 18А



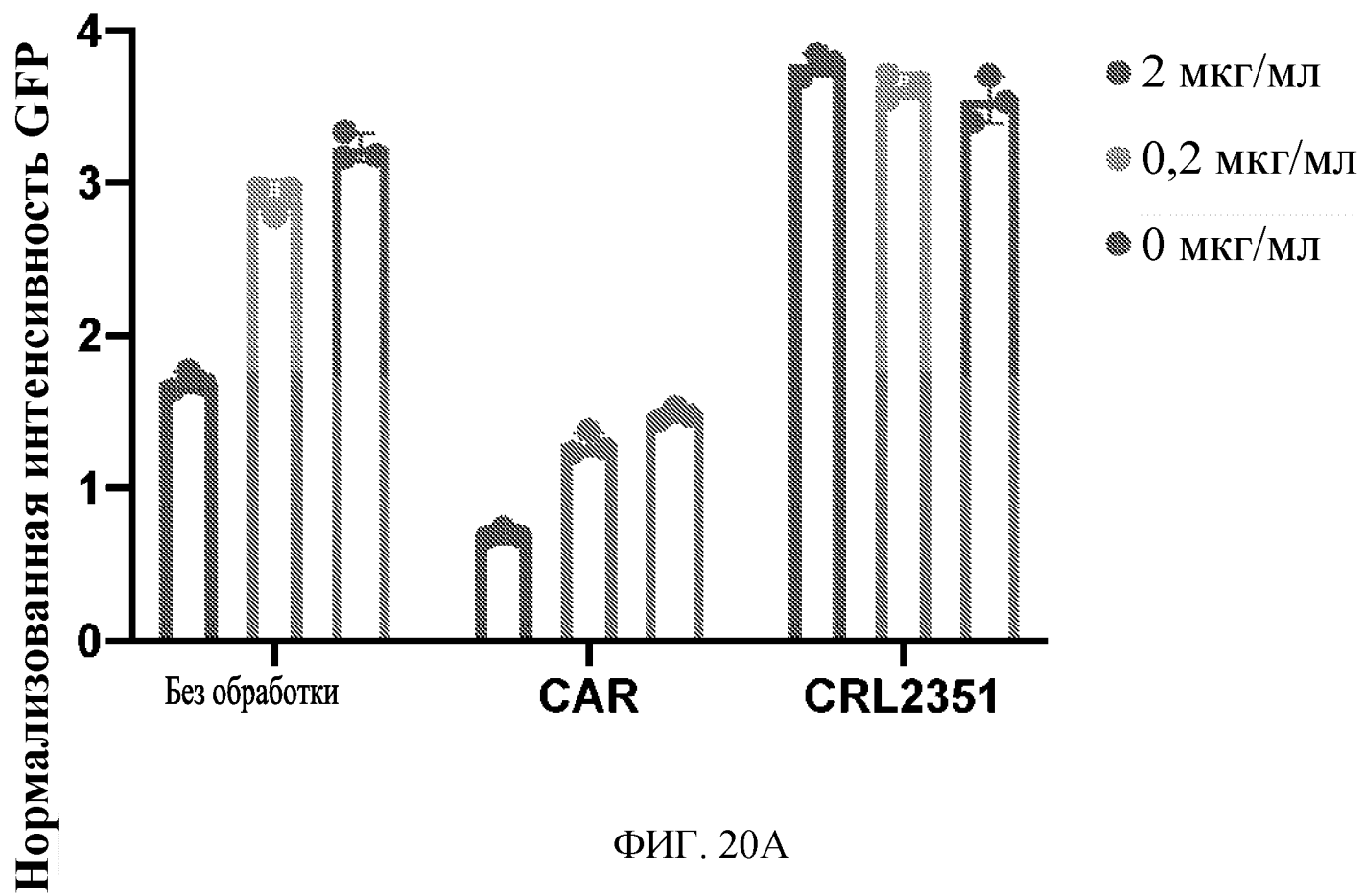
ФИГ. 18В

