

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391671 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.17

(22) Дата подачи заявки
2022.01.11

(51) Int. Cl. C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/078 (2010.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)

(54) МАЛЫЕ МОЛЕКУЛЫ ДЛЯ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА Т-КЛЕТОК

(31) 63/136,585

(32) 2021.01.12

(33) US

(86) PCT/US2022/012029

(87) WO 2022/155151 2022.07.21

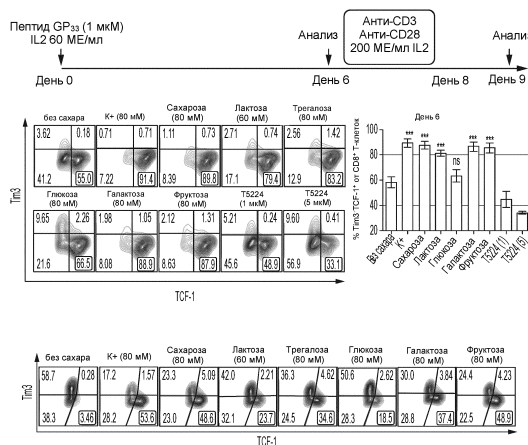
(88) 2022.08.25

(71) Заявитель:
ЗЕ СКРИППС РИСЕРЧ
ИНСТИТУТ (US)

(72) Изобретатель:
У Пэн, Ши Юйцзэ, Хоу Инцинь (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Согласно настоящему изобретению предложены способы размножения активированных Т-клеток с получением Т-клеток с менее дифференцированным статусом и повышенной устойчивостью in vivo после адоптивного переноса. Активированные Т-клетки, подходящие для указанных способов, включают, например, прогениторные истощенные (Tim3⁺TCF-1⁺) Т-клетки, стволовые Т-клетки памяти и Т-клетки центральной памяти. Согласно настоящему изобретению также предложены способы идентификации прогениторных истощенных Т-клеток, специфичных в отношении антигена. Кроме того, согласно настоящему изобретению предложены прогениторные истощенные Т-клетки, фармацевтические композиции и наборы, а также способы лечения рака или инфекции с их применением.



A1

202391671

202391671

A1

МАЛЫЕ МОЛЕКУЛЫ ДЛЯ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА Т-КЛЕТОК

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка на патент испрашивает преимущества приоритета на основании предварительной заявки на патент США № 63/136585 (поданной 12 января 2021 г.). Полное описание приоритетной заявки полностью включено в настоящий документ посредством ссылки и для всех целей.

ЗАЯВЛЕНИЕ О ГОСУДАРСТВЕННОМ ИНТЕРЕСЕ

[2] Настоящее изобретение было осуществлено при государственной поддержке в рамках грантов №№ GM139643 и AI143884, выданных Национальными институтами здравоохранения США (NIH). Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[3] Настоящее изобретение в целом относится к культуре Т-клеток и адоптивной трансплантации Т-клеток.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[4] Постоянно разрабатываются новые виды терапии для лечения рака и инфекций. Один из таких подходов включает разные виды адоптивной клеточной терапии (АСТ). АСТ включают пассивный перенос хозяину выращенных *ex vivo* клеток, чаще всего иммунных клеток, с целью переноса иммунологической функциональной способности и характеристик трансплантата. Однако такие виды терапии не лишены ограничений. Недостаточная способность этих размноженных клеток сохраняться *in vivo* препятствует эффективности таких средств лечения, что приводит к отсутствию устойчивого клинического ответа. В нескольких клинических исследованиях показано, что устойчивые Т-клетки отсутствуют у большинства пациентов, получающих размноженные *ex vivo* инфильтрирующие опухоль лимфоциты (ТИЛ). Это наблюдение свидетельствует о том, что инфузированные клетки, которые были широкомасштабно размножены из одной реактивной клетки, могли быть доведены до терминальной дифференцировки *ex vivo* и, следовательно, обладают очень ограниченной способностью к репликации после переноса.

[5] Таким образом, в данной области техники остается потребность в более эффективных клетках и видах адоптивной клеточной терапии. В частности, серьезной проблемой в данной области техники является повышение устойчивости и способности к репликации *in vivo* Т-клеток, реактивных в отношении опухолевого антигена. Настоящее

изобретение направлено на удовлетворение данной и других неудовлетворенных потребностей в данной области техники.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены способы размножения активированных Т-клеток с получением Т-клеток с повышенной устойчивостью *in vivo* после адоптивного переноса. Способ включает приведение популяции клеток, содержащей активированные Т-клетки, при соответствующих условиях культивирования, в контакт с эффективным количеством соединения, которое разобщает размножение Т-клеток и дифференцировку. Согласно различным вариантам реализации активированные Т-клетки, подлежащие размножению в указанных способах, могут представлять собой, например, стволовые Т-клетки памяти (Tscm), Т-клетки центральной памяти (Tcm), Т-клетки эффекторной памяти, эффекторные Т-клетки, прогениторные истощенные Т-клетки (Trex) или терминально истощенные Т-клетки (Ttex). Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации полученные Т-клетки менее дифференцированы по сравнению с активированными Т-клетками, не обработанными соединением. В некоторых способах применяемое соединение представляет собой сахар или производное сахара. Согласно некоторым вариантам реализации применяемый сахар представляет собой трегалозу, сахарозу, лактозу, фруктозу или нейраминовую кислоту. Согласно некоторым вариантам реализации применяемое производное сахара представляет собой *N*-ацетилглюкозамин (GlcNAc) или *N*-ацетилнейраминовую кислоту (Neu5Ac). В некоторых других способах применяемое соединение представляет собой ингибитор энхансера гомолога-2 белка Zeste (EZH2). В некоторых из этих вариантов реализации ингибитор EZH2, применяемый для размножения активированных Т-клеток, представляет собой таземетостат. В некоторых других способах применяемое соединение представляет собой низкомолекулярный ингибитор мутанта KRAS (G12C). В некоторых из этих вариантов реализации применяемое соединение-ингибитор представляет собой ингибитор KRAS (G12C) 12.

[7] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активированные Т-клетки, подлежащие размножению, представляют собой инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL) или генетически сконструированные Т-клетки. В некоторых из этих способов TIL, подлежащие размножению, представляют собой CD8⁺ Т-клетки или CD4⁺ Т-клетки. В некоторых других способах генетически сконструированные Т-клетки, подлежащие размножению, представляют собой TCR-модифицированные Т-клетки или CAR-Т-клетки.

[8] В связанном аспекте настоящего изобретения предложены способы превращения TCF-1-отрицательных Т-клеток в TCF-1-положительные или частично положительные Т-клетки. Указанные способы включают приведение популяции TCF-1-отрицательных Т-клеток в подходящих условиях роста в контакт с эффективным количеством соединения, которое разобщает размножение Т-клеток и дифференцировку. Согласно некоторым вариантам реализации применяемое соединение представляет собой *N*-ацетилнейраминовую кислоту (Neu5Ac) или *N*-ацетилглюкозамин (GlcNAc).

[9] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены наборы или терапевтические комбинации для применения с целью размножения *in vitro* активированной Т-клетки для адоптивной клеточной терапии. Наборы или терапевтические комбинации содержат (1) эффективное количество соединения, которое разобщает размножение Т-клеток и дифференцировку, и (2) инструкцию по совместному культивированию соединения с популяцией клеток, содержащей активированную Т-клетку. Согласно различным вариантам реализации наборы или терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению можно применять для размножения стволовых Т-клеток памяти (Tscm), Т-клеток центральной памяти (Tcm), Т-клеток эффекторной памяти, эффекторных Т-клеток, прогениторных истощенных Т-клеток (Трех) и терминально истощенных Т-клеток (Тtex). Согласно некоторым другим вариантам реализации наборы или терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для размножения инфильтрирующих опухоль Т-клеток или генетически сконструированных Т-клеток. Некоторые из этих наборов или терапевтических комбинаций можно применять для размножения подобных прогениторным CD8⁺ Т-клеток или терминально истощенных CD8⁺ Т-клеток. Некоторые другие наборы или терапевтические комбинации можно применять для размножения сконструированных Т-клеток, представляющих собой TCR-модифицированные Т-клетки или CAR-Т-клетки. Согласно различным вариантам реализации соединение в наборах или терапевтических комбинациях, которое разобщает размножение Т-клеток и дифференцировку, может представлять собой сахар или производное сахара. Например, соединение может представлять собой сахар, такой как трегалоза, сахароза, лактоза, глюкоза, галактоза, фруктоза или нейраминовая кислота. Согласно некоторым конкретным вариантам реализации соединение представляет собой производное сахара *N*-ацетилглюкозамин (GlcNAc) или *N*-ацетилнейраминовую кислоту (Neu5Ac). Согласно некоторым другим вариантам реализации соединение в наборах или терапевтических комбинациях, которое разобщает размножение Т-клеток и дифференцировку, может представлять собой ингибитор энхансера гомолога-2 белка Zeste (EZH2), например,

тазаметостат. Согласно некоторым другим вариантам реализации соединение в наборах или терапевтических комбинациях, которое разобщает размножение Т-клеток и дифференцировку, может представлять собой низкомолекулярный ингибитор мутанта KRAS (G12C), например, ингибитор KRAS (G12C) 12.

[10] Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложены способы скрининга соединений, которые стимулируют пролиферацию активированных Т-клеток и/или поддерживают размноженные Т-клетки в менее дифференцированном состоянии. Указанные способы включают (а) обеспечение Т-клеток из ткани, содержащей Т-клетки, от субъекта; (b) культивирование активированных Т-клеток из ткани, содержащей Т-клетки, в присутствии соединения; поддержание указанного культивирования в течение периода времени, достаточного для обеспечения пролиферации Т-клеток, причем Т-клетки из ткани, содержащей Т-клетки, подверглись стимуляции активирующим агентом, при этом стимуляция происходит до культивирования или одновременно с ним; и

[11] (с) измерение: (i) количества Т-клеток, экспрессирующих TCF-1; и/или (ii) уровня экспрессии TCF-1, при этом увеличение как (i), так и (ii) по сравнению с Т-клетками после размножения, не обработанными соединением, указывает на то, что соединение стимулирует пролиферацию прогениторных истощенных Т-клеток и поддерживает размноженные Т-клетки в менее дифференцированном состоянии, и при этом увеличение (ii), но не (i) по сравнению с Т-клетками после размножения, не обработанными соединением, указывает на то, что соединение стимулирует поддержание размноженных Т-клеток в менее дифференцированном состоянии. Некоторые способы скрининга согласно настоящему изобретению могут дополнительно включать повторную стимуляцию и размножение Т-клеток в культуре после (с), и поддержание указанного культивирования в течение периода времени, достаточного для обеспечения размножения Т-клеток. В этих способах Т-клетки оценивают путем измерения: (i) количества Т-клеток, экспрессирующих TCF-1; и/или (ii) уровня экспрессии TCF-1. Увеличение как (i), так и (ii) по сравнению с Т-клетками после размножения, не обработанными соединением, указывает на то, что соединение стимулирует пролиферацию прогениторных истощенных Т-клеток и поддерживает размноженные Т-клетки в менее дифференцированном состоянии. Увеличение (ii), но не (i) по сравнению с Т-клетками после размножения, не обработанными соединением, указывает на то, что соединение стимулирует поддержание размноженных Т-клеток в менее дифференцированном состоянии.

[12] В другом связанном аспекте настоящего изобретения предложены способы скрининга соединений, которые стимулируют пролиферацию прогениторных истощенных Т-клеток. Эти способы включают (а) обеспечение спленоцитов от трансгенного субъекта,

содержащего полинуклеотид, кодирующий меченый ген *Tcf7*, и полинуклеотид, кодирующий Т-клеточный рецептор, специфичный в отношении пептидного антигена в комплексе с молекулой главного комплекса гистосовместимости (ГКГС); (b) культивирование активированных CD8⁺ Т-клеток из спленоцитов в присутствии соединения; поддержание указанного культивирования в течение периода времени, достаточного для обеспечения пролиферации Т-клеток, причем Т-клетки из спленоцитов подверглись стимуляции активирующим агентом, при этом стимуляция происходит до культивирования или одновременно с ним; (c) измерение: (i) количества меченых Tcf7⁺ Т-клеток; и/или (ii) уровня экспрессии TCF-1. Увеличение (i) и (ii) по сравнению со спленоцитами, не обработанными соединением, указывает на то, что соединение стимулирует пролиферацию прогениторных истощенных Т-клеток.

[13] Другие аспекты и преимущества настоящего изобретения будут легко понятны из следующего ниже подробного описания настоящего изобретения.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[14] Определенные варианты реализации настоящего изобретения изображены на чертежах с целью иллюстрации настоящего изобретения. Однако настоящее изобретение не ограничивается точными схемами и техническими средствами вариантов реализации, показанными на чертежах.

[15] На ФИГ. 1 показан скрининг низкомолекулярных модуляторов, которые могут увеличивать число TCF-1⁺ клеток во время *in vitro* активации и размножения антиген-специфичных P14 CD8⁺ Т-клеток. На панели А отображен скрининговый анализ соединения на повышенную пролиферацию прогениторных истощенных Т-клеток (Tim3⁻ TCF-1⁺ Т-клетки). На панели В показан анализ методом проточной цитометрии размноженных CD8⁺ Т-клеток (процент Tim3⁻TCF-1⁺), подвергшихся воздействию различных соединений (контроль, K⁺, сахароза, лактоза, трегалоза, галактоза, фруктоза и T5224) в различной концентрации на день 6 культивирования. На панели С показан анализ методом проточной цитометрии размноженных CD8⁺ Т-клеток (процент Tim3⁻TCF-1⁺), подвергшихся воздействию различных соединений (контроль, K⁺, сахароза, лактоза, трегалоза, галактоза, фруктоза и T5224) в различной концентрации на день 9 культивирования.

[16] На ФИГ. 2 показано, что обработанные сахаром вирус-специфичные CD8⁺ Т-клетки размножались лучше *in vivo*, чем необработанные Т-клетки. На панели А отображена схема оценки *in vivo* размножения P14 CD8⁺ Т-клеток после инфекции LCMV-Cl13. На панели В отображен анализ Т-клеток, размноженных с применением различных соединений (контроль и сахара), и анализ методом проточной цитометрии размноженных

Т-клеток из конкретных областей (кровь, селезенка и печень) в различные моменты времени после переноса клеток на день 6. На панели С отображен анализ Т-клеток, размноженных с применением различных соединений (контроль и сахара), и анализ методом проточной цитометрии размноженных Т-клеток из конкретных областей (кровь, селезенка и печень) в различные моменты времени после переноса клеток на день 9.

[17] На ФИГ. 3 показано, что обработанные сахаром антиген-специфичные OT-1 CD8⁺ Т-клетки характеризуются значительно лучшими способностями к подавлению роста опухоли *in vivo*, чем необработанные Т-клетки. На панели А отображена схема активации *in vitro* размноженных OT-1 спленоцитов для анализа методом проточной цитометрии и переноса *in vivo* для лечения опухоли B16-OVA. На панели В отображена кривая клеточного роста размноженных клеток в различных условиях (сахароза, лактоза, глюкоза, галактоза и фруктоза) на день 7. На панели С отображен анализ методом проточной цитометрии размноженных клеток в различных условиях (сахароза, лактоза, глюкоза, галактоза и фруктоза) на день 7. На панели D отображен объем опухоли с течением времени после обработки клеток, размноженных с сахарами и без них. На панели Е отображен анализ апоптоза наивных OT-спленоцитов, стимулированных пептидом OVA и без IL-2 в присутствии и в отсутствие сахаров в течение 5 дней.

[18] На ФИГ. 4 показано, что добавки Neu5Ac и GlcNAc обеспечивают улучшенные функциональные характеристики TCF1⁺ CD8⁺ Трех клеток. На панели А отображена схема для наивных OT-1 спленоцитов, стимулированных пептидом OVA и без IL-2 в различных условиях (контроль, GlcNAc и Neu5Ac) в течение 5 дней, и анализ аннексина V для анализа апоптоза с помощью проточной цитометрии. На панели В отображен процент апоптотических клеток в различных условиях. На панели С отображена собственная продукция IL2, высвобождаемого клетками в культуральную среду. На панели D отображена схема для наивных OT-1 спленоцитов, стимулированных пептидом OVA и с IL-2 в различных условиях (контроль, GlcNAc и Neu5Ac) в течение 7 или 8 дней, и анализ различных показателей (MFI АФК, НАДФН/НАДФ⁺ и GSH/GSSG). На панели Е отображено измерение MFI АФК клеток в различных условиях. На панели F отображено измерение соотношения НАДФН/НАДФ⁺ клеток в различных условиях. На панели G отображено измерение GSH/GSSG клеток в различных условиях.

[19] На ФИГ. 5 показано, что добавки Neu5Ac и GlcNAc обеспечивают размножение TCF1⁺ CD8⁺ Трех клеток *in vivo* и характеризуются подавлением опухоли *in vivo*. На панели А отображена схема *in vitro* активации и размножения OT-1 спленоцитов в различных условиях и переноса *in vivo* для лечения опухоли B16-OVA с добавлением антитела к PD1. На панели В отображено измерение объема опухоли по дням после

обработки в различных условиях (контроль, без сахара, без сахара и с антителом к PD1, с Neu5Ac, а также с Neu5Ac и с антителом к PD1). На панели С отображено измерение процента выживаемости по дням после обработки в различных условиях (контроль, без сахара, без сахара и с антителом к PD1, с Neu5Ac, а также с Neu5Ac и с антителом к PD1). На панели D отображена схема анализа *in vivo* инфильтрирующих опухоль OT-1 клеток у мышей с опухолью B16-OVA из клеток, активированных и размноженных в различных условиях (контроль, GlcNAc и Neu5Ac) *in vitro*. На панели E отображен процент OT-1 Т-клеток от общего количества CD8⁺ Т-клеток из выделенной опухоли. На панели F отображено число OT-1 Т-клеток на грамм опухолевой ткани.