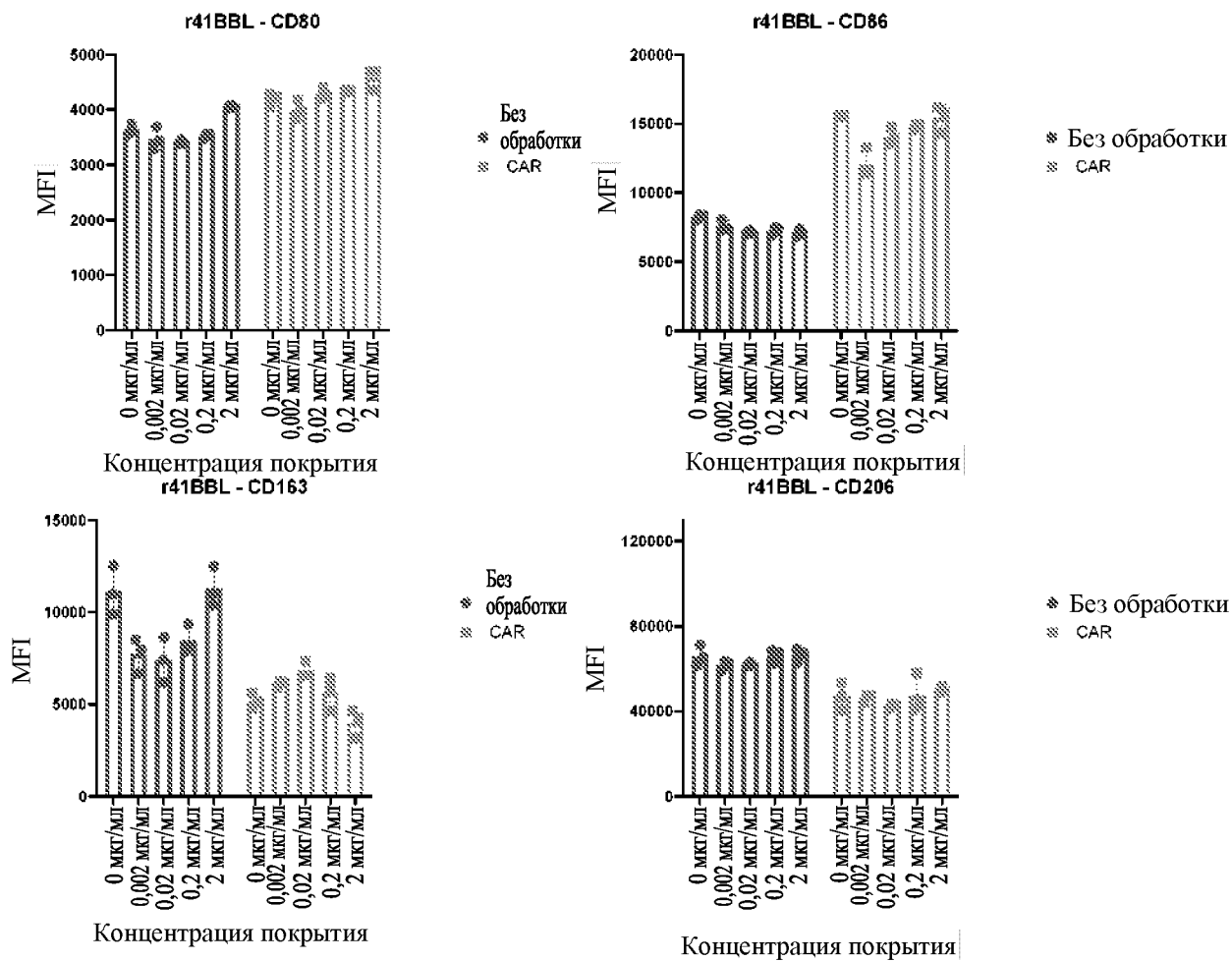


ФИГ. 19А

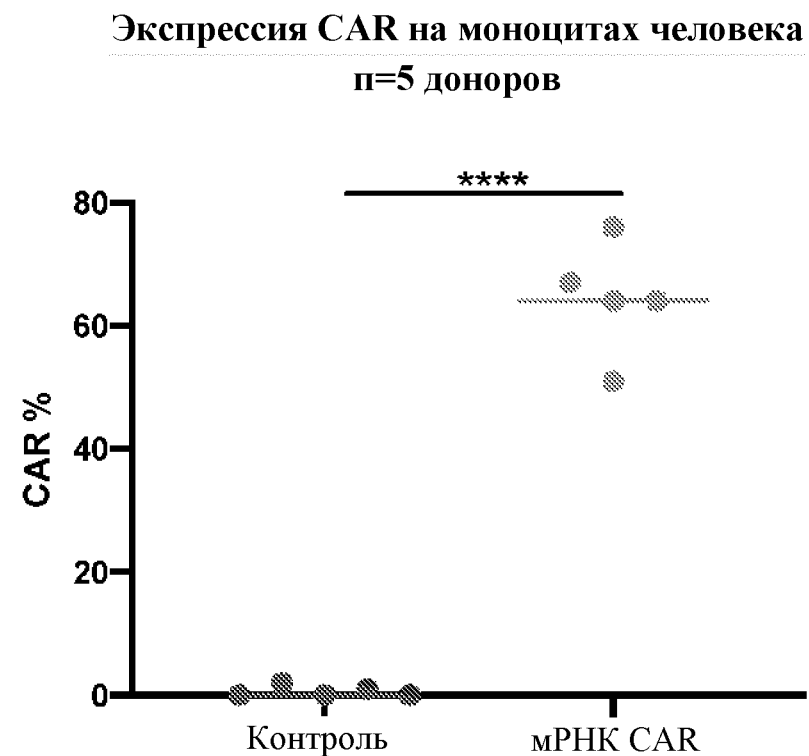
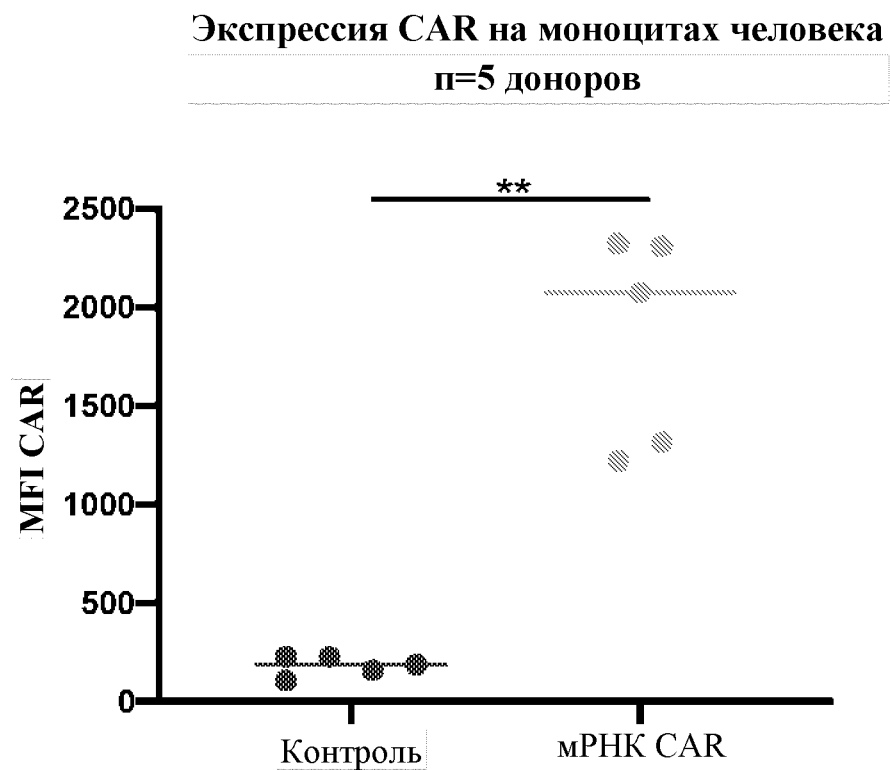