[20] На ФИГ. 6 показано, что сахара увеличивают число TCF-1⁺ клеток во время *in vitro* размножения CD8⁺ TSA-реактивных CD8⁺ TIL. На панели А отображена схема мечения FusoID для выделения TSA-реактивных TIL. На панели В отображен процент популяции Tim3⁺TCF-1⁺ из Т-клеток в различных условиях (без сахара, с сахарозой, с GlcNAc и с Neu5Ac). На панелях С и D отображено фенотипическое сравнение MC38 TSA-реактивных TIL, размноженных в различных условиях (без сахара, с сахарозой, с GlcNAc и с Neu5Ac), с помощью проточной цитометрии. На панели E отображен способ применения подвергнутых скринингу клеток и различных соединений для размножения с целью терапии на основе адоптивного переноса Т-клеток для лечения опухолей. На панели F отображена эффективность контроля опухоли OVA-специфичных TIL из опухолей B16-OVA, размноженных с сахарозой или без нее. Размер опухоли измеряли на день 16 после адоптивного переноса. На панели G отображено размножение *in vivo* после иммунизации LM-OVA OVA-специфичных TIL, размноженных с сахарозой или без нее.

[21] На ФИГ. 7 показано, что сахара увеличивают пролиферацию и уменьшают фенотипы истощения GD2-CarT клеток. МКПК человека активировали с использованием гранул Dynabeads T-Expander против CD3/cd38 человека в соотношении 1:1 в течение 24 ч в среде для Т-клеток, а затем трансдуцировали ретровирусным вектором, кодирующим дисialogанглиозид (GD2)-специфичный 14g2a scFv, сигнальные домены CD3ζ и CD28 (HA-28z). На день 5 после трансфекции CD8⁺ CAR Т-клетки или CD4⁺ CAR Т-клетки отсортировывали для *in vitro* размножения с использованием 150 МЕ/мл IL-2 в присутствии или в отсутствие сахаров (А). Число клеток для CD8⁺ CAR Т-клеток (В) и CD4⁺ CAR Т-клеток (С) регистрировали на день 7 и день 14. Фенотип CD8⁺ CAR Т-клеток (D) и CD4⁺ CAR Т-клеток (E) анализировали на день 14 после размножения. 3 повтора для каждой группы (n=3), ^{ns}P > 0,05; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001; проанализировано с помощью однофакторного дисперсионного анализа, а затем критерия для множественных сравнений Тьюки.

[22] На ФИГ. 8 показано, что ингибитор K-Ras(G12C) 12 облегчает продукцию подобных прогениторным (Трех, Tim-3⁺, TCF-1⁺) антиген-специфичных CD8⁺ TIL во время быстрого размножения *in vitro*. Рост клеток после размножения и фенотипы сопоставлены с таковыми до размножения. (А) Необработанные клетки на день 8 после размножения размножаются до $1,18 \times 10^6$ TIL, в то время как клетки, обработанные ингибитором K-Ras(G12C) 12 (5 мкМ), размножаются до $0,397 \times 10^6$ TIL (число клеток до размножения составляет $0,1 \times 10^6$ TIL). (В) Тетрамер M8⁺ CD8⁺ TIL анализировали на экспрессию ингибирующих рецепторов Tim-3 и PD-1 и (С) экспрессию Tim-3 и TCF-1 с помощью окрашивания мечеными флуорохромом антителами и проточной цитометрии. Для всех графиков и фигур: до размножения $n = 1$; необработанный контроль $n = 1$; ингибитор K-Ras(G12C) 12 (5 мкМ) $n = 1$.

[23] На ФИГ. 9 показано, что ингибитор K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ) положительно регулирует подобные прогениторным и менее дифференцированные (T_{SCM}) фенотипы в CD8⁺ Т-клетках из МКПК здоровых доноров-людей. (А) Донорские чМКПК активировали дважды с использованием облученной (50 Гр) смеси фидерных клеток сначала в день 0, а затем аналогичным образом на день 6. (В) чМКПК, обработанные ингибитором K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ), от обоих доноров не испытывают статистически значимого ухудшения роста клеток. (С-Е) чМКПК от обоих доноров окрашивали антителами, мечеными флуорохромом, и иммунофенотипировали с использованием проточной цитометрии. (С) Гейтированные CD8⁺ чМКПК анализировали на экспрессию ингибирующих рецепторов Tim-3 и PD-1 (отрицательная регуляция терминально истощенного фенотипа не является статистически значимой ни у одного из доноров), (D) экспрессию Tim-3 и TCF-1, и (Е) экспрессию CCR7 и CD45RA. Все столбиковые графики представляют среднее значение $\pm$ СО; необработанный контроль $n = 3$, ингибитор K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ) $n = 3$; ns $P > 0,05$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$; либо двухфакторный дисперсионный анализ с последующим критерием для множественных сравнений Сидака (В, Е), либо непарный t-критерий (С, D).

[24] На ФИГ. 10 показано, что временное ингибирование EZH2 таземетостатом поддерживает прогениторные фенотипы ОТ-I клеток. Фенотипический анализ ОТ-I/TCF-7-GFP спленцитов, которые активировали с помощью OVA₂₅₇₋₂₆₄ (500 нМ) с 60 МЕ/мл IL-2 в течение 3 дней и размножали в присутствии или в отсутствие Taz (400 нМ) в течение 4 дней (день 3-7) (А-В). Клеточная пролиферация ОТ-I клеток, размноженных с Taz (400 нМ, день 3-7) или без него (С). Вестерн-блот гистоновых белков из ОТ-I клеток, активированных OVA₂₅₇₋₂₆₄ (500 нМ) с 60 МЕ/мл IL-2 в течение 3 дней и размноженных в присутствии или в отсутствие Taz (400 нМ) в течение 12, 24, 48 ч (D). Гистон 3 (H3)

использовали в качестве референсного белка. 3 повтора для каждой группы ($n=3$), $^{ns}P > 0,05$; $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$; $****P < 0,0001$; проанализировано с помощью t-критерия Стьюдента.

[25] На ФИГ. 11 показано, что ингибирование EZH2 таземетостатом в ОТ-I клетках во время размножения *in vitro* улучшает гомеостаз *in vivo* и ответ ОТ-I клеток на инфекцию LM-OVA. ОТ-I спленоциты (CD45.2+/+) активировали 500 нМ OVA₂₅₇₋₂₆₄ в течение 3 дней и размножали в присутствии Taz (400 нМ) или без него в течение 4 дней (день 3-день 7). Через 30 дней после внутривенного переноса 10^4 ОТ-I (CD8⁺) клеток мышам C57BL/6 (CD45.1+/+ или CD45.1+/-) мышей инфицировали 10^4 КОЕ LM-OVA (A). Соотношение ОТ-I клеток в CD8⁺ Т-клетках или точное число ОТ-I клеток в крови анализировали на день 7 (B) и день 14 (C), в селезенке анализировали на день 30 (D). 3 повтора для каждой группы ($n=3$), $^{ns}P > 0,05$; $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$; $****P < 0,0001$; проанализировано с помощью t-критерия Стьюдента.

[26] На ФИГ. 12 показано, что ингибирование EZH2 таземетостатом в ОТ-I клетках во время размножения *in vitro* улучшает эффективность *in vivo* и ответ иммунной контрольной точки ОТ-I клеток против опухолей B16-OVA. Мышам C57BL/6 подкожно инокулировали опухолевые клетки B16-ova (6×10^5). Через 6 дней (день 0) переносили CD8⁺ ОТ-I Т-клетки (2×10^5), размноженные *in vitro* с Taz (400 нМ) и без него в течение 4 дней (день 3-день 7), соответственно, с последующим введением IL-2 и обработкой антителом к PD-1 на день 14 и день 21 (A). В контрольных группах мышам вводили только буфер ФСБ. Размеры опухолей (B, инъекции антитела к PD-1 указаны черными стрелками) и выживаемость (C) регистрировали каждые 2/3 дня. В каждую группу включали 5 мышей ($n = 5$), $^{ns}P > 0,05$; $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$; $****P < 0,0001$; однофакторный дисперсионный анализ с последующим критерием для множественных сравнений Тьюки.

[27] На ФИГ. 13 показано, что таземетостат улучшает желаемые свойства в МКПК человека. МКПК человека активировали облученной (50 Гр) смесью чМКПК от других пяти различных доноров в день 0 и день 6 и размножали с 300 МЕ/мл IL-2 в присутствии Taz (1 мкМ, день 3-день 14) или без него (A). Анализ фенотипа (B-C для донора A, E-F для донора B) и пролиферации (D для донора A, G для донора B) CD8⁺ Т-клеток на день 14 для 2 доноров. SCM: CD45RA⁺CCR7⁺, CM: CD45RA⁻CCR7⁺, EMRA: CD45RA⁺CCR7⁻, EM: CD45RA⁻CCR7⁻. Для продукции цитокинов чМКПК культивировали с Taz (1 мкМ, день 3-день 14) или без него и активировали антителом к CD3 (1 мкг/мл), нанесенным в виде покрытия, и суспендированным антителом к CD28 (1 мкг/мл) в течение 5 ч (E-H). 3

повтора для каждой группы (n=3), $^{ns}P > 0,05$; $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $* **P < 0,001$; $****P < 0,0001$; проанализировано с помощью t-критерия Стьюдента.

[28] На ФИГ. 14 показано, что таземетостат уменьшает фенотипы истощения GD2-CarT клеток. МКПК человека трансфицировали с использованием ha-28z, и CD8⁺GD2⁺ Т-клетки отсортировывали для *in vitro* размножения с 150 МЕ/мл IL-2 в присутствии или в отсутствие Taz (1 мкМ) (A), анализ фенотипа на день 14 после размножения (B-F), 3 повтора для каждой группы (n=3), $^{ns}P > 0,05$; $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $* **P < 0,001$; $* ***P < 0,0001$; проанализировано с помощью t-критерия Стьюдента.

[29] На ФИГ. 15 показано, что сахара поддерживают признаки прогениторных истощенных клеток и превращают терминально истощенные Т-клетки из опухоли B16-OVA обратно в TIL на прогениторной стадии. TIL из опухоли B16-OVA выделяли на день 10 после инокуляции, и Tim-3⁻TCF/GFP⁺ и Tim-3⁺TCF/GFP⁻ в тетрамер-положительной популяции собирали путем сортировки живых клеток (A). Фенотипические признаки Tim-3⁻TCF/GFP⁺ (B) и Tim-3⁺TCF/GFP⁻ (C) анализировали на день 7 после быстрого размножения с использованием фидерных клеток (TIL/фидерная клетка: 1/200) в присутствии или в отсутствие сахаров. 3 повтора для каждой группы (n=3), $^{ns}P > 0,05$; $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$; $****P < 0,0001$; проанализировано с помощью однофакторного дисперсионного анализа, а затем критерия для множественных сравнений Тьюки.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Обзор

[30] Разные виды иммунотерапии на основе Т-клеток можно применять для лечения пациентов, страдающих злокачественными новообразованиями или инфекцией. Для лечения злокачественных новообразований Т-клетки, реактивные в отношении опухолеспецифического антигена (TSA), могут быть выделены из опухоли пациента, а затем культивированы *in vitro* с образованием большого числа клеток для адоптивного переноса. В качестве альтернативы, Т-клетки из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) пациента могут быть сконструированы для экспрессии TSA-реактивного Т-клеточного рецептора (TCR) или химерного антигенного рецептора (CAR) и размножены *in vitro* с образованием большого числа клеток для адоптивного переноса. Кроме того, современные способы идентификации кандидатных антигенов с использованием обратной иммунологии и прогностического анализа ограничены доступными вычислительными инструментами, которые не могут точно предсказать реактивность Т-клеток. Эффективность этих видов иммунотерапии на основе Т-клеток может быть частично ограничена способностью клеток сохраняться *in vivo* после

переноса, при этом наблюдается отсутствие устойчивых клинических ответов. Дифференцировка этих клеток сопряжена (например, связана с) размножением. Таким образом, способность к репликации и устойчивость *in vivo* Т-клеток после адоптивного переноса отрицательно коррелирует с терминальной дифференцировкой.

[31] Наивные Т-клетки при встрече с антигеном подвергаются активации и дифференцировке. Клеточная дифференцировка сопровождается потерей «стволовости» – способности клеток быть мультипотентными и самообновляющимися. Во время дифференцировки Т-клеток (наивные Т-клетки → стволовые Т-клетки памяти (Tscm) → Т-клетки центральной памяти (Tcm) → Т-клетки эффекторной памяти (Tem) → эффекторные Т-клетки (Teff)) происходит постепенное снижение экспрессии транскрипционного фактора TCF-1. Уникальным признаком этих TCF-1⁺ Т-клеток является их способность к самообновлению. Эксперименты по адоптивному переносу продемонстрировали, что только TCF-1⁺ Т-клетки, но не их TCF-1⁻ аналоги, способны как самообновляться, так и давать потомство TCF-1⁻ клеток, обладающих эффекторным потенциалом и высокими уровнями экспрессии рецептора контрольной точки. Кроме того, субпопуляции менее дифференцированных Т-клеток, таких как стволовые клетки памяти (Tscm) и клетки центральной памяти (Tcm), имеют более низкие уровни активных форм кислорода (АФК), тогда как терминально дифференцированные Т-клетки эффекторной памяти и эффекторные Т-клетки (Tem и Teff) имеют более высокие уровни АФК, которые необходимы для их эффекторной функции, такой как цитотоксичность. Повышенный окислительный стресс и повреждение ДНК в результате накопления АФК могут непосредственно направлять CD8⁺ Т-клетки к терминальной дифференцировке с такими характеристиками как потеря пролиферации Т-клеток, наличие эффекторной функции Т-клеток и нарушение самообновления (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28412583/>).

[32] Исследования выявили, что адоптивный перенос TCR-T и CAR-T-клеток с фенотипом полностью дифференцированных Teff менее эффективен для контроля роста опухоли, чем применение субпопуляций менее дифференцированных Tscm или Tcm. Аналогичным образом, было обнаружено, что прогениторные истощенные Т-клетки (Трех), субпопуляция дисфункциональных CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих фактор транскрипции TCF-1, которые были недавно идентифицированы у мышей инфицированных клоном 13 персистирующего вируса *лимфоцитарного хориоменингита* (LCMV) (C113), у пациентов, инфицированных вирусом гепатита С (ВГС) и ВИЧ, в моделях рака и у пациентов, страдающих раком, необходимы для поддержания противовирусных Т-клеточных ответов на хронические инфекции и противоопухолевых ответов в микроокружении опухоли. Данные Трех-клетки (Tim3⁻TCF-1⁺) обеспечивают

пролиферативный взрыв и эффекторную функцию путем образования более дифференцированных терминально истощенных Т-клеток (Ttex, Tim3⁺TCF-1⁻) после анти-PD-1/PD-L1 терапии. Кроме того, мета-анализ базы данных Атласа ракового генома (TCGA) в отношении корреляций с выживаемостью пациентов в когорте первичных меланом выявил, что сигнатура *Tcf7* (кодирующая TCF-1)/*pdcd1* (кодирующая PD-1) в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (TIL) коррелирует с улучшенной выживаемостью пациентов.

[33] Учитывая, что положительный ответ на анти-PD-1 терапию у людей коррелирует с накоплением Трех в опухолях в сочетании с тем фактом, что у пациентов существует только конечное число PD-1-чувствительных CD8⁺ Т-клеток, предполагается, что продуцирование фенотипа Трех, а не Ttex во время размножения *in vitro* выделенных TSA-реактивных TIL важно для улучшения эффективности иммунотерапии как при хронических инфекциях, так и при раке. Аналогичным образом, получение TCR-Т и CAR-Т-клеток с менее дифференцированными фенотипами Tscm или Tcm и высокой экспрессией TCF-1 во время размножения *in vitro*, вероятно, улучшит эффективность иммунотерапевтических средств лечения.

[34] Настоящее изобретение получено частично на основании исследований, проведенных авторами настоящего изобретения для идентификации малых молекул и других соединений, которые способны разобщать размножение или пролиферацию активированных Т-клеток (например, прогениторных истощенных Т-клеток (Трех)) и их дифференцировку. Как подробно описано в настоящем документе, несколько соединений, идентифицированных в исследованиях, способны обеспечивать размножение активированных Т-клеток с получением Т-клеток с менее дифференцированным статусом и высокой экспрессией TCF-1. Эти Т-клетки с менее дифференцированным статусом способны к повышенной устойчивости *in vivo* после адоптивного переноса. В некоторых исследованиях авторы настоящего изобретения обнаружили, что приведение различных сахаров, вне физиологических уровней, в контакт с Т-клетками улучшает размножение при сохранении стволовости. Кроме того, клетки, размноженные с указанными сахарами, характеризуются повышенным размножением и пролиферацией *in vivo* (также называется повышенной устойчивостью *in vivo*) и улучшенными способностями к подавлению опухолей по сравнению с необработанными контрольными Т-клетками.

[35] В частности, как подробно описано ниже, результаты этих исследований выявили, что обработка вирус-специфичной TCR-модифицированной CD8⁺ Т-клетки (P14) соединениями сахара или производного сахара обеспечивает лучшее размножение *in vivo* по сравнению с необработанными Т-клетками. Также наблюдали, что антиген-

специфичная TCR-модифицированная CD8⁺ Т-клетка (ОТ-1), обработанная соединениями сахара во время размножения *in vitro*, характеризуется значительно лучшими способностями к подавлению роста опухоли *in vivo*, чем необработанные Т-клетки. В частности, было показано, что обработка TCF1⁺ CD8⁺ Трех клеток двумя соединениями производного сахара, Neu5Ac и GlcNAc, приводила к улучшению функциональных характеристик Т-клеток. Данные производные сахара стимулируют размножение TCF1⁺ CD8⁺ Трех клеток *in vivo*, характеризуются активностью по подавлению опухоли *in vivo* и увеличивают число TCF-1⁺ клеток во время размножения CD8⁺ TSA-реактивных CD8⁺ ТП *in vitro*. Кроме того, было обнаружено, что данные идентифицированные соединения сахара также могут повышать пролиферацию и уменьшать фенотипы истощения САТ-Т-клеток, полученных из МКПК человека. В связанном исследовании было обнаружено, что соединения производного сахара могут поддерживать признаки прогениторных истощенных клеток и превращать терминально истощенные ТП, выделенные из опухолей, обратно в прогениторные истощенные Т-клетки.

[36] В дополнение к сахарам или производным сахара исследования авторов настоящего изобретения также выявили другие соединения, способные разобщать размножение Т-клеток и дифференцировку. Например, они обнаружили, что хорошо известное соединение-ингибитор мутанта K-Ras(G12C), ингибитор 12, облегчает образование подобных прогениторным CD8⁺ Т-клеток без ущерба для роста клеток во время размножения *in vitro*. Также наблюдали, что это соединение положительно регулирует подобные прогениторным и менее дифференцированные (T_{SCM}) фенотипы в CD8⁺ Т-клетках из МКПК здоровых доноров-людей. Аналогичным образом, было обнаружено, что другое соединение, ингибитор EZH2 таземетостат, способно поддерживать прогениторные фенотипы TCR-модифицированной Т-клетки (ОТ-1). Также было показано, что ингибирование EZH2 таземетостатом в Т-клетках во время размножения *in vitro* улучшает гомеостаз *in vivo*, эффективность *in vivo* и ответ иммунной контрольной точки адоптивно перенесенных Т-клеток. Кроме того, было обнаружено, что таземетостат улучшает желаемые свойства в МКПК человека и уменьшает фенотипы истощения CAR-Т-клеток, полученных из МКПК человека. Дополнительные исследования выявили, что промежуточные продукты и конечные продукты биосинтеза пурина и пиримидина, а также соединение-ингибитор глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PDⁱ-1) также могут поддерживать менее дифференцированный фенотип прогениторных истощенных Т-клеток.

[37] В соответствии с этими исследованиями согласно настоящему изобретению предложены способы размножения активированных Т-клеток с получением Т-клеток с

менее дифференцированным статусом. Согласно связанным вариантам реализации предложены способы поддержания или сохранения менее дифференцированного статуса активированных Т-клеток, например, поддержания фенотипа прогениторных истощенных Т-клеток. В целом, в способах согласно настоящему изобретению применяют низкомолекулярные соединения, описанные в настоящем документе, которые продемонстрировали способность разобщать размножение Т-клеток и дифференцировку. Такие соединения включают, например, конкретные сахара или производные сахара, ингибиторы KRAS (G12C), ингибитор EZH2 и соединения, связанные с биосинтезом пурина или пиримидина. Таким образом, благодаря их повышенной устойчивости *in vivo* данные обработанные Т-клетки лучше подходят для разных видов терапии на основе adoptивного переноса Т-клеток.

[38] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены способы скрининга соединений, которые разобщают размножение и дифференцировку во время размножения Т-клеток *in vitro*, для улучшения устойчивости Т-клеток *in vivo* после переноса во время разных видов терапии на основе adoptивного переноса клеток. Согласно связанному аспекту настоящего изобретения предложены способы скрининга, которые можно применять, помимо прочего, для идентификации модуляторов (например, малых молекул), которые можно применять во время размножения *in vitro* для улучшения качества TIL и TCR/CAR-сконструированных Т-клеток путем увеличения числа анти-PD-1-чувствительных CD8⁺ Т-клеток, в которых указанные клетки характеризуются менее дифференцированными фенотипами. Согласно другому связанному аспекту настоящего изобретения предложены способы скрининга модуляторов (например, соединений), которые стимулируют пролиферацию Т-клеток, причем пролиферация Т-клеток, стимулируемая соединением, разобщает размножение Т-клеток и дифференцировку. Кроме того, согласно настоящему изобретению предложены способы идентификации, выделения и размножения нетерминально дифференцированных Т-клеток, специфичных в отношении антигена. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложены Т-клетки, фармацевтические композиции, наборы и способы лечения с их применением.

Определения

[39] Чтобы облегчить понимание настоящего изобретения, ниже определен ряд терминов и сокращений, используемых в настоящем документе:

[40] В настоящем документе формы единственного числа (соотв. «а», «an» и «the» в исходном тексте на английском языке) включают формы во множественном числе, если иное явным образом не следует из контекста. Например, упоминание «вектора» включает

один вектор, а также два или более векторов; упоминание «клетки» включает одну клетку, а также две или более клеток; и так далее.

[41] Термин «и/или» при использовании в перечне из двух или более элементов означает, что любой из перечисленных элементов может быть использован сам по себе или в комбинации с любым одним или более из перечисленных элементов. Например, выражение «А и/или В» предназначено для обозначения одного или обоих из А и В, т.е. А отдельно, В отдельно или А и В в комбинации. Выражение «А, В и/или С» предназначено для обозначения А отдельно, В отдельно, С отдельно, А и В в комбинации, А и С в комбинации, В и С в комбинации или А, В и С в комбинации.

[42] По всему описанию, если контекст не требует иного, слово «содержать» или варианты, такие как «содержит» или «содержащий», следует понимать как подразумевающие включение указанного элемента или целого числа, или группы элементов или целых чисел, но не исключение любого другого элемента или целого числа, или группы элементов или целых чисел.

[43] Под «состоящий из» подразумевается включение всего, что следует за выражением «состоящий из» и ограничение этим. Таким образом, выражение «состоящий из» указывает, что перечисленные элементы являются требуемыми или обязательными и что никакие другие элементы не могут присутствовать. Под «по существу состоящий из» подразумевается включение любых элементов, перечисленных после выражения, и ограничение другими элементами, которые не мешают или не вносят вклад в активность или действие, указанное в описании для перечисленных элементов. Таким образом, выражение «состоящий по существу из» указывает на то, что перечисленные элементы являются требуемыми или обязательными, но что другие элементы являются необязательными и могут присутствовать или не присутствовать в зависимости от того, влияют ли они на активность или действие перечисленных элементов.

[44] Упоминание термина «например» предназначено для обозначения «например, но не ограничиваясь этим», и, таким образом, следует понимать, что все, что следует далее, является просто примером конкретного варианта реализации, но никоим образом не должно толковаться как ограничивающий пример. Если не указано иное, использование «например» предназначено для явного указания на то, что другие варианты реализации предусмотрены и охватываются настоящим изобретением.

[45] Упоминание в настоящем описании «варианта реализации» или «одного варианта реализации», или «варианта реализации», или «некоторых вариантов реализации», или «определенных вариантов реализации» означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с вариантом реализации, включены по меньшей мере в

один вариант реализации настоящего изобретения. Таким образом, при появлении выражений «в одном варианте реализации» или «в варианте реализации», или «в определенных вариантах реализации», или «в некоторых вариантах реализации» в различных местах настоящего описания необязательно все они относятся к одному и тому же варианту реализации. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим способом в одном или более вариантах реализации.

[46] «Увеличенное» или «повышенное» количество, как правило, представляет собой «статистически значимое» количество и может включать увеличение количества или уровня, описанного в настоящем документе, которое составляет 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 или 50 или более раз (например, 100, 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятичные дроби между указанными значениями и выше 1, например, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4 и т. д.). Аналогичным образом, «уменьшенный» или «сниженный», или «меньшее» количество, как правило, представляет собой «статистически значимое» количество и может включать уменьшение количества или уровня, описанного в настоящем документе, которое составляет примерно 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 или 50 или более раз (например, 100, 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятичные дроби между указанными значениями и выше 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.).

[47] В настоящем документе «необязательный» или «необязательно» означает, что описанное впоследствии событие или обстоятельства могут произойти или могут не произойти, и что описание включает случаи, когда указанное событие или обстоятельство происходит, и случаи, в которых оно не происходит.

[48] В настоящем документе «значительно» или «по существу» означает достаточную или значительную величину, количество, размер; почти полностью или полностью; например, 95% или более от некоторого заданного количества.

[49] Терминология, используемая в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения. Если не указано иное, все технические и научные термины используются в настоящем документе в значении, соответствующем обычному пониманию специалиста в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Для практической реализации настоящего изобретения могут применяться любые материалы и способы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе. При реализации настоящего изобретения могут применяться обычные методики молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и

иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Такие методики полностью объясняются в литературе, например, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al, 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993- 1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al, eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); и Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita et al, eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

[50] В настоящем документе предусмотрено, что термины «*in vitro*», «*ex vivo*» и «*in vivo*» имеют свои обычные научные значения. Соответственно, например, подразумевается, что «*in vitro*» означает эксперименты или реакции, которые происходят с выделенными клеточными компонентами, такие как, например, ферментативная реакция, выполняемая в пробирке с использованием подходящего субстрата, фермента, донора и необязательно буферов/кофакторов. Подразумевается, что «*ex vivo*» означает эксперименты или реакции, проводимые с использованием функциональных органов или клеток, которые были удалены из организма или размножены независимо от организма. Подразумевается, что «*in vivo*» означает эксперименты или реакции, которые происходят в живом организме в его нормальном интактном состоянии.

[51] В настоящем документе «млекопитающее» включает людей и как домашних животных, таких как лабораторные животные и домашние животные-компаньоны (например, кошки, собаки, свиньи, крупный рогатый скот, овцы, козы, лошади, приматы, грызуны и кролики), так и недомашних животных, таких как дикие животные и тому подобное.

[52] В настоящем документе «субъект» включает любое животное, у которого наблюдают заболевание или симптом или которое подвержено риску возникновения заболевания или симптома, которое можно лечить агентом согласно настоящему изобретению. Подходящие субъекты включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик или морская свинка), сельскохозяйственных животных и домашних животных или животных-компаньонов (таких как кошка или собака). Включены приматы, отличные от человека, и предпочтительно пациенты-люди.

[53] В настоящем документе «пролиферация» относится к способности клетки или популяции клеток делиться и расти. В настоящем документе «размножение» относится к способности клетки или популяции клеток увеличиваться в числе. В настоящем документе «дифференцироваться» или «дифференцированный» или «дифференцировка» используются для обозначения процесса и условий, при которых незрелые (неспециализированные) клетки приобретают некоторые характеристики и превращаются в зрелые (специализированные) клетки, тем самым приобретая конкретную форму и функцию. Стволовые клетки (неспециализированные) часто подвергают воздействию различных условий (например, факторов роста и морфогенных факторов), чтобы индуцировать конкретную детерминацию линии дифференцировки, или дифференцировку, указанных стволовых клеток. Например, наивная Т-клетка, которая превращается в клетку эффекторной памяти, является дифференцированной.

[54] Клеточная дифференцировка сопровождается потерей «стволовости» - способности клеток быть мультипотентными и самообновляющимися. Во время дифференцировки Т-клетки (наивная Т-клетка в стволовую Т-клетку памяти (Tscm), а затем в Т-клетку центральной памяти (Tcm), затем в Т-клетку эффекторной памяти (Tem), и затем в эффекторную Т-клетку (Teff)) происходит постепенное снижение экспрессии транскрипционного фактора TCF-1. Аналогичным образом, при хронической вирусной инфекции и в опухоли экспрессия TCF-1 снижается, когда CD8⁺ истощенные Т-клетки-предшественники (предшественник T_{ex}) дифференцируются с образованием прогениторных истощенных Т-клеток (T_{rex}), которые затем дифференцируются с образованием терминально истощенных Т-клеток (T_{tex}) (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31606264/>).

[55] Субпопуляции менее дифференцированных Т-клеток, таких как стволовые клетки памяти (TSCM) и клетки центральной памяти (TCM), имеют сниженные уровни АФК, в то время как терминально дифференцированные Т-клетки эффекторной памяти и эффекторные Т-клетки (TEM и TEFF) имеют повышенные уровни АФК, которые необходимы для их эффекторной функции, такой как цитотоксичность. Повышенный

окислительный стресс и повреждение ДНК в результате накопления АФК могут непосредственно направлять CD8⁺ Т-клетки к терминальной дифференцировке с такими характеристиками как потеря пролиферации Т-клеток, наличие эффекторной функции Т-клеток и нарушение самообновления.

[56] В настоящем документе «разобщает размножение Т-клеток и дифференцировку» используется для обозначения явления пролиферации клеток без дифференцировки, поскольку клетки без дифференцировки часто прогрессируют к состояниям дифференцировки по мере пролиферации, причем размножение и дифференцировка сопряжены. Таким образом, Т-клетки, у которых наблюдают размножение, разобщенное (например, не связанное) с дифференцировкой, будут продолжать увеличиваться в числе, сохраняя при этом стволовость. В настоящем документе «стволовость» относится к способности клеток самообновляться и образовывать дочерние клетки, способные к дифференцировке. Ряд иллюстративных методик, используемых для размножения различных недифференцированных клеток *in vitro* при сохранении стволовости, описан, например, в Shuai et al. (2016) *Theranostics*. 6(11):1899-1917; Zhang et al. (2015) *Biomaterials*. 41:15-25; и Zhang & Wang. (2013) *PLoS ONE*. 8(4): e61424.

[57] В настоящем документе термины «CD8⁺» и «CD4⁺» используются для обозначения клеток, которые экспрессируют поверхностные маркеры CD8 или CD4, где «+» обозначает наличие, а «-» обозначает отсутствие. Таким образом, в качестве альтернативы, «Tim3⁻TCF-1⁺» используется для обозначения клеток, которые не имеют или экспрессируют в незначительной степени или вообще не экспрессируют Tim3 и экспрессируют TCF-1. Кроме того, «PD-1⁺» используется для обозначения клеток, которые экспрессируют PD-1.

[58] В настоящем документе активированные Т-клетки относятся к любым Т-клеткам, вступавшим в контакт с антигенами, презентированными антигенпрезентирующими клетками, или стимулированным антителами к CD3 и CD-28. Неограничивающие примеры активированных Т-клеток включают, например, стволовые Т-клетки памяти (Tscm), Т-клетки центральной памяти (Tcm), Т-клетки эффекторной памяти, эффекторные Т-клетки, прогениторные истощенные Т-клетки (Trex) и терминально истощенные Т-клетки (Ttex).

[59] В настоящем документе выражение «разобщение размножения Т-клеток и дифференцировки» относится к явлению пролиферации клеток без дифференцировки или с меньшей степенью дифференцировки. Как правило, недифференцированные или менее дифференцированные клетки прогрессируют к различным состояниям дифференцировки и при этом проходят через процесс пролиферации, т.е. размножение и дифференцировка

клеток сопряжены. При определенных условиях, описанных в настоящем документе, Т-клетки могут размножаться при разобщении (например, становятся не связанными с ней) от дифференцировки. Число таких клеток будет увеличиваться при сохранении стволовости. В настоящем документе «стволовость» относится к способности клеток самообновляться и образовывать дочерние клетки, способные к дифференцировке. Ряд иллюстративных методик, используемых для размножения различных недифференцированных клеток *in vitro* при сохранении стволовости, описан в данной области техники. См., например, Gurusamy et al., (2020), Cancer Cell, 37, 818–833; Shuai et al. (2016) Theranostics. 6(11):1899-1917; Zhang et al. (2015) Biomaterials. 41:15-25; и Zhang & Wang. (2013) PLoS ONE. 8(4): e61424.

[60] В настоящем документе выражение «устойчивость *in vivo*» адоптивно перенесенных Т-клеток относится к длительной выживаемости и пролиферативной способности донорских Т-клеток у реципиента. «Устойчивость *in vivo*» можно количественно сравнить между различными донорскими Т-клетками путем анализа числа донорских Т-клеток в заданные моменты времени (т.е. через 7, 14, 30 или более дней после адоптивного переноса) в периферической крови, опухолевом очаге, лимфатических узлах, селезенке, печени или любых других органах реципиента, где они находятся. Ожидается, что число донорских Т-клеток с лучшей «устойчивостью *in vivo*» будет выше в упомянутых выше местах. По сравнению с необработанными контрольными Т-клетками обработанные соединением Т-клетки являются более чем на 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более устойчивыми *in vivo* после адоптивного переноса.

[61] Энхансер гомолога-2 белка Zeste (EZH2), функциональный ферментативный компонент репрессивного комплекса Polycomb 2 (PRC2), представляет собой фермент гистон-лизин-N-метилтрансферазу, кодируемый геном *Ezh2*. Он опосредует репрессию генов, катализируя триметилирование гистона H3 в Lys27 (H3K27me3). Таземетостат (TAZ) представляет собой конкурентный ингибитор кофактора S-аденозилметионина (SAM) фермента EZH2, одобренный FDA в 2020 году для лечения взрослых и подростков в возрасте 16 лет и старше с метастатической или местнораспространенной эпителиоидной саркомой, не подходящей для полной резекции. См., например, Qi et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2012;109:21360–5; Knutson et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:7922–7; Knutson et al., Mol. Cancer Ther. 2014; 13(4):842-54; и Mondello and Ansell, Expert Opin. Pharmacother. 2021; 1-7. doi: 10.1080/14656566.2021.2014815.

[62] Онкоген вируса саркомы крыс Kirsten (KRAS), член семейства RAS, кодирует сигнальную ГТФазу, которая переключается между активной ГТФ-связанной конформацией и неактивной ГДФ-связанной конформацией. Он обычно мутирован в

широком спектре видов рака. Мутация KRAS-G12C является наиболее распространенной генетической патологией, связанной с немелкоклеточным раком легких (НМРЛ), и также обнаруживается в нескольких других типах рака (хотя и с меньшей частотой), таких как аденокарцинома протоков поджелудочной железы (PDAC) и колоректальная аденокарцинома. Детектирование этого биомаркера может дать представление о прогнозе заболевания, а также о его ответе на лечение. Известно несколько низкомолекулярных соединений-ингибиторов KRAS(G12C), включая ингибитор KRAS (G12C) 12. См., например, Ostrem et al., *Nature* 503:548-51, 2013; Wang et al., *Oncotarget* 2016;7(9):10064-72; и Liu et al., *Cancer Gene Ther* (2021) <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00383-9>. Эти соединения способны блокировать KRAS в неактивном состоянии для остановки пролиферации клеток путем селективного образования ковалентной связи с цистеином 12.

[63] Спленоциты представляют собой белые клетки крови, происходящие из тканей селезенки. Спленоциты содержат различные клеточные популяции (например, Т- и В-лимфоциты, дендритные клетки и макрофаги). Наивные клетки представляют собой клетки, которые считаются незрелыми, при этом наивные Т-клетки не вступали в контакт с когнатным антигеном на периферии, в отличие от активированных или Т-клеток памяти. Наивные Т-клетки способны взаимодействовать с антигенпрезентирующими клетками (АПК), которые используют молекулу ГКГС для презентации антигена. При распознавании специфичного антигена Т-клетка будет пролиферировать и дифференцироваться в эффекторные Т-клетки конкретного типа. Для осуществления иммунной функциональной способности эффекторные Т-клетки будут взаимодействовать с клетками хозяина.