ФИГ. 19В

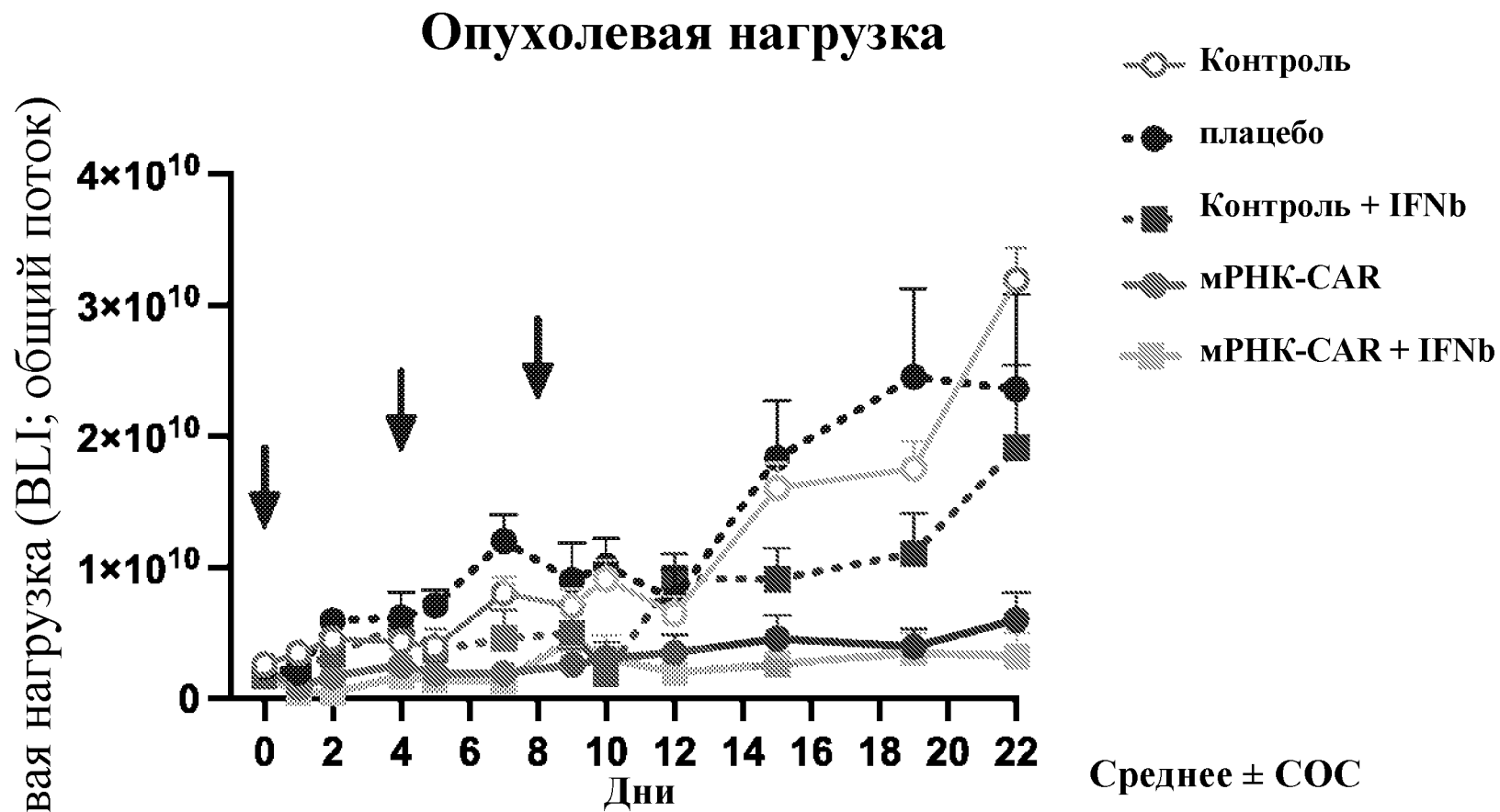




ФИГ. 20В