[64] В настоящем документе «активация» или «активированный» относится к изменению относительно состояния наивной, или непраймированной, Т-клетки, причем наивная Т-клетка вступает в контакт с конкретными молекулами, что приводит к реорганизации сигнальных молекул Т-клетки, что в конечном итоге приводит к селективной пролиферации антиген-специфичных Т-клеток. Процесс активации обычно включает процессинг и презентацию антигена антигенпрезентирующими клетками, которые экспонируют антигены в виде пептидов, связанных с ГКГС; специфичное связывание Т-клеточного рецептора с антигеном одновременно со связыванием корецепторов CD4 и CD8; костимуляцию Т-клеток антигенпрезентирующими клетками посредством взаимодействия между B7 (CD80/CD86) на дендритных клетках и CD28 на Т-клетках; и дифференцировку посредством сигнальных путей цитокинов во время активации. В настоящем документе «активирующий агент» используется для описания любого соединения или молекулы, способной стимулировать активацию Т-клетки.

Активирующие агенты включают, но не ограничиваются перечисленными, пептидный антиген, антигенпрезентирующие клетки, анти-CD3, анти-CD28, форбол-12-миристат-13-ацетат (РМА) и иономицин.

[65] Адаптивная иммунная система содержит специфические иммунные клетки, которые включают Т-клетки или Т-лимфоциты. Функция этих клеток заключается в распознавании антигена, регуляции иммунного ответа, выработке цитокинов, активации других иммунных клеток и нейтрализации клеток-мишеней. Т-клетки включают регуляторные, хелперные, цитотоксические Т-клетки или Т-клетки памяти. Т-клетки происходят из гемопоэтических стволовых клеток, которые образуются в костном мозге, а затем перемещаются в тимус для созревания. После созревания Т-клетки перемещаются в периферические ткани и циркулируют в лимфатической или кровеносной системах. Наивные Т-клетки из периферической крови при контакте с антигеном подвергаются активации и дифференцируются в стволовые Т-клетки памяти (Tscm), Т-клетки центральной памяти (Tcm), Т-клетки эффекторной памяти (Tem) и эффекторные Т-клетки (Teff). Т-клетки, которые характеризуются большей степенью дифференцировки, обладают большим старением, истощением и эффекторной функцией, но ограниченной терапевтической эффективностью, самообновлением и выживаемостью. И наоборот, Т-клетки, которые характеризуются меньшей степенью дифференцировки, обладают большей терапевтической эффективностью, самообновлением и выживаемостью, но ограниченным старением, истощением и эффекторной функцией. Недавнее исследование дифференцировки наивных Т-клеток от размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) выявило подобные истощенным Т-клетки памяти (Trex) и истощенные CD8 (Ttex) Т-клетки, причем Trex-клетки характеризуются ограниченной дифференцировкой, обеспечивающей баланс между терапевтической эффективностью, самообновлением, выживаемостью, старением, истощением и эффекторной функцией. Т-клетки в основном обнаруживаются в лимфоидных тканях (например, костном мозге, селезенке, миндалинах и лимфатических узлах), при этом большое число также присутствует в слизистых оболочках (например, в легких и кишечнике), коже и периферической крови. Наивные Т-клетки обнаруживаются в крови, лимфе и вторичных лимфоидных органах. В настоящем документе «содержащая Т-клетки ткань» относится к любой ткани субъекта, содержащей Т-клетки. Согласно некоторым вариантам реализации содержащая Т-клетки ткань содержит спленоциты, ткань лимфатических узлов или моноклеарные клетки периферической крови (МКПК). Согласно некоторым вариантам реализации содержащая Т-клетки ткань содержит наивные Т-клетки. Согласно некоторым вариантам реализации содержащая Т-клетки ткань содержит опухолевую ткань или

дренирующие опухоль лимфатические узлы опухолевой ткани. Согласно некоторым вариантам реализации содержащая Т-клетки ткань содержит опухолевые ткани или Т-клетки субъекта, имеющего или предположительно имеющего хроническую инфекцию или злокачественное новообразование.

[66] В настоящем документе «менее дифференцированное состояние» относится к состоянию Т-клеток, обладающих относительно более высокими уровнями экспрессии TCF-1, или к состоянию Т-клеток на более ранней стадии траектории дифференцировки. Например, если Т-клетка А экспрессирует на 10% больше TCF-1, чем Т-клетка В, то Т-клетка А считается менее дифференцированной, чем Т-клетка В. Аналогичным образом, прогениторные истощенные Т-клетки (Т_{рег}) менее дифференцированы, чем терминально истощенные Т-клетки (Т_{tex}). Стволовые Т-клетки памяти (Т_{scm}) и Т-клетки центральной памяти (Т_{cm}) менее дифференцированы, чем эффекторные Т-клетки (Т_{eff}). Т-клетки памяти являются CD3⁺ и CD4⁺ или CD8⁺. Т_{scm}-клетки представляют собой антиген-специфичные Т-клетки, которые остаются в биологических системах в течение длительных периодов времени после первичного воздействия антигена и могут быть превращены в эффекторные Т-клетки при повторном воздействии антигена. У людей Т_{scm}-клетки могут иметь характерные маркеры, содержащие CCR7⁺, CD45RA⁻, CD45RO⁺, CD62L⁺ и CD27⁺. У мышей Т_{scm}-клетки могут иметь характерные маркеры, содержащие CC44⁺ и CD62L⁺. Т_{scm}-клетки представляют собой прогениторные клетки, которые являются мультипотентными и могут как самообновляться, так и функционировать для обеспечения более дифференцированных субпопуляций Т-клеток памяти. У человека Т_{scm}-клетки могут иметь характерные маркеры, содержащие CD45RA⁺, CD45RO⁻, CCR7⁺, CD62L⁺, CD27⁺, CD28⁺, CD95⁺ и 7Rα⁺. У мышей Т_{scm}-клетки могут иметь характерные маркеры, содержащие CD44⁻ и CD62L⁺. Согласно некоторым вариантам реализации «менее дифференцированное состояние» Т-клеток может относиться к состоянию Т-клеток, обладающих относительно более высокими уровнями экспрессии TCF-1, или к состоянию Т-клеток на более ранней стадии траектории дифференцировки. Например, если Т-клетка А экспрессирует на 10% больше TCF-1, чем Т-клетка В, то Т-клетка А считается менее дифференцированной, чем Т-клетка В. Аналогичным образом, Т_{scm}- и Т_{cm}-клетки менее дифференцированы, чем Т_{eff}-клетки. Прогениторные истощенные Т-клетки (Т_{рег}) менее дифференцированы, чем терминально истощенные Т-клетки (Т_{tex}). Как описано в настоящем документе, несколько соединений способны поддерживать активированные Т-клетки в менее дифференцированном состоянии. По сравнению с необработанными контрольными Т-клетками обработанные соединением Т-

клетки могут быть менее чем на 75%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% или 10% менее дифференцированными.

[67] В настоящем документе термин «истощенный» или «истощение», если не указано иное, обычно относится к эффекторным Т-клеткам со сниженной способностью секретировать цитокины (например, IL-2), сниженной способностью к пролиферации и повышенной экспрессией ингибирующих рецепторов (например, PD-1, Tim-3, LAG-3). Истощение характеризуется прогрессирующей потерей эффекторных функций Т-клеток, причем при определенных условиях (т.е. при постоянном воздействии антигенов) Т-клетки становятся неспособными к развитию связанных с эффекторами видов активности, включая продукцию популяций эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти. Ответы истощенных Т-клеток наблюдали при различных обстоятельствах, включая, но не ограничиваясь ими, инфекцию вируса *лимфоцитарного хориоменингита* (LCMV), инфекцию вируса полиомы, аденовирусную инфекцию, инфекцию штамма вируса лейкоза Friend, инфекцию вируса гепатита мыши, инфекцию вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), инфекцию вируса гепатита В (ВГВ), инфекцию вируса гепатита С (ВГС), а также описаны у субъектов со злокачественными новообразованиями.

[68] Прогениторные истощенные Т-клетки или подобные истощенным Т-клетки памяти (Трех) включают клетки, которые представляют собой Tim3⁻TCF-1⁺. Они представляют собой субпопуляцию дисфункциональных CD8⁺ Т-клеток, идентифицированных в моделях на животных, инфицированных вирусом, у пациентов и в опухолях, которые экспрессируют транскрипционный фактор TCF-1 без экспрессии иммунного регуляторного белка Tim-3 или с базальными уровнями экспрессии Tim-3. Эти Т-клетки проявляют свойства, подобные таковым стволовых клеток: они могут продуцировать терминально дифференцированные клетки и воспроизводить сами себя во время деления клеток (самообновление) в микроокружении опухоли. Прогениторные истощенные Т-клетки обеспечивают пролиферативный взрыв и эффекторную функцию после анти-PD-1/PD-L1 терапии, в то время как терминально истощенные Т-клетки, которые экспрессируют высокие уровни Tim-3 без экспрессии TCF-1 (TCF-1⁻Tim-3⁺), не отвечают на блокаду PD-1 и являются короткоживущими. CD8⁺ Т-клетки, которые представляют собой Tim-3⁻TCF-1⁺, дифференцируются в переходное состояние, которое сначала представляет собой Tim3⁻TCF-1⁻, а затем в Tim-3⁺ TCF-1⁻ Т-клетки.

[69] В настоящем документе термин «выделенный» используется для обозначения молекул или клеток, которые удалены из нативной среды. В настоящем документе термин «не встречающийся в природе» используется для обозначения выделенных молекул или

клеток, которые имеют структуры, заметно отличающиеся от аналогов, встречающихся в природе.

[70] В настоящем документе композиция, содержащая «клеточную популяцию» или «очищенную клеточную популяцию» или «очищенную клеточную композицию», содержащую конкретную клетку, означает, что по меньшей мере 30%, 50%, 60%, как правило, по меньшей мере 70% и более предпочтительно 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или более клеток в композиции относятся к идентифицированному типу.

[71] В настоящем описании любой концентрационный диапазон, процентный диапазон, диапазон соотношений или диапазон целых чисел следует понимать, как включающий значение любого целого числа в пределах указанного диапазона и, при необходимости, его доли (например, одну десятую и одну сотую целого числа), если не указано другое. Термин «примерно», когда он непосредственно предшествует числу или цифровому значению, может означать, что число или цифровое значение находится в диапазоне плюс или минус 1%, плюс или минус 5%, плюс или минус 10%.

[72] Термин «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота» используется в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из нуклеотидов, который может представлять собой мРНК, РНК, кРНК, кДНК или ДНК. Термин, как правило, относится к полимерной форме нуклеотидов из по меньшей мере 10 оснований в длину, либо рибонуклеотидов, либо дезоксинуклеотидов, либо модифицированной формы любого типа нуклеотида. Термин включает одно- и двухцепочечные формы ДНК.

[73] Термины «полипептид», «пептид» или «белок» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения линейного ряда аминокислотных остатков, связанных друг с другом пептидными связями между альфа-аминогруппами и карбоксильными группами соседних остатков. Остатки аминокислот обычно находятся в природной «L»-изомерной форме. Однако остатки в «D»-изомерной форме могут быть заменены любым остатком L-аминокислоты, при условии, что полипептид сохраняет желаемое функциональное свойство.

[74] В настоящем документе подразумевается, что «антитело» означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR), который специфично связывается или специфично взаимодействует с целевым антигеном. Термин «антитело» включает полноразмерные молекулы иммуноглобулина, содержащие две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (которая может сокращенно обозначаться как HCVR, VH или VH) и

константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи обычно содержит три домена - CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (которая может сокращенно обозначаться как LCVR, VL, VK, VK или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи, как правило, будет содержать один домен (CL1). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность участками (CDR), которые чередуются с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR).

[75] Термины «хозяин», «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают «трансформантов», «трансформированные клетки» или «сконструированные клетки», которые включают первичную трансформированную клетку и полученное из нее потомство без учета числа пассажей. Потомство может быть не полностью идентичным по содержанию нуклеиновой кислоты родительской клетке и может содержать мутации. В настоящий документ включено мутантное потомство, которое обладает той же функцией или биологической активностью, которую выявили с помощью скрининга или селекции в первоначально трансформированной клетке. Клетка-хозяин представляет собой любой тип клеточной системы, который можно применять для создания антигенсвязывающих молекул согласно настоящему изобретению. Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, такие как, но не ограничиваясь ими, Т-клетки.

[76] В настоящем документе термины «вектор» и «конструкция», которые используются взаимозаменяемо, могут представлять собой молекулы нуклеиновой кислоты, предпочтительно молекулы ДНК, полученные, например, из плазмиды, бактериофага или вируса, в которые может быть вставлена или клонирована последовательность нуклеиновой кислоты. Вектор может содержать один или более уникальных сайтов рестрикции и может быть способен к автономной репликации в определенной клетке-хозяине, включая целевую клетку или ткань или прогениторную клетку или полученную из нее ткань, или может быть интегрирован с геномом определенного хозяина так, что клонированная последовательность является воспроизводимой. Соответственно, вектор может представлять собой автономно реплицирующийся вектор, т.е. вектор, существующий в виде внехромосомного элемента, репликация которого не зависит от хромосомной репликации, например, линейной или замкнутой кольцевой плазмиды, внехромосомного элемента, минихромосомы или

искусственной хромосомы. Вектор может содержать любые средства для обеспечения саморепликации. В качестве альтернативы, вектор может представлять собой вектор, который при введении в клетку-хозяина интегрируется в геном и реплицируется вместе с хромосомой(ами), в которую он интегрирован. Векторная система может содержать один вектор или плазмиду, два или более векторов или плазмид, которые вместе содержат общую ДНК, подлежащую введению в геном клетки-хозяина, или транспозон. Выбор вектора, как правило, будет зависеть от совместимости вектора с клеткой-хозяином, в которую должен быть введен вектор. Вектор также может включать селективный маркер, такой как ген устойчивости к антибиотикам, который можно применять для отбора подходящих трансформантов. Специалистам в данной области техники хорошо известны примеры таких генов устойчивости. Согласно некоторым вариантам реализации векторы применяют для создания сконструированной НК-клетки или сконструированной макрофагальной клетки согласно настоящему изобретению.

[77] В настоящем документе, если не описано иное в отношении вирусных векторов, «вектор» означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Примерные векторы включают плазмиды, миникольца, транспозоны, дрожжевые искусственные хромосомы, самореплицирующиеся РНК и вирусные геномы. Некоторые векторы могут автономно реплицироваться в клетке-хозяине, в то время как другие векторы могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина и реплицироваться таким образом с геномом хозяина. Кроме того, в настоящем документе некоторые векторы называются «рекомбинантными векторами экспрессии» (или просто «векторами экспрессии»), которые содержат последовательности нуклеиновых кислот, которые функционально связаны с последовательностью контроля экспрессии и, следовательно, способны управлять экспрессией этих последовательностей. Согласно определенным вариантам реализации экспрессионные конструкции получают из плазмидных векторов. Иллюстративные конструкции включают модифицированный вектор pNASS (Clontech, Пало-Альто, Калифорния), который имеет последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие ген устойчивости к ампициллину, сигнал полиаденилирования и сайт промотора T7; pDEF38 и pNEF38 (CMC ICOS Biologies, Inc.), которые имеют промотор CHEF1; и pD18 (Lonza), который имеет промотор ЦМВ. Другие подходящие векторы экспрессии у млекопитающих хорошо известны (см., например, Ausubel et al, 1995; Sambrook et al, выше; см. также, например, каталоги от Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния; Novagen, Мадисон, Висконсин; Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси).

[78] В настоящем документе «экспрессионная конструкция» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая содержит кодирующие последовательности для

терапевтического белка, промотор и может включать другие регуляторные последовательности для них, причем кассета может быть сконструирована в виде генетического элемента и/или упакована в капсид вирусного вектора (например, вирусной частицы). Как правило, такая экспрессионная кассета для создания вирусного вектора содержит последовательности конструкций, описанные в настоящем документе, фланкированные сигналами упаковки вирусного генома, и другие последовательности контроля экспрессии, такие как те, которые описаны в настоящем документе. Любая из последовательностей контроля экспрессии может быть оптимизирована для конкретного вида с применением методик, известных в данной области техники, включая, например, оптимизацию кодонов.

[79] Под «контрольным элементом», «контрольной последовательностью», «регуляторной последовательностью» и т.п. в контексте настоящего документа понимают последовательность нуклеиновой кислоты (например, ДНК), необходимую для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретной клетке-хозяине. Контрольные последовательности, которые подходят для прокариотических клеток, например, включают промотор и необязательно цис-действующую последовательность, такую как последовательность оператора и сайт связывания рибосомы. Контрольные последовательности, которые подходят для эукариотических клеток, включают транскрипционные контрольные последовательности, такие как промоторы, сигналы полиаденилирования, транскрипционные энхансеры, трансляционные контрольные последовательности, такие как трансляционные энхансеры и участки внутренней посадки рибосомы (IRES), последовательности нуклеиновых кислот, которые модулируют стабильность мРНК, а также нацеливающие последовательности, которые нацеливают продукт, кодируемый транскрибируемым полинуклеотидом, во внутриклеточный компартмент внутри клетки или во внеклеточную среду.

[80] В настоящем документе «представляющий интерес ген» или «ген» или «представляющая интерес нуклеиновая кислота» относится к трансгену, который должен быть экспрессирован в целевой трансфицированной клетке. Хотя может быть использован термин «ген», это не подразумевает, что он представляет собой ген, который обнаруживается в геномной ДНК, и используется взаимозаменяемо с термином «нуклеиновая кислота». Обычно представляющая интерес нуклеиновая кислота обеспечивает подходящую нуклеиновую кислоту для кодирования терапевтического агента и может содержать кДНК или ДНК и может включать, но обязательно, интроны, но обычно не включает интроны. Как отмечено в другом месте, представляющая интерес нуклеиновая кислота функционально связана с последовательностями контроля

экспрессии для эффективной экспрессии представляющего интерес белка в целевой клетке. Согласно некоторым вариантам реализации векторы, описанные в настоящем документе, могут содержать один или более генов, представляющих интерес, и могут включать 2, 3, 4 или 5 или более генов, представляющих интерес.

[81] Таким образом, согласно настоящему изобретению предложены полинуклеотиды (выделенные или очищенные или чистые полинуклеотиды), кодирующие терапевтические агенты (например, представляющие интерес белки) согласно настоящему изобретению для генетической модификации прогениторных истощенных Т-клеток, размноженных с помощью способов, описанных в настоящем документе, векторы (включая векторы клонирования и векторы экспрессии), содержащие такие полинуклеотиды, и клетки (например, клетки-хозяева), трансформированные или трансфицированные полинуклеотидом или вектором в соответствии с настоящим изобретением. Согласно определенным вариантам реализации предусмотрен полинуклеотид (ДНК или РНК), кодирующий представляющий интерес белок согласно настоящему изобретению. В настоящем документе также предусмотрены экспрессионные кассеты, кодирующие представляющие интерес белки.

[82] Настоящее изобретение также относится к векторам, которые включают полинуклеотид согласно настоящему изобретению, и, в частности, к рекомбинантным экспрессионным конструкциям. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий белок согласно настоящему изобретению, наряду с другими полинуклеотидными последовательностями, которые вызывают или облегчают транскрипцию, трансляцию и процессинг таких кодирующих белок последовательностей. Подходящие векторы клонирования и экспрессии для применения с прокариотическими и эукариотическими хозяевами описаны, например, в Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, (1989). Примерные векторы клонирования/экспрессии включают векторы клонирования, челночные векторы и экспрессионные конструкции, которые могут быть основаны на плазмидах, фагмидах, фазмидах, космидах, вирусах, искусственных хромосомах или любом носителе нуклеиновой кислоты, известном в данной области техники, подходящем для амплификации, переноса и/или экспрессии содержащегося в нем полинуклеотида.

[83] Обычно рекомбинантные векторы экспрессии будут включать точки начала репликации и селективные маркеры, позволяющие трансформировать клетку-хозяина, и промотор, полученный из гена с высоким уровнем экспрессии, для управления транскрипцией нижележащей структурной последовательности, как описано выше.

Вектор в функциональной связи с полинуклеотидом в соответствии с настоящим изобретением дает конструкцию для клонирования или экспрессии. Примерные конструкции для клонирования/экспрессии содержат по меньшей мере один элемент контроля экспрессии, например, промотор, функционально связанный с полинуклеотидом согласно настоящему изобретению. Дополнительные элементы контроля экспрессии, такие как энхансеры, фактор-специфичные сайты связывания, терминаторы и сайты связывания рибосомы, также предусмотрены в векторах и конструкциях для клонирования/экспрессии в соответствии с настоящим изобретением. Гетерологичную структурную последовательность полинуклеотида в соответствии с настоящим изобретением собирают в соответствующей фазе с последовательностями инициации и терминации трансляции. Таким образом, например, кодирующие нуклеиновые кислоты, предложенные в настоящем документе, могут быть включены в любую из множества конструкций вектора экспрессии (например, миникольца) в качестве рекомбинантной экспрессионной конструкции для экспрессии такого белка в клетке-хозяине.

[84] Соответствующая последовательность(и) ДНК может быть вставлена в вектор, например, различными способами. В целом, последовательность ДНК встраивают в соответствующий сайт(ы) расщепления рестрикционной эндонуклеазы с помощью способов, известных в данной области техники. Предусмотрены стандартные методики клонирования, выделения, амплификации и очистки ДНК, методики ферментативных реакций, включающих ДНК-лигазу, ДНК-полимеразу, рестрикционные эндонуклеазы и т.п., а также различные методики разделения. Ряд стандартных методик описан, например, в Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA, 1993); Sambrook et al. (Molecular Cloning, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY, 1989); Maniatis et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY, 1982); Glover (Ed.) (DNA Cloning Vol. I and II, IRL Press, Oxford, UK, 1985); Hames and Higgins (Eds.) (Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, UK, 1985); и в других местах.

[85] Последовательность ДНК в векторе экспрессии функционально связана по меньшей мере с одной подходящей последовательностью контроля экспрессии (например, конститутивным промотором или регулируемым промотором) для управления синтезом мРНК. Типичные примеры таких последовательностей контроля экспрессии включают промоторы эукариотических клеток или их вирусов, как описано выше. Промоторные области могут быть выбраны из любого желаемого гена с использованием векторов САТ (хлорамфениколтрансфераза), канамициновых векторов или других векторов с селективными маркерами. Эукариотические промоторы включают немедленный ранний

промотор ЦМВ, промотор тимидинкиназы HSV, ранний и поздний промотор SV40, LTR из ретровируса, ЕЕК, EF1-альфа и мышинный промотор металлотионеина-1. Выбор соответствующего вектора и промотора находится в пределах компетенции обычного специалиста в данной области техники, и получение некоторых особенно предпочтительных рекомбинантных экспрессионных конструкций, содержащих по меньшей мере один промотор или регулируемый промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок или полипептид в соответствии с настоящим изобретением, описано в настоящем документе.

[86] Также предусмотрены варианты полинуклеотидов согласно настоящему изобретению. Варианты полинуклеотидов по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% и предпочтительно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичны одному из полинуклеотидов с определенной последовательностью, описанных в настоящем документе, или который гибридизуется с одним из этих полинуклеотидов с определенной последовательностью в жестких условиях гибридизации 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия при примерно 65-68°C или 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия и 50% формамида при примерно 42°C. Варианты полинуклеотидов сохраняют способность кодировать связывающий домен или его слитый белок, обладающий функциональностью, описанной в настоящем документе.

[87] Согласно некоторым вариантам реализации клетки трансфицируют или иным образом конструируют (например, путем нацеленной интеграции трансгена) перед активацией. Согласно некоторым вариантам реализации клетки трансфицируют или иным образом конструируют (например, путем нацеленной интеграции трансгена) во время активации. Согласно некоторым вариантам реализации клетки трансфицируют или иным образом конструируют (например, путем нацеленной интеграции трансгена) после активации. Согласно некоторым вариантам реализации клетки трансфицируют или иным образом конструируют (например, путем нацеленной интеграции трансгена) перед дифференцировкой. Согласно некоторым вариантам реализации клетки трансфицируют или иным образом конструируют (например, путем нацеленной интеграции трансгена) во время дифференцировки. Согласно некоторым вариантам реализации клетки трансфицируют или иным образом конструируют (например, путем нацеленной интеграции трансгена) после дифференцировки.

[88] Согласно некоторым вариантам реализации невирусный вектор применяют для доставки ДНК или РНК в Т-клетки. Например, системы, которые могут облегчать трансфекцию Т-клеток без необходимости в системе вирусной интеграции включают, без ограничения, транспозоны, нуклеазы с цинковым пальцем (ZFN), нуклеазы на основе

эффектора, подобного активаторам транскрипции (TALEN), кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными промежутками (CRISPR) (включая, но не ограничиваясь ими, Cas9 или CasX), мегануклеазы, миникольца, репликоны, искусственные хромосомы (например, бактериальные искусственные хромосомы, искусственные хромосомы млекопитающих и искусственные хромосомы дрожжей), плазмиды, космиды и бактериофаг.

[89] Согласно некоторым вариантам реализации не зависящие от вируса векторные системы также могут быть доставлены посредством вирусного вектора, известного в данной области техники или описанного ниже. Например, в некоторых вариантах реализации вирусный вектор (например, ретровирус, лентивирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус) применяют для доставки одного или более невирусных векторов, таких как, например, одна или более из вышеупомянутых нуклеаз с цинковым пальцем (ZFN), нуклеаз на основе эффектора, подобного активаторам транскрипции (TALEN), кластерных коротких палиндромных повторов, разделенных регулярными промежутками (CRISPR), мегануклеаз или любых других ферментов/комплементарных векторов, полинуклеотидов и/или полипептидов, способных облегчать нацеленную интеграцию. Соответственно, в некоторых вариантах реализации клетка (например, Т-клетка) может быть сконструирована для экспрессии экзогенной последовательности с помощью способа нацеленной интеграции. Такие способы известны в данной области техники и могут включать расщепление эндогенного локуса в клетке с использованием одной или более нуклеаз (например, ZFN, TALEN, CRISPR/Cas, мегануклеаз) и введение трансгена в клетку таким образом, чтобы он был интегрирован в эндогенный локус и экспрессировался в клетке. Трансген может быть включен в донорную последовательность, которая интегрирована в ДНК клетки-хозяина в точке расщепления нуклеазой или вблизи нее. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетки получали путем редактирования гена генома Т-клеток или путем нацеленной интеграции в геном Т-клетки полинуклеотидной последовательности.

[90] Согласно некоторым вариантам реализации нацеленная интеграция включает опосредуемую нуклеазой с цинковым пальцем интеграцию гена, опосредуемую CRISPR интеграцию гена или редактирование гена, опосредуемую нуклеазой TALE интеграцию гена или опосредуемую мегануклеазой интеграцию гена. Согласно некоторым вариантам реализации нацеленная интеграция полинуклеотида происходит посредством гомологичной рекомбинации. Согласно некоторым вариантам реализации нацеленная интеграция включает опосредуемую вирусным вектором доставку нуклеазы, способной индуцировать расщепление ДНК в целевом сайте. Согласно некоторым вариантам

реализации нуклеаза представляет собой нуклеазу с цинковым пальцем, нуклеазу Cas, нуклеазу TALE или мегануклеазу.

[91] Интеграция экзогенной последовательности может происходить посредством рекомбинации. Как будет понятно специалисту в данной области техники, «рекомбинация» относится к процессу обмена генетической информацией между двумя полинуклеотидами, включая, но не ограничиваясь этим, захват донора путем нехомологичного соединения концов (NHEJ) и гомологичную рекомбинацию. Рекомбинация может представлять собой гомологичную рекомбинацию. Для целей настоящего раскрытия «гомологичная рекомбинация (HR)» относится к специализированной форме такого обмена, который происходит, например, во время репарации двухцепочечных разрывов в клетках с помощью механизмов репарации, направляемой гомологией. В этом процессе используется гомология нуклеотидной последовательности, при этом «донорная» молекула (например, донорная полинуклеотидная последовательность или донорный вектор, содержащий такую последовательность) используется механизмом репарации ДНК клетки в качестве матрицы для репарации молекулы-«мишени» (т.е. той, в которой возник двухцепочечный разрыв), и с помощью этих средств генетическая информация переносится от донора к мишени. Согласно некоторым вариантам реализации HR-направленной интеграции донорная молекула может содержать по меньшей мере 2 области гомологии с геномом («плечи гомологии»). Согласно некоторым вариантам реализации плечи гомологии могут иметь, например, по меньшей мере 50-100 пар оснований в длину. Плечи гомологии могут иметь существенную гомологию ДНК с областью геномной ДНК, фланкирующей сайт расщепления, в котором должна происходить нацеленная интеграция. Плечи гомологии донорной молекулы могут фланкировать ДНК, которая должна быть интегрирована в целевой геном или целевой локус ДНК. Разрушение хромосомы с последующей репарацией с использованием гомологичной области плазмидной ДНК в качестве матрицы может привести к переносу промежуточного трансгена, фланкированного плечами гомологии, в геном. См., например, Roller et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86(22): 8927-8931; Thomas et al. (1986) Cell 44(3):419-428. Частота этого типа направляемой гомологией нацеленной интеграции может быть увеличена до 10⁵ раз путем преднамеренного создания двухцепочечного разрыва в непосредственной близости от целевой области (Hockemeyer et al. (2009) Nature Biotech. 27(9):851-857; Lombardo et al. (2007) Nature Biotech. 25(11): 1298-1306; Moehle et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104(9):3055-3060; Rouet et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (13):6064~6068).

[92] Любая нуклеаза, способная опосредовать нацеленное расщепление геномного локуса таким образом, что трансген может быть интегрирован в геном целевой клетки (например, путем рекомбинации, такой как HR), может быть использована при конструировании клетки (например, Т-клетки) в соответствии с настоящим изобретением.

[93] Двухцепочечный разрыв (ДЦР) или ник может быть создан сайт-специфичной нуклеазой, такой как нуклеаза с цинковым пальцем (ZFN), нуклеаза на основе домена TAL-эффектора (TALEN), мегануклеаза, или с использованием CRISPR-опосредуемой системы со сконструированной sgPHK/tractPHK (одиночная направляющая PHK) для направления специфичного расщепления. См., например, Burgess (2013) *Nature Reviews Genetics* 14:80-81, µMov et al. (2010) *Nature* 435(7042):646-51; публикации патентов США №№ 2003/0232410; 2005/0208489; 2005/0026157, 2005/0064474; 2006/0188987, 2009/0263900; 2009/0117617; 2010/0047805; 2011/0207221; 2011/0301073 и международную публикацию патента № WO 2007/014275, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

[94] Согласно некоторым вариантам реализации клетка (например, Т-клетка) сконструирована посредством опосредуемой нуклеазой с цинковым пальцем нацеленной интеграции донорной конструкции. Нуклеаза с цинковым пальцем (ZFN) представляет собой фермент, который способен распознавать и расщеплять нуклеотидную последовательность-мишень со специфичностью, обусловленной связыванием «ДНК-связывающего белка с цинковым пальцем» (ZFP) (или связывающего домена), который связывает ДНК специфичным для последовательности образом посредством одного или более цинковых пальцев, и нуклеазный фермент. ZFN могут содержать любые подходящие домены расщепления (например, фермент нуклеазу), функционально связанные с ДНК-связывающим доменом ZFP с образованием сконструированного ZFN, который может облегчать сайт-специфичное расщепление целевой последовательности ДНК (см., например, Kim et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93(3): 1156-1160). Например, ZFN могут содержать специфичный в отношении мишени ZFP, связанный с ферментом FOKI или частью фермента FOK1. Согласно некоторым вариантам реализации в ZFN, используемом в ZFN-опосредуемом подходе к нацеленной интеграции, применяются две отдельные молекулы, каждая из которых содержит субъединицу фермента FOK1, каждая из которых связана с ZFP, причем каждый ZFP обладает специфичностью в отношении последовательности ДНК, фланкирующей целевой сайт расщепления, и когда два ZFP связываются со своими соответствующими целевыми сайтами ДНК, субъединицы фермента FOK1 сближаются и связываются между собой, активируя нуклеазную активность, которая расщепляет целевой сайт расщепления. ZFN используются для

модификации генома у различных организмов (например, публикации патентов США 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060188987; 20060063231; и международная публикация WO 07/014275, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Изготовленные на заказ ZFP и ZFN доступны коммерчески, например, от Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури), и любое местоположение ДНК рутинно может быть мишенью и расщеплено с использованием таких изготовленных на заказ ZFN.

[95] Согласно некоторым вариантам реализации клетка (например, Т-клетка) сконструирована за счет CRISPR-опосредуемой (например, CRISPR/Cas) нуклеаза-опосредуемой интеграции донорной конструкции. Нуклеазная система CRISPR (кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными промежутками)/Cas (CRISPR-связанный) представляет собой сконструированную нуклеазную систему на основе бактериальной системы, которая может быть использована для геномной инженерии. Она основана на части адаптивного иммунного ответа многих бактерий и архей. Когда вирус или плазмида вторгается в бактерию, сегменты ДНК захватчика превращаются в РНК CRISPR (сгРНК) с помощью «иммунного» ответа. Затем эта сгРНК связывается посредством области частичной комплементарности с другим типом РНК, называемой trасгРНК, для направления нуклеазы Cas (например, Cas9) в область, гомологичную сгРНК в ДНК-мишени, называемую «протоспейсером». Cas расщепляет ДНК с образованием тупых концов в двухцепочечном разрыве в сайтах, указанных 20-нуклеотидной направляющей последовательностью, содержащейся в транскрипте сгРНК. Cas нуждается как в сгРНК, так и в trасгРНК для сайт-специфичного распознавания и расщепления ДНК. Эта система в настоящее время сконструирована таким образом, что сгРНК и trасгРНК могут быть объединены в одну молекулу («одиночная направляющая РНК»), и эквивалентная часть сгРНК одиночной направляющей РНК может быть сконструирована для направления нуклеазы Cas для нацеливания на любую желаемую последовательность (см. Jinek et al (2012) Science 337, p. 816-821, Jinek et al, (2013), eLife 2:e00471, и David Segal, (2013) eLife 2:e00563). Таким образом, система CRISPR/Cas может быть сконструирована для создания ДЦР в желаемой мишени в геноме, и на восстановление ДЦР можно влиять путем использования ингибиторов репарации, чтобы вызвать усиление подверженной ошибкам репарации. Согласно некоторым вариантам реализации в интеграции, опосредуемой нуклеазой CRISPR/Cas, используется CRISPR II типа. CRISPR типа II является одной из наиболее хорошо охарактеризованных систем и выполняет нацеленный двухцепочечный разрыв ДНК в четыре последовательных этапа. Во-первых, две некодирующие РНК, массив пре-

crPНК и tracrPНК, транскрибируются из локуса CRISPR. Во-вторых, tracrPНК гибридизуется с областями повторов пре-crPНК и опосредует процессинг пре-crPНК в зрелые crPНК, содержащие отдельные спейсерные последовательности. В-третьих, комплекс зрелая crPНК:tracrPНК направляет Cas к целевой ДНК посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику между спейсером на crPНК и протоспейсером на целевой ДНК рядом с мотивом, прилегающим к протоспейсеру (PAM), что является дополнительным требованием для распознавания мишени. В-четвертых, Cas опосредует расщепление целевой ДНК с созданием двухцепочечного разрыва в протоспейсере.

[96] Cas-связанная система CRISPR/Cas содержит два некодирующих PНК-компонента: tracrPНК и массив пре-crPНК, содержащий направляющие нуклеазу последовательности (спейсеры), между которыми расположены идентичные прямые повторы (DR). Чтобы использовать систему CRISPR/Cas для осуществления геномной инженерии, должны присутствовать обе функции этих PНК (см. Cong et al, (2013) Scienceexpress 1/10.1126/science 1231143). Согласно некоторым вариантам реализации tracrPНК и пре-crPНК поставляются посредством отдельных экспрессионных конструкций или в виде отдельных PНК. Согласно другим вариантам реализации конструируют химерную PНК, при этом сконструированную зрелую crPНК (обеспечивающую специфичность в отношении мишени) сливают с tracrPНК (обеспечивающей взаимодействие с Cas) с созданием химерного гибрида crPНК-tracrPНК (также называемого одиночной направляющей PНК). (Jinek, там же, и Cong, там же).

[97] Согласно некоторым вариантам реализации одиночная направляющая PНК, содержащая как crPНК, так и tracrPНК, может быть сконструирована таким образом, чтобы направлять нуклеазу Cas для нацеливания на любую желаемую последовательность (например, Jinek et al (2012) Science 337, p. 816-821, Jinek et al, (2013), eLife 2:e00471, David Segal, (2013) eLife 2:e00563). Таким образом, система CRISPR/Cas может быть сконструирована для создания ДЦР в желаемой мишени в геноме.