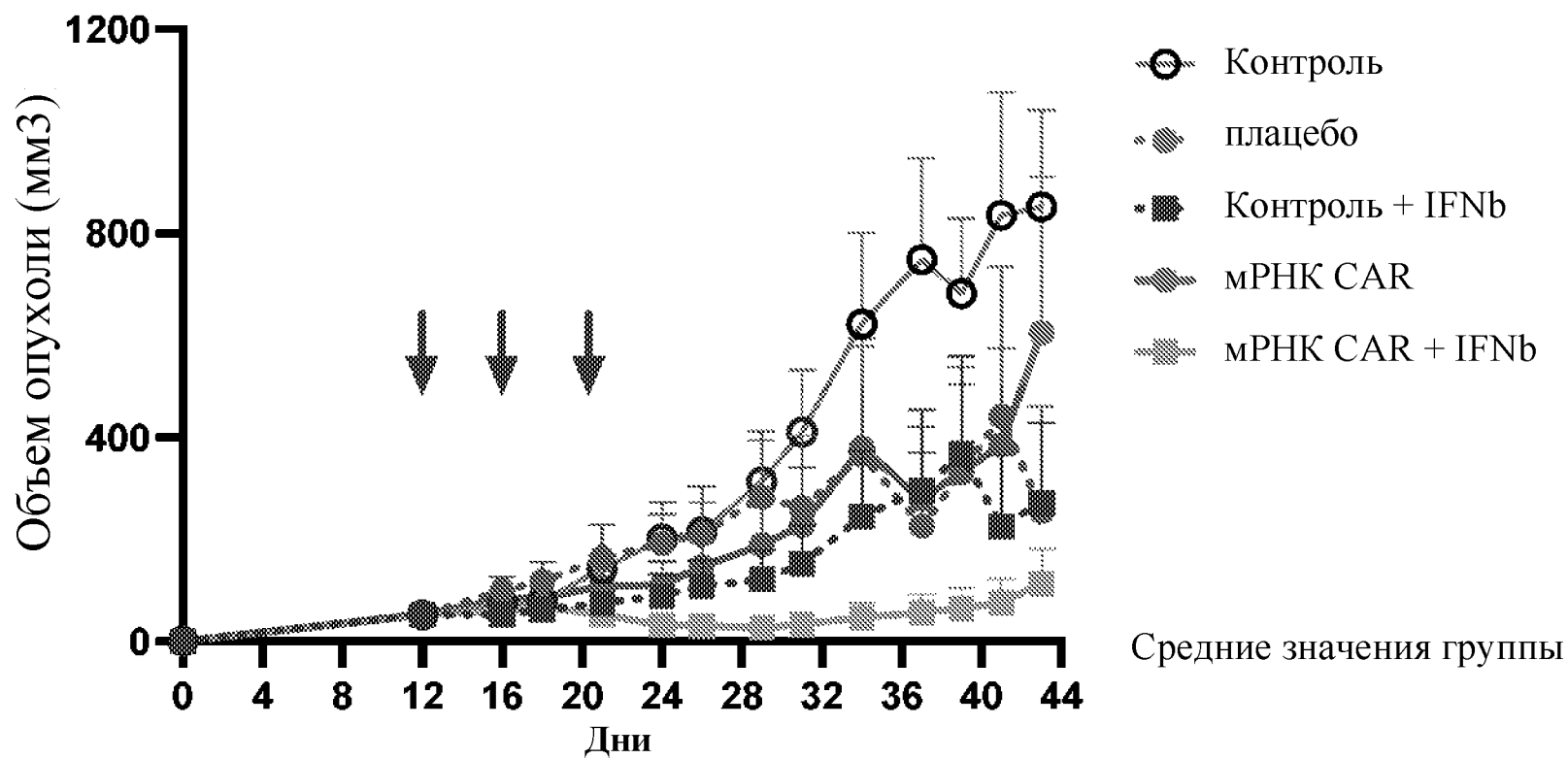


Фиг. 21



Фиг. 22

## Рост опухоли



Фиг. 23