[98] Изготовленные на заказ системы CRISPR/Cas коммерчески доступны, например, от Dharmacon (Лафайетт, Колорадо), и любое положение ДНК рутинно может быть мишенью и расщеплено с использованием таких изготовленных на заказ последовательностей одиночной направляющей PНК. Одноцепочечные ДНК-матрицы для рекомбинации могут быть синтезированы (например, с помощью способов синтеза олигонуклеотидов, известных в данной области техники и коммерчески доступных) или обеспечены в векторе, например, вирусном векторе, таком как AAV. Согласно некоторым вариантам реализации клетка (например, Т-клетка) сконструирована с помощью опосредуемой нуклеазой TALE (TALEN) нацеленной интеграции донорной конструкции. «ДНК-

связывающий домен TALE» или «TALE» представляет собой полипептид, содержащий один или более доменов/звеньев повтора TALE. Домены повтора участвуют в связывании TALE с последовательностью его когнатной ДНК-мишени. Одно «звено повтора» (также называемое «повтором»), как правило, представляет собой 33-35 аминокислот в длину и характеризуется по меньшей мере некоторой гомологией последовательности с другими последовательностями повторов TALE во встречающемся в природе белке TALE. TAL-эффекторы могут содержать последовательность ядерной локализации, кислый домен активации транскрипции и централизованный домен tandemных повторов, где каждый повтор содержит приблизительно 34 аминокислоты, которые являются ключевыми для специфичности связывания ДНК этих белков (например, Schornack S, et al (2006) *J Plant Physiol* 163(3): 256-272). TAL-эффекторы зависят от последовательностей, обнаруженных в tandemных повторах, которые содержат приблизительно 102 п.о., и повторы, как правило, на 91-100% гомологичны друг другу (например, Bonas et al (1989) *Mol Gen Genet* 218: 127-136). Эти ДНК-связывающие повторы могут быть сконструированы в виде белков с новыми комбинациями и числом повторов, чтобы создать искусственные факторы транскрипции, которые способны взаимодействовать с новыми последовательностями и активировать экспрессию неэндогенного репортерного гена (например, Bonas et al (1989) *Mol Gen Genet* 218: 127-136). Сконструированные белки TAL могут быть связаны с полудоменом расщепления FokI с получением слияния нуклеазы на основе домена TAL-эффектора (TALEN) для расщепления целевой специфичной последовательности ДНК (например, Christian et al (2010) *Genetics* epub 10.1534/genetics.110.120717).

[99] Изготовленные на заказ TALEN коммерчески доступны, например, от Thermo Fisher Scientific (Уолтем, Массачусетс), и любое положение ДНК рутинно может быть мишенью и расщеплено.

[100] Согласно некоторым вариантам реализации клетка (например, Т-клетка) сконструирована с помощью опосредуемой мегануклеазой нацеленной интеграции донорной конструкции. Мегануклеаза (или «хоуминг-эндонуклеаза») представляет собой эндонуклеазу, которая связывает и расщепляет двухцепочечную ДНК в последовательности распознавания, превышающей 12 пар оснований. Встречающиеся в природе мегануклеазы могут быть мономерными (например, I-SceI) или димерными (например, I-CreI). Встречающиеся в природе мегануклеазы распознают сайты расщепления из 15-40 пар оснований и обычно сгруппированы в четыре семейства: семейство LAGLIDADG, семейство GIY-YIG, семейство His-Cyst-бокса и семейство HNH. Примеры хоуминг-эндонуклеаз включают I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-

Panl, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII и I-TevIII. Их последовательности распознавания известны. См. также патент США № 5420032; патент США № 6833252; Belfort et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388; Dujon et al. (1989) *Gene* 82: 115-118; Perler et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 263: 163-180; Argast et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 и каталог New England Biolabs. Термин «мегануклеаза» включает мономерные мегануклеазы, димерные мегануклеазы и мономеры, которые связываются с образованием димерных мегануклеаз.

[101] Согласно некоторым вариантам реализации в способах и композициях, описанных в настоящем документе, применяется нуклеаза, которая содержит сконструированную (не встречающуюся в природе) хоуминг-эндонуклеазу (мегануклеазу). Известны последовательности распознавания хоуминг-эндонуклеаз и мегануклеаз, таких как I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII и I-TevIII. См. также патент США № 5420032; патент США № 6833252; Belfort et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379- 3388; Dujon et al. (1989) *Gene* 82: 115-118; Perler et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 263: 163-180; Argast et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 и каталог New England Biolabs. Кроме того, ДНК-связывающая специфичность хоуминг-эндонуклеаз и мегануклеаз может быть сконструирована для связывания неприродных целевых сайтов. См., например, Chevalier et al. (2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epinat et al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31 :2952-2962; Ashworth et al. (2006) *Nature* 441:656-659; Paques et al. (2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66; публикацию патента США № 20070117128. ДНК-связывающие домены хоуминг-эндонуклеаз и мегануклеаз могут быть изменены в контексте нуклеазы в целом (т.е., так, что нуклеаза включает когнатный домен расщепления) или могут быть слиты с гетерологичным доменом расщепления. Изготовленные на заказ мегануклеазы коммерчески доступны, например, от New England Biolabs (Ипсвич, Массачусетс), и любое положение ДНК рутинно может быть мишенью и расщеплено.

[102] Конструирование Т-клетки может включать введение одной или более нуклеаз (например, ZFN, TALEN, CRISPR/Cas, мегануклеазы) в Т-клетку, например, с помощью одного или более векторов, кодирующих нуклеазы, таким образом, что векторы, содержащие кодируемые нуклеазы, поглощаются Т-клеткой. Векторы могут представлять собой вирусные векторы.

[103] Согласно некоторым вариантам реализации нуклеазы расщепляют специфичный эндогенный локус (например, ген безопасной гавани или представляющий интерес локус)

в клетке (например, Т-клетке), и вводится одна или более экзогенных (донорных) последовательностей (например, трансгенов) (например, один или более векторов, содержащих эти экзогенные последовательности). Нуклеаза может индуцировать двухцепочечный (ДЦР) или одноцепочечный разрыв (ник) в ДНК-мишени. Согласно некоторым вариантам реализации нацеленная вставка донорного трансгена может быть выполнена за счет направляемой гомологией репарации (HDR), механизмов нехомологичной репарации (например, NHEJ-опосредуемого захвата концов) или вставок и/или делеции нуклеотидов (например, эндогенной последовательности) в месте интеграции трансгена в геном клетки.

[104] Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетки приводят в контакт с вектором, содержащим представляющую интерес нуклеиновую кислоту, функционально связанную с промотором, в условиях, достаточных для трансфекции по меньшей мере части Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетки приводят в контакт с вектором, содержащим представляющую интерес нуклеиновую кислоту, функционально связанную с промотором, в условиях, достаточных для трансфекции по меньшей мере 5% Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетки приводят в контакт с вектором в условиях, достаточных для трансфекции по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или даже 100% Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетки, культивируемые *in vitro*, как описано в настоящем документе, трансфицируют, и в этом случае культивируемые Т-клетки приводят в контакт с вектором, как описано в настоящем документе, в условиях, достаточных для трансфекции по меньшей мере 5%, 10% 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или даже 100% Т-клеток.

[105] Для трансдукции Т-клеток можно применять вирусные векторы. Примеры вирусных векторов включают, без ограничения, векторы на основе аденовируса, векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAB), ретровирусные векторы, ретровирусные-аденовирусные векторы и векторы, полученные из вирусов простого герпеса (HSV), включая векторы ампликона, HSV с дефектом репликации и аттенуированный HSV (см., например, Krisky, Gene Ther. 5: 1517-30, 1998; Pfeifer, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2: 177-211, 2001, полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки). Согласно некоторым вариантам реализации клетки трансдуцируют вирусным вектором (например, лентивирусным вектором) на день 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 культивирования *in vitro*. Согласно некоторым вариантам реализации клетки трансдуцируют вирусным вектором на день 5 культивирования *in vitro*. Согласно

некоторым вариантам реализации вирусный вектор представляет собой лентивирус. Согласно некоторым вариантам реализации клетки трансдуцируют лентивирусом, псевдотипированным вирусом кори, на день 1 культивирования *in vitro*.

[106] Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетки трансдуцируют ретровирусными векторами с использованием любой из множества методик, известных в данной области техники (см., например, Science 12 April 1996 272: 263- 267; Blood 2007, 99:2342- 2350; Blood 2009, 1 13: 1422-1431; Blood 2009 Oct 8; 1 14(15):3173-80; Blood. 2003;101 (6):2167-2174; Current Protocols in Molecular Biology или Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.(2009)).

[107] Некоторые варианты реализации относятся к применению ретровирусных векторов или векторов, полученных из ретровирусов. «Ретровирусы» представляют собой оболочечные РНК-вирусы, которые способны инфицировать клетки животных и которые используют фермент обратную транскриптазу на ранних стадиях инфекции для создания копии ДНК из своего РНК-генома, которая затем, как правило, интегрируется в геном хозяина. Примеры ретровирусных векторов включают векторы, полученные из вируса лейкоза мышей Молони (MLV), ретровирусные векторы на основе вируса стволовых клеток мышей, который обеспечивает долговременную стабильную экспрессию в целевых клетках, таких как гемопоэтические клетки-предшественники и их дифференцированное потомство (см., например, Hawley et al., PNAS USA 93: 10297-10302, 1996; Keller et al., Blood 92:877-887, 1998), гибридные векторы (см., например, Choi, et al, Stem Cells 19:236-246, 2001) и сложные векторы ретровирусного происхождения, такие как лентивирусные векторы.

[108] Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетки приводят в контакт с ретровирусным вектором, содержащим представляющую интерес нуклеиновую кислоту, функционально связанную с промотором, в условиях, достаточных для трансдукции по меньшей мере части Т-клеток. Согласно одному варианту реализации Т-клетки приводят в контакт с ретровирусным вектором, содержащим представляющую интерес нуклеиновую кислоту, функционально связанную с промотором, в условиях, достаточных для трансдукции по меньшей мере 2% Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетки приводят в контакт с вектором в условиях, достаточных для трансдукции по меньшей мере 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или даже 100% покоящихся Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации дифференцированные и активированные Т-клетки, культивированные *in vitro*, как описано в настоящем документе, трансдуцируют, и в этом случае культивируемые

дифференцированные/активированные Т-клетки приводят в контакт с вектором, как описано в настоящем документе, в условиях, достаточных для трансдукции по меньшей мере 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или даже 100% дифференцированных и активированных Т-клеток.

[109] Как отмечено выше, в некоторых вариантах реализации применяют лентивирусные векторы. Термин «лентивирус» относится к роду сложных ретровирусов, которые способны инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки. Примеры лентивирусов включают ВИЧ (вирус иммунодефицита человека, включая ВИЧ типа 1 и ВИЧ типа 2), вирус висна-маэди, вирус козьего артрита-энцефалита, вирус инфекционной анемии лошадей, вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV) и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). Лентивирусные векторы могут быть получены из любого одного или более из этих лентивирусов (см., например, Evans et al, Hum Gene Ther. 10: 1479-1489, 1999; Case et al, PNAS USA 96:2988-2993, 1999; Uchida et al, PNAS USA 95: 1 1939-1 1944, 1998; Miyoshi et al, Science 283:682-686, 1999; Sutton et al, J Virol 72:5781 -5788, 1998; и Frecha et al, Blood. 1 12:4843-52, 2008, каждая из которых полностью включена посредством ссылки).

[110] Было документально подтверждено, что покоящиеся Т- и В-клетки могут быть трансдуцированы VSVG-покрытым LV, несущим большинство вспомогательных белков ВИЧ (vif, vpr, vpu и nef) (см., например, Frecha et al, 2010 Mol. Therapy 18: 1748). Согласно определенным вариантам реализации ретровирусный вектор содержит определенные минимальные последовательности из генома лентивируса, такого как геном ВИЧ или геном SIV. Геном лентивируса, как правило, организован в виде области 5'-концевого повтора (LTR), гена gag, гена pol, гена env, вспомогательных генов (например, nef, vif, vpr, vpu, tat, rev) и области 3' LTR. Вирусный LTR разделяют на три области, называемые U3, R (повтор) и U5. Область U3 содержит энхансерные и промоторные элементы, область U5 содержит сигналы полиаденилирования, и область R разделяет области U3 и U5. Транскрибируемые последовательности области R появляются как на 5'-, так и на 3'-концах вирусной РНК (см., например, «RNA Viruses: A Practical Approach» (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, 2000); O Narayan, J. Gen. Virology. 70: 1617-1639, 1989; Fields et al, Fundamental Virology Raven Press., 1990; Miyoshi et al, J Virol. 72:8150-7,1998; и патент США № 6013516, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки). Лентивирусные векторы могут содержать любой один или более из этих элементов лентивирусного генома для регуляции активности вектора по желанию, или они могут содержать делеции, вставки, замены или мутации в одном или

более из этих элементов, например, для уменьшения патологических эффектов лентивирусной репликации или для ограничения лентивирусного вектора одним раундом инфекции.

[111] Как правило, минимальный ретровирусный вектор содержит определенные последовательности 5'LTR и 3'LTR, один или более генов, представляющих интерес (для экспрессии в целевой клетке), один или более промоторов и цис-действующую последовательность для упаковки РНК. Могут быть включены другие регуляторные последовательности, описанные в настоящем документе и известные в данной области техники. Вирусный вектор, как правило, клонируют в плазмиду, которая может быть трансфицирована в упаковывающую клеточную линию, такую как эукариотическая клетка (например, 293-НЕК), а также, как правило, содержит последовательности, полезные для репликации плазмиды в бактериях.

[112] Согласно определенным вариантам реализации вирусный вектор содержит последовательности из 5'- и/или 3'-LTR ретровируса, такого как лентивирус. Последовательности LTR могут представлять собой последовательности LTR из любого лентивируса любого вида. Например, они могут представлять собой последовательности LTR из ВИЧ, SIV, FIV или BIV. Предпочтительно последовательности LTR представляют собой последовательности LTR ВИЧ. Согласно определенным вариантам реализации вирусный вектор содержит последовательности R и U5 из 5'-LTR лентивируса и инактивированный или «самоинактивирующийся» 3'-LTR из лентивируса. «Самоинактивирующийся 3'-LTR» представляет собой 3'-длинный концевой повтор (LTR), который содержит мутацию, замену или делецию, которая препятствует тому, чтобы последовательности LTR управляли экспрессией нижележащего гена. Копия области U3 из 3' LTR служит матрицей для создания обоих LTR в интегрированном провирусе. Таким образом, когда 3'-LTR с инактивирующей делецией или мутацией интегрируется в качестве 5'-LTR провируса, транскрипция из 5'-LTR невозможна. Это устраняет конкуренцию между вирусным энхансером/промотором и любым внутренним энхансером/промотором. Самоинактивирующиеся 3'-LTR описаны, например, в Zufferey et al, J Virol. 72:9873-9880, 1998; Miyoshi et al, J Virol. 72:8150-8157, 1998; и Iwakuma et al., J Virol. 261: 120-132, 1999, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Самоинактивирующиеся 3'-LTR могут быть созданы любым способом, известным в данной области техники. Согласно определенным вариантам реализации элемент U3 из 3'-LTR содержит делецию его энхансерной последовательности, предпочтительно сайтов TATA-бокс, Spl и/или NF-каппа В. Из-за

самоинактивирующегося 3'-LTR провирус, интегрированный в геном клетки-хозяина, будет содержать инактивированный 5'-LTR.

[113] Векторы, предложенные в настоящем документе, обычно содержат ген, кодирующий белок (или другую молекулу, такую как кРНК), который желательным образом экспрессируется в одной или более целевых клетках. В вирусном векторе представляющий интерес ген предпочтительно расположен между последовательностями 5'-LTR и 3'-LTR. Кроме того, представляющий интерес ген предпочтительно находится в функциональной взаимосвязи с другими генетическими элементами, например, транскрипционными регуляторными последовательностями, такими как промоторы и/или энхансеры, для регуляции экспрессии представляющего интерес гена конкретным образом после включения гена в целевую клетку. Согласно определенным вариантам реализации пригодными транскрипционными регуляторными последовательностями являются те, активность которых регулируется в значительной степени как во времени, так и пространственно.

[114] Согласно некоторым вариантам реализации один или более дополнительных генов могут быть включены в качестве меры безопасности, главным образом для обеспечения селективного уничтожения трансфицированных целевых клеток в гетерогенной популяции, например, у субъекта-человека. Согласно некоторым вариантам реализации выбранный ген представляет собой ген тимидинкиназы (ТК), экспрессия которого делает целевую клетку восприимчивой к действию лекарственного средства ганцикловира. Согласно некоторым вариантам реализации ген «самоуничтожения» представляет собой ген «самоуничтожения» каспазы 9, активируемый димеризующим лекарственным средством (см., например, Tey et al, *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 13:913-924, 2007). Согласно определенным вариантам реализации ген, кодирующий маркерный белок, может быть помещен до или после основного гена в вирусный или невирусный вектор для обеспечения идентификации и/или отбора клеток, экспрессирующих желаемый белок. Определенные варианты реализации включают флуоресцентный маркерный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP) или красный флуоресцентный белок (RFP), наряду с представляющим интерес основным геном. Если включен один или более дополнительных репортерных генов, также могут быть включены последовательности IRES или элементы 2A, которые отделяют представляющий интерес основной ген от репортерного гена и/или любого другого представляющего интерес гена.

[115] Согласно определенным вариантам реализации можно применять гены, кодирующие один или более селективных маркеров. Примеры включают селективные маркеры, которые эффективны в эукариотической клетке или прокариотической клетке,

такие как ген лекарственной устойчивости, кодирующий фактор, необходимый для выживания или роста трансформированных клеток-хозяев, выращенных в селективной культуральной среде. Примерные селективные гены кодируют белки, которые придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, к G418, гигромицину В, пурамицину, зеоцину, убаину, бластицидину, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, восполняют ауксотрофные дефициты, или могут присутствовать на отдельной плазмиде и могут быть введены путем совместной трансфекции с вирусным вектором. Согласно одному варианту реализации ген кодирует мутантную дигидрофолатредуктазу (DHFR), которая обеспечивает устойчивость к метотрексату. Согласно определенным другим вариантам реализации можно применять гены, которые кодируют один или рецепторы клеточной поверхности, которые могут быть использованы для мечения и детектирования или очистки трансфицированных клеток, например, низкоаффинный рецептор фактора роста нервов (LNGFR) или другие такие рецепторы, пригодные в качестве систем меток трансдукции. См., например, Lauer et al., *Cancer Gene Ther.* 2000 Mar;7(3):430-7.

[116] В некоторых вирусных векторах, таких как ретровирусные векторы, применяют один или более гетерологичных промоторов, энхансеров или и то, и другое. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность U3 из ретровирусного или лентивирусного 5'-LTR может быть заменена последовательностью промотора или энхансера в вирусной конструкции. Согласно определенным вариантам реализации применяют «внутренний» промотор/энхансер, который расположен между последовательностями 5'-LTR и 3'-LTR вирусного вектора и функционально связан с представляющим интерес геном.

[117] «Функциональная взаимосвязь» и «функционально связанный» означают, без ограничения, что ген находится в правильном положении и ориентации относительно промотора и/или энхансера так, что экспрессия гена будет затронута, когда промотор и/или энхансер контактирует с соответствующими регуляторными молекулами. Можно использовать любую комбинацию энхансера/промотора, которая либо регулирует (например, увеличивает, уменьшает) экспрессию вирусного РНК-генома в упаковывающей клеточной линии, либо регулирует экспрессию выбранного представляющего интерес гена в инфицированной целевой клетке, либо и то, и другое.

[118] Промотор представляет собой элемент контроля экспрессии, образованный последовательностью ДНК, которая обеспечивает связывание полимеразы и осуществление транскрипции. Промоторы представляют собой нетранслируемые последовательности, которые расположены выше (5') старт-кодона выбранного

представляющего интерес гена (как правило, в пределах от примерно 100 до 1000 п.о.) и контролируют транскрипцию и трансляцию кодирующей полинуклеотидной последовательности, с которой они функционально связаны. Промоторы могут быть индуцируемыми или конститутивными. Индуцируемые промоторы иницируют повышенные уровни транскрипции ДНК, находящейся под их контролем, в ответ на некоторое изменение условий культивирования, такое как изменение температуры. Промоторы могут быть однонаправленными или двунаправленными. Двунаправленные промоторы можно использовать для совместной экспрессии двух генов, например, представляющего интерес гена и селективного маркера. В качестве альтернативы, можно применять двунаправленную конфигурацию промотора, содержащую два промотора, каждый из которых контролирует экспрессию разного гена, в противоположной ориентации в одном и том же векторе.

[119] В данной области техники известны различные промоторы, а также способы функциональной связи промотора с полинуклеотидной кодирующей последовательностью. Как нативные промоторные последовательности, так и многие гетерологичные промоторы могут быть использованы для управления экспрессией выбранного гена, представляющего интерес. Согласно определенным вариантам реализации применяют гетерологичные промоторы, поскольку они обычно обеспечивают более высокую транскрипцию и более высокие выходы желаемого белка по сравнению с нативным промотором.

[120] Согласно определенным вариантам реализации можно применять гетерологичные вирусные промоторы. Примеры таких промоторов включают промоторы, полученные из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус, вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40). Согласно определенным вариантам реализации можно применять гетерологичный промотор млекопитающих, такой как промотор актина, промотор иммуноглобулина, промотор белка теплового шока или промотор, который связан с нативной последовательностью представляющего интерес гена. Как правило, промотор совместим с целевой клеткой, такой как Т-клетка.

[121] Согласно определенным вариантам реализации можно применять один или более промоторов РНК-полимеразы II и III. Подходящий набор промоторов РНК-полимеразы III можно найти, например, в Paule and White. *Nucleic Acids Research.*, Vol. 28, pp 1283-1298, 2000, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Промоторы РНК-полимеразы II и III также включают любые синтетические или сконструированные фрагменты ДНК, которые могут направлять РНК-полимеразу II или

III, соответственно, для транскрибирования ее нижележащих кодирующих последовательностей РНК. Кроме того, промотор РНК-полимеразы II или III (Pol II или III) или промоторы, используемые в качестве части вирусного вектора, могут быть индуцируемыми. Любой подходящий индуцируемый промотор Pol II или III можно применять со способами, описанными в настоящем документе. Примеры промоторов Pol II или III включают тетрациклин-чувствительные промоторы, представленные в Ohkawa and Taira, Human Gene Therapy, Vol. 11, pp 577-585, 2000; и Meissner et al, Nucleic Acids Research, Vol. 29, pp 1672-1682, 2001, каждая из которых полностью включена посредством ссылки.

[122] Неограничивающие примеры конститутивных промоторов, которые могут быть использованы, включают промотор убиквитина, промотор ЦМВ (см., например, Karasuyama et al, J. Exp. Med. 169: 13, 1989), промотор β -актина (см., например, Gunning et al., PNAS USA 84:4831 -4835, 1987), промотор фактора элонгации-1 альфа (EF-1 альфа), промотор CAG и промотор pgk (см., например, Adra et al, Gene 60:65-74, 1987); Singer-Sam et al, Gene 32:409- 417, 1984; и Dobson et al, Nucleic Acids Res. 10:2635-2637, 1982, каждая из которых включена посредством ссылки). Неограничивающие примеры тканеспецифических промоторов включают промотор lck (см., например, Garvin et al, Mol. Cell Biol. 8:3058-3064, 1988; и Takadera et al, Mol. Cell Biol. 9:2173-2180, 1989), промотор миогенина (Yee et al, Genes and Development 7: 1277-1289. 1993) и промотор thyl (см., например, Gundersen et al., Gene 113:207-214, 1992).

[123] Дополнительные примеры промоторов включают промотор убиквитина-С, промотор тяжелой цепи μ человека или промотор тяжелой цепи Ig (например, МН) и промотор легкой цепи К человека или промотор легкой цепи Ig (например, ЕЕК), которые являются функциональными в В-лимфоцитах. Промотор МН содержит промотор тяжелой цепи μ человека, которому предшествует энхансер iE μ , фланкированный областями ассоциации с матриксом, а промотор ЕЕК содержит промотор легкой цепи к, которому предшествует интронный энхансер (iEк), область ассоциации с матриксом и 3' энхансер (3Ек) (см., например, Luo et al, Blood. 113: 1422-1431, 2009, и публикацию заявки на патент США № 2010/0203630). Соответственно, согласно определенным вариантам реализации можно применять один или более из указанных промоторных или энхансерных элементов.

[124] Согласно некоторым вариантам реализации один промотор управляет экспрессией селективного маркера, а второй промотор управляет экспрессией представляющего интерес гена. Как отмечено выше, согласно определенным вариантам реализации применяют энхансерные элементы, такие как внутренний энхансер, для повышения

экспрессии представляющего интерес гена. Эnhансеры представляют собой цис-действующие элементы ДНК, обычно от 10 до 300 п.о. в длину, которые действуют на промотор для увеличения его транскрипции. Эnhансерные последовательности могут быть получены из генов млекопитающих (например, глобина, эластазы, альбумина, а-фетопротеина, инсулина), такие как эnhансер, интронный эnhансер и 3'-эnhансер. Также включены эnhансеры из эукариотического вируса, включая эnhансер SV40 на участке позднего начала репликации (100-270 п.о.), ранний промотор-эnhансер цитомегаловируса, эnhансер полиомы на участке позднего начала репликации и эnhансеры аденовируса. Эnhансеры могут быть сплайсированы в вектор в положении 5' или 3' относительно антиген-специфичной полинуклеотидной последовательности, но предпочтительно расположены в сайте 5' относительно промотора. Специалисты в данной области техники выберут соответствующий эnhансер на основе желаемого профиля экспрессии.

[125] Согласно некоторым вариантам реализации промоторы выбирают таким образом, чтобы обеспечить индуцируемую экспрессию гена. В данной области техники известен ряд систем для индуцируемой экспрессии, включая чувствительную к тетрациклину систему и систему оператор-репрессор *lac*. Также предусмотрено, что для получения желаемой экспрессии гена, представляющего интерес, может быть использована комбинация промоторов. Квалифицированный специалист сможет выбрать промотор на основе желаемого профиля экспрессии гена в организме и/или целевой клетке, представляющей интерес.

[126] Некоторые вирусные векторы содержат цис-действующие упаковывающие последовательности, способствующие включению геномной вирусной РНК в вирусную частицу. Примеры включают пси-последовательности. Такие цис-действующие последовательности известны в данной области техники. Согласно определенным вариантам реализации вирусные векторы, описанные в настоящей заявке, могут экспрессировать два или более генов, что может быть осуществлено, например, путем включения внутреннего промотора, который функционально связан с каждым отдельным геном помимо первого гена, путем включения элемента, который способствует коэкспрессии, такого как элемент последовательности внутренней посадки рибосомы (IRES) (патент США № 4937190, включенный посредством ссылки) или элемент 2A, или и то, и другое. Только в качестве иллюстрации, элементы IRES или 2A могут быть использованы, когда один вектор содержит последовательности, кодирующие каждую цепь молекулы иммуноглобулина с желаемой специфичностью. Например, первая кодирующая область (кодирующая тяжелую или легкую цепь) может быть расположена непосредственно ниже промотора, а вторая кодирующая область (кодирующая другую

цепь) может быть расположена ниже первой кодирующей области, при этом элемент IRES или 2A расположен между первой и второй кодирующими областями, предпочтительно непосредственно перед второй кодирующей областью. Согласно некоторым вариантам реализации элемент IRES или 2A применяют для коэкспрессии неродственного гена, такого как репортерный ген, селективный маркер или ген, усиливающий иммунную функцию. Примеры последовательностей IRES, которые можно использовать, включают, без ограничения, элементы IRES вируса энцефаломиелита (EMCV), вируса ящура (FMDV), вируса мышинного энцефаломиелита Тейлера (TMEV), риновируса человека (HRV), вируса Коксаки (CSV), полиовируса (POLIO), вируса гепатита А (ВГА), вируса гепатита С (ВГС) и пестивирусов (например, вируса холеры свиней (HOCV) и вируса вирусной диареи крупного рогатого скота (BVDV)) (см., например, Le et al, *Virus Genes* 12: 135-147, 1996; и Le et al, *Nuc. Acids Res.* 25:362-369, 1997, каждая из которых полностью включена посредством ссылки). Один из примеров элемента 2A включает последовательность F2A вируса ящура.

[127] Согласно некоторым вариантам реализации векторы, предложенные в настоящем документе, также содержат дополнительные генетические элементы для достижения желаемого результата. Например, определенные вирусные векторы могут включать сигнал, который облегчает проникновение в ядро вирусного генома в целевой клетке, такой как κ ар-сигнал ВИЧ-1. В качестве дополнительного примера, некоторые вирусные векторы могут включать элементы, которые облегчают характеристику сайта интеграции провируса в целевой клетке, такие как последовательность супрессора амбер-типа tРНК. Некоторые вирусные векторы могут содержать один или более генетических элементов, предназначенных для усиления экспрессии представляющего интерес гена. Например, в конструкцию может быть помещен чувствительный элемент вируса гепатита сурка (WRE) (см., например, Zufferey et al, *J. Virol.* 74:3668-3681, 1999; и Deglon et al, *Hum. Gene Ther.* 11 : 179-190, 2000, полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки). В качестве другого примера в конструкцию может быть также включен инсулятор куриного β -глобина. Было показано, что этот элемент снижает вероятность сайленсинга интегрированной ДНК в целевой клетке из-за эффектов метилирования и гетерохроматинизации. Кроме того, инсулятор может защищать внутренний энхансер, промотор и экзогенный ген от положительных или отрицательных позиционных эффектов окружающей ДНК в месте интеграции на хромосоме. Согласно определенным вариантам реализации применяют каждый из этих генетических элементов. Согласно другому варианту реализации вирусные векторы, предложенные в настоящем документе, также могут содержать универсальный хроматинраскрывающий элемент

(UCOE) для повышения экспрессии (см., например, Zhang F, et al, *Molecular Therapy: The journal of the American Society of Gene Therapy* 2010 Sep; 18(9): 1640- 9.).

[128] Согласно некоторым вариантам реализации вирусные векторы (например, ретровирусные, лентивирусные), предложенные в настоящем документе, являются «псевдотипированными» одним или более выбранными вирусными гликопротеинами или белками оболочки, главным образом для нацеливания на выбранные типы клеток. Псевдотипирование обычно относится к включению одного или более гетерологичных вирусных гликопротеинов на поверхность вирусной частицы, что часто позволяет вирусной частице инфицировать выбранную клетку, которая отличается от ее нормальных клеток-мишеней. «Гетерологичный» элемент получают из вируса, отличного от вируса, из которого получен РНК-геном вирусного вектора. Как правило, области, кодирующие гликопротеин, вирусного вектора генетически изменены, например, путем делеции, для предотвращения экспрессии собственного гликопротеина. Только в качестве иллюстрации, гликопротеины оболочки gp41 и/или gp120 из лентивирусного вектора, полученного из ВИЧ, как правило, удаляют перед псевдотипированием гетерологичным вирусным гликопротеином.

[129] Согласно некоторым вариантам реализации вирусный вектор псевдотипирован гетерологичным вирусным гликопротеином, нацеленным на Т-лимфоциты. Согласно некоторым вариантам реализации вирусный гликопротеин обеспечивает селективную инфекцию или трансдукцию покоящихся или латентных Т-лимфоцитов. Согласно некоторым вариантам реализации вирусный гликопротеин обеспечивает селективную инфекцию Т-клеток. Согласно одному варианту реализации вирусный вектор псевдотипирован VSV-G. Согласно некоторым вариантам реализации гетерологичный вирусный гликопротеин получен из гликопротеина вируса кори, такого как вирус кори Эдмонта. Согласно некоторым вариантам реализации псевдотип включает гликопротеины вируса кори гемагглютинин (H) и белок слияния (F), или и то, и другое (см., например, Frecha et al, *Blood*. 112:4843-52, 2008; и Frecha et al, *Blood*. 114:3173-80, 2009, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки). Согласно некоторым вариантам реализации вирусный вектор псевдотипирован с использованием вируса лейкоза гиббона (GALV). Согласно некоторым вариантам реализации вирусный вектор псевдотипирован с использованием эндогенного ретровируса кошек (RD114). Согласно некоторым вариантам реализации вирусный вектор псевдотипирован с использованием эндогенного ретровируса павиана (BaEV). Согласно некоторым вариантам реализации вирусный вектор псевдотипирован с использованием вируса лейкоза мышей (MLV). Согласно некоторым вариантам реализации вирусный

вектор содержит встроенный связывающий домен антитела, такой как одна или более переменных областей (например, переменные области тяжелой и легкой цепи), который служит для нацеливания вектора на конкретный тип клеток.

[130] Создание вирусных векторов можно осуществлять с использованием любых подходящих методик генетической инженерии, известных в данной области техники, включая, без ограничения, стандартные методики расщепления рестрикционной эндонуклеазой, лигирования, трансформации, очистки плазмид, амплификации ПЦР и секвенирования ДНК, например, как описано в Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989)), Coffin et al. (*Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1997)) и «*RNA Viruses: A Practical Approach*» (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000)).

[131] Любое множество способов, известных в данной области техники, можно применять для получения подходящих ретровирусных частиц, геном которых содержит РНК-копию вирусного вектора. В качестве одного из способов вирусный вектор может быть введен в упаковывающую клеточную линию, которая упаковывает вирусную геномную РНК на основе вирусного вектора в вирусные частицы с желаемой специфичностью в отношении целевых клеток. Упаковывающая клеточная линия, как правило, обеспечивает в транс-конфигурации вирусные белки, которые необходимы для упаковки вирусной геномной РНК в вирусные частицы и инфицирования целевой клетки, включая структурные белки gag, ферментативные белки pol и гликопротеины оболочки.

[132] Согласно некоторым вариантам реализации упаковывающая клеточная линия стабильно экспрессирует определенные необходимые или желаемые вирусные белки (например, gag, pol) (см., например, патент США № 6218181, который включен в настоящий документ посредством ссылки). Согласно некоторым вариантам реализации упаковывающую клеточную линию временно трансфицируют плазмидами, которые кодируют определенные необходимые или желаемые вирусные белки (например, gag, pol, гликопротеин), включая последовательности гликопротеина вируса кори, описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации упаковывающая клеточная линия стабильно экспрессирует последовательности gag и pol, и затем клеточную линию трансфицируют плазмидой, кодирующей вирусный вектор, и плазмидой, кодирующей гликопротеин. После введения желаемых плазмид вирусные частицы собирают и обрабатывают соответствующим образом, например, ультрацентрифугированием, с получением концентрированной суспензии вирусных частиц. Примерные упаковывающие клеточные линии включают клеточные линии 293

(ATCC CCL X), HeLa (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), ВНК (ATCC CCL- 10) и Cf2Th (ATCC CRL 1430).

[133] В настоящем документе «биологическая активность» или «биоактивность» относится к любому ответу, индуцированному в анализе *in vitro* или в клетке, ткани, органе или организме (например, у животного, млекопитающего или человека) в результате введения любого соединения, агента, полипептида, конъюгата, фармацевтической композиции, предусмотренной в настоящем документе. Биологическая активность может относиться к агонистическим действиям или антагонистическим действиям. Биологическая активность может представлять собой благоприятный эффект; или биологическая активность может не быть благоприятной, т.е. токсичность. Согласно некоторым вариантам реализации биологическая активность будет относиться к положительным или отрицательным эффектам, которые лекарственное средство или фармацевтическая композиция оказывает на живого субъекта, например, на млекопитающее, такое как человек. Соответственно, термин «биологически активный» предназначен для описания любого соединения, обладающего биологической активностью, описанной в настоящем документе. Биологическую активность можно оценить с помощью любых подходящих средств, известных в настоящее время специалистам. Такие анализы могут быть качественными или количественными. Квалифицированный специалист легко поймет необходимость применения различных анализов для оценки активности различных полипептидов; задача, которая является рутинной для среднего исследователя. Такие анализы часто легко реализуются в лабораторных условиях с небольшими требованиями к оптимизации, и чаще всего доступны коммерческие наборы, которые обеспечивают простые, надежные и воспроизводимые считывания биологической активности для широкого спектра полипептидов с использованием различных технологий, обычных для большинства лабораторий. При отсутствии таких наборов обычные квалифицированные исследователи могут легко разработать и оптимизировать собственные анализы биологической активности для целевых полипептидов без излишних экспериментов; поскольку это является рутинным аспектом научного процесса.

[134] «Терапевтический агент» относится к любому соединению, которое при введении субъекту (например, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку) в терапевтически эффективном количестве способно осуществлять лечение заболевания или состояния, как определено ниже.

[135] В настоящем документе термин «лечить» или «осуществлять лечение» или «лечение» охватывает по меньшей мере облегчение симптомов, связанных с заболеванием

или состоянием у пациента, где облегчение используется в широком смысле для обозначения по меньшей мере уменьшения величины параметра, например, симптома, связанного с состоянием, подлежащим лечению. Таким образом, «лечение» в контексте настоящего документа охватывает лечение представляющего интерес заболевания или состояния у субъекта, предпочтительно человека, имеющего представляющее интерес заболевание или состояние, и включает: (i) предотвращение или ингибирование возникновения заболевания или состояния у субъекта, в частности, когда такой субъект предрасположен к развитию состояния, но у которого оно еще не было диагностировано; (ii) ингибирование заболевания или состояния, т.е. остановку его развития; (iii) облегчение заболевания или состояния, т.е. вызов регрессии заболевания или состояния; или (iv) облегчение симптомов, вызванных заболеванием или состоянием. В настоящем документе термины «заболевание», «нарушение» и «состояние» могут использоваться взаимозаменяемо или могут отличаться тем, что конкретное заболевание, поражение или состояние может не иметь известного возбудителя (этиология еще не установлена), и поэтому оно еще не признано поражением или заболеванием, а только нежелательным состоянием или синдромом, при этом клиницисты идентифицировали более или менее конкретный набор симптомов.

[136] В настоящем документе «терапевтически эффективный» относится к количеству прогениторных истощенных Т-клеток, размноженных с помощью способов, описанных в настоящем документе, которое является достаточным для лечения или облегчения или каким-либо образом уменьшения симптомов, связанных с заболеванием или нарушением, таких как ферментативная недостаточность, белковая недостаточность, гормональная недостаточность, воспаление, рак, аутоиммунитет или инфекция. При использовании со ссылкой на способ, указанный способ является достаточно эффективным для лечения или облегчения или каким-либо образом уменьшения симптомов, связанных с заболеванием или состоянием. Например, эффективное количество в отношении заболевания представляет собой такое количество, которое является достаточным для блокирования или предотвращения его возникновения; или, если патология заболевания началась, для смягчения, уменьшения, стабилизации, обращения вспять или замедления прогрессирования заболевания или иного уменьшения патологических последствий заболевания. В любом случае эффективное количество может быть введено в виде однократной дозы или разделенных доз.

[137] Термин «комбинация» относится либо к фиксированной комбинации в одной единичной лекарственной форме, либо к набору частей для комбинированного введения, где прогениторные истощенные Т-клетки, размноженные с помощью способов,

описанных в настоящем документе, и партнер по комбинации (например, другое лекарственное средство, как описано ниже, также называемое «терапевтическим агентом» или «соагентом») можно вводить независимо в одно и то же время или по отдельности с определенными интервалами времени. В некоторых обстоятельствах партнеры по комбинации проявляют кооперативный, например, синергический эффект. Термины «совместное введение» или «комбинированное введение» или тому подобное, используемые в настоящем документе, предназначены для охвата введения выбранного партнера по комбинации одному субъекту, нуждающемуся в этом (например, пациенту), и предназначены для включения режимов лечения, в которых агенты необязательно вводят одним и тем же путем введения или в одно и то же время. Термин «фармацевтическая комбинация» в контексте настоящего документа означает продукт, полученный в результате смешивания или объединения более чем одного активного ингредиента, и включает как фиксированные, так и нефиксированные комбинации активных ингредиентов. Термин «фиксированная комбинация» означает, что активные ингредиенты, например, соединение и партнер по комбинации, оба вводят пациенту одновременно в форме одной единицы или дозы. Термин «нефиксированная комбинация» означает, что активные ингредиенты, например, соединение и партнер по комбинации, оба вводят пациенту как отдельные единицы совместно, одновременно или последовательно без конкретных временных ограничений, причем такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух соединений в организме пациента. Последнее также применимо к коктейльной терапии, например, введению трех или более активных ингредиентов.

[138] В настоящем документе «адоптивная клеточная терапия» относится к лечению, при котором субъекту вводят любую композицию, содержащую клетки, подходящие для адоптивного переноса клеток. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения адоптивная клеточная терапия содержит тип клеток, выбранный из группы, состоящей из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), TCR (т.е. гетерологичный Т-клеточный рецептор)-модифицированных лимфоцитов и CAR (т.е. химерный антигенный рецептор)-модифицированных лимфоцитов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения адоптивная клеточная терапевтическая композиция содержит тип клеток, выбранный из группы, состоящей из Т-клеток, CD8⁺ клеток, прогениторных истощенных Т-клеток, CD4⁺ клеток, NK-клеток, дельта-гамма Т-клеток, регуляторных Т-клеток и мононуклеарных клеток периферической крови. Согласно некоторым вариантам реализации адоптивная клеточная терапия содержит TIL, Т-клетки, CD8⁺ клетки, CD4⁺ клетки, NK-клетки, дельта-гамма Т-клетки, регуляторные Т-клетки или мононуклеарные

клетки периферической крови. Согласно некоторым вариантам реализации адоптивная клеточная терапия содержит Т-клетки. Согласно некоторым вариантам реализации адоптивная клеточная терапия содержит прогениторные истощенные Т-клетки, размноженные с помощью способов, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации адоптивная клеточная терапия содержит $CD8^+$ прогениторные истощенные Т-клетки, размноженные с помощью способов, описанных в настоящем документе. В настоящем документе «инфильтрирующие опухоль лимфоциты» или ТИЛ относятся к лейкоцитам, которые покинули кровотоки и мигрировали в опухоль. Лимфоциты можно разделить на три группы, включающие В-клетки, Т-клетки и естественные клетки-киллеры. Согласно некоторым вариантам реализации адоптивная клеточная терапия содержит Т-клетки, которые модифицированы специфичными в отношении мишени химерными антигенными рецепторами или специфично отобранными Т-клеточными рецепторами. В настоящем документе «Т-клетки» относятся к $CD3^+$ клеткам, включая $CD4^+$ хелперные клетки, $CD8^+$ цитотоксические Т-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки.

Платформа высокопроизводительного скрининга

[139] Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ скрининга соединений, которые стимулируют пролиферацию прогениторных истощенных Т-клеток, включающий: (а) обеспечение спленоцитов от трансгенного субъекта, содержащего полинуклеотид, кодирующий меченый белок TCF-1, и полинуклеотид, кодирующий Т-клеточный рецептор, специфичный в отношении пептидного антигена в комплексе с молекулой главного комплекса гистосовместимости (ГКГС); (b) активированные $CD8^+$ Т-клетки из спленоцитов в присутствии соединения; поддержание указанного культивирования в течение периода времени, достаточного для обеспечения пролиферации Т-клеток, причем Т-клетки из спленоцитов стимулировали активирующим агентом, при этом стимуляция происходит перед культивированием или одновременно с ним; (с) измерение: (i) количества меченых $Tcf7^+$ Т-клеток; и/или (ii) уровня экспрессии TCF-1, при этом увеличение (i) и (ii) по сравнению со спленоцитами, не обработанными соединением, указывает на то, что соединение стимулирует пролиферацию прогениторных истощенных Т-клеток.

[140] Оценка способности соединения, подвергаемого скринингу, разобщать пролиферацию и дифференцировку может быть выполнена на $CD8^+$ Т-клетках, поэтому Т-клетки могут быть приведены в контакт с соединением во время активации или перед активацией Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации стимуляция происходит перед культивированием. Согласно некоторым вариантам реализации стимуляция происходит одновременно с культивированием. Согласно некоторым вариантам

реализации стимуляция происходит перед культивированием или одновременно с культивированием.

[141] Согласно некоторым вариантам реализации активирующий агент содержит один или более из пептидного антигена, антигенпрезентирующих клеток, анти-CD3, анти-CD28, фобол-12-миристан-13-ацетата (PMA) и иономицина.

[142] Согласно некоторым вариантам реализации пролиферация Т-клеток, стимулируемая соединением, разобщает размножение Т-клеток и дифференцировку.

[143] Согласно некоторым вариантам реализации трансгенный субъект представляет собой млекопитающее. Согласно некоторым вариантам реализации трансгенный субъект представляет собой мышь.

[144] Метка указанного меченого TCF-1 может содержать флуоресцентную метку, причем указанная метка детектируется при облучении, как правило, в пределах определенных длин волн света в ультрафиолетовом, видимом или инфракрасном диапазоне (например, 200-800 нм), и может быть детектирована с помощью соответствующих приборов (например, проточного цитометра, считывающего устройства для планшетов или микрофлюидного чипа). Согласно некоторым вариантам реализации метка указанного меченого TCF-1 содержит флуоресцентную молекулу, которая при облучении обеспечивает различимый спектр испускания флуоресценции. Согласно одному варианту реализации флуоресцентная молекула может представлять собой зеленый флуоресцентный белок (GFP). Согласно другому варианту реализации флуоресцентная молекула может представлять собой mCherry. Согласно другому варианту реализации флуоресцентная молекула может представлять собой tdTomato. Согласно другому варианту реализации флуоресцентная молекула может представлять собой KeimaRed. Согласно другому варианту реализации флуоресцентная молекула может представлять собой желтый флуоресцентный белок (YFP). Согласно другому варианту реализации флуоресцентная молекула может представлять собой голубой флуоресцентный белок (CFP). Мечение может включать, но не ограничивается этим, указанные выше флуоресцентные белки, экспрессируемые внутриклеточно. Примеры таких белков обсуждаются для GFP в Chalfie et al., (1994) Science 263:802-805. Согласно некоторым вариантам реализации метка указанного меченого TCF-1 содержит улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP).

[145] Согласно некоторым вариантам реализации спленциты содержат наивные спленциты.

[146] Согласно некоторым вариантам реализации Т-клеточный рецептор, специфичный в отношении пептидного антигена в комплексе с молекулой главного комплекса

гистосовместимости (ГКГС), содержит трансгенный Т-клеточный рецептор (TCR). Согласно некоторым вариантам реализации трансгенный TCR специфично распознает антигенный пептид. Согласно некоторым вариантам реализации трансгенный TCR специфично распознает антигенный пептид, характерный для заболевания или нарушения. Согласно некоторым вариантам реализации трансгенный TCR специфично распознает антигенный пептид, характерный для рака. Согласно некоторым вариантам реализации трансгенный TCR специфично распознает антигенный пептид, характерный для инфекции. Согласно некоторым вариантам реализации трансгенный TCR специфично распознает пептид овальбумина (OVA). Согласно некоторым вариантам реализации трансгенный TCR специфично распознает овальбумин OVA257-264, презентируемый молекулой ГКГС I.

[147] Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает суспендирование спленоцитов в культуральной среде. Согласно некоторым вариантам реализации среда для применения в способах, описанных в настоящем документе, включает, но не ограничивается этим, среду Дульбекко, модифицированную Исковым (с фетальной бычьей сывороткой или без нее или другой подходящей сывороткой). Иллюстративная среда также включает, но не ограничивается перечисленными, IMDM, RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 и X-Vivo 20. Согласно некоторым вариантам реализации среда может содержать поверхностно-активное вещество, антитело, плазманат или восстанавливающий агент, один или более антибиотиков и/или добавки, такие как инсулин, трансферрин, селенит натрия и циклоспорин.

[148] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда содержит антигенный пептид. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда содержит антигенный пептид, характерный для заболевания или нарушения. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда содержит антиген, характерный для рака. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда содержит антиген, характерный для инфекции. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда содержит антигенный пептид, причем указанный пептид представляет собой пептид овальбумина. Согласно некоторым вариантам реализации пептид овальбумина представляет собой OVA257-264. Согласно некоторым вариантам реализации пептид OVA257-264 содержит полипептид, имеющий последовательность, идентичную SEQ ID NO: 1 (например, SIINFELK). Согласно некоторым вариантам реализации пептид OVA257-264 может содержать альтернативные производные, причем указанный пептид содержит последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%,

80%, 85% или 90% идентична SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам реализации пептид OVA257-264 может содержать альтернативные производные, причем указанный пептид содержит полипептид, имеющий последовательность, идентичную SEQ ID NO: 2 (например, SAINFEKL) или SEQ ID NO: 3 (например, SIITFEKL).

[149] Согласно некоторым вариантам реализации концентрация антигенного пептида составляет по меньшей мере 10, 50, 100, 250, 500 нМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 5 мкМ или более. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация антигенного пептида составляет от примерно 10 нМ до примерно 100 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация антигенного пептида составляет от примерно 100 нМ до примерно 250 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация антигенного пептида составляет от примерно 250 нМ до примерно 500 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация антигенного пептида составляет от примерно 500 нМ до примерно 1 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация антигенного пептида составляет от 1 мкМ до 2 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация антигенного пептида составляет от 2 мкМ до 5 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация антигенного пептида составляет от 5 мкМ до 10 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация антигенного пептида составляет 250 нМ или по меньшей мере 250 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация антигенного пептида составляет 500 нМ или по меньшей мере 500 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация антигенного пептида составляет 750 нМ или по меньшей мере 750 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация антигенного пептида составляет 1 мкМ или по меньшей мере 1 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация антигенного пептида составляет 1,5 мкМ или по меньшей мере 1,5 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация антигенного пептида составляет 3 мкМ или по меньшей мере 3 мкМ.

[150] Согласно некоторым вариантам реализации концентрация пептида овальбумина составляет по меньшей мере 10 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 200 нМ, 300 нМ, 400 нМ, 500 нМ, 600 нМ, 700 нМ, 800 нМ, 900 нМ, 1 мкМ или более. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация пептида овальбумина составляет от примерно 10 нМ до примерно 100 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация пептида овальбумина составляет от примерно 100 нМ до примерно 250 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация пептида овальбумина составляет от примерно 250 нМ до примерно 500 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация пептида овальбумина составляет от примерно 500 нМ до примерно 1 мкМ. Согласно

некоторым вариантам реализации концентрация пептида овальбумина составляет от 1 мкМ до 2 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация пептида овальбумина составляет от 2 мкМ до 5 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация пептида овальбумина составляет от 5 мкМ до 10 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация пептида овальбумина составляет примерно 400 нМ или по меньшей мере 400 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация пептида овальбумина составляет примерно 500 нМ или по меньшей мере 500 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация пептида овальбумина составляет примерно 600 нМ или по меньшей мере 600 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация пептида овальбумина составляет примерно 700 нМ или по меньшей мере 700 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация пептида овальбумина составляет примерно 800 нМ или по меньшей мере 800 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация пептида овальбумина составляет примерно 900 нМ или по меньшей мере 900 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация пептида овальбумина составляет примерно 1 мкМ или по меньшей мере 1 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация пептида овальбумина составляет примерно 1,1 мкМ или по меньшей мере 1,1 мкМ.

[151] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда дополнительно содержит активирующие факторы, которые могут быть добавлены к культуре клеток *in vitro* в различных концентрациях для достижения желаемого результата (например, размножения, разобщенного с дифференцировкой). Предусмотрено, что активирующий Т-клетки фактор можно применять в культуральной среде для размножения Т-клеток, но не для дифференцировки Т-клеток. Например, Т-клетки можно культивировать с одним или более активирующими Т-клетки факторами, включая, но не ограничиваясь этим, IL-2. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда дополнительно содержит IL-2. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет по меньшей мере примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400, 500 или 1000 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет от примерно 10 до 100 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет от примерно 100 до 200 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет от примерно 200 до 500 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет от примерно 500 до 1000 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 10 МЕ/мл или по меньшей мере 10 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 20 МЕ/мл или по

[illegible]

Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 60 МЕ/мл.

[152] Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, примерно на день 0 культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 0 культивирования или на примерно день 3 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 0 культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 1 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 2 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 3 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 4 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 5 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 6 после начала культивирования.

[153] Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время культивирования, составляет примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время культивирования, составляет примерно 1 день. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время культивирования, составляет примерно 2 дня. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время

культивирования, составляет примерно 3 дня. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время культивирования, составляет примерно 4 дня. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время культивирования, составляет примерно 5 дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время культивирования, составляет примерно 6 дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время культивирования, составляет примерно 7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время культивирования, составляет примерно 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время культивирования, составляет примерно 9 дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время культивирования, составляет примерно 10 дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время культивирования, составляет от примерно 1 до примерно 3 дней, причем в это время Т-клетки подвергаются измерению (с). Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время культивирования, составляет от примерно 3 до примерно 5 дней, причем в это время Т-клетки подвергаются измерению (с). Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время культивирования, составляет от примерно 5 до примерно 10 дней, причем в это время Т-клетки подвергаются измерению (с).

[154] Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ скрининга соединений, которые стимулируют пролиферацию антиген-специфичных прогениторных истощенных Т-клеток, включающий: (а) обеспечение спленоцитов от трансгенного субъекта, содержащего полинуклеотид, кодирующий Т-клеточный рецептор, специфичный в отношении пептидного антигена; (b) культивирование активированных CD8⁺ Т-клеток из спленоцитов в присутствии соединения; поддержание указанного культивирования в течение периода времени, достаточного для обеспечения пролиферации Т-клеток, причем Т-клетки из спленоцитов стимулировали активирующим

агентом, при этом стимуляция происходит перед культивированием или одновременно с ним; (с) приведение детектирующего антитела в контакт с субобразцом Т-клеток, при этом детектирующее антитело содержит детектируемую метку, при этом антитело специфично в отношении PD-1 или Tim3, с созданием тем самым смеси, содержащей детектирующее антитело и Т-клетки, и поддержание указанной смеси в течение периода времени, достаточного для связывания детектирующего антитела со специфичными антигенами, присутствующими на Т-клетках; (d) промывку указанной смеси для удаления несвязанного детектирующего антитела из Т-клеток; (e) измерение: (i) количества Т-клеток, связанных детектирующим антителом, и/или (ii) величины сигнала детектирующего антитела; (f) повторную стимуляцию Т-клеток в культуре и поддержание указанного культивирования в течение периода времени, достаточного для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток; (g) размножение Т-клеток в культуральной среде и поддержание указанного размножения в течение периода времени, достаточного для обеспечения пролиферации Т-клеток; (h) приведение детектирующего антитела в контакт с субобразцом размноженных Т-клеток, при этом детектирующее антитело содержит детектируемую метку, при этом антитело специфично в отношении PD-1 или Tim3, с созданием тем самым смеси, содержащей детектирующее антитело и Т-клетки, и поддержание указанной смеси в течение периода времени, достаточного для связывания детектирующего антитела со специфичными антигенами, присутствующими на Т-клетках; (i) промывку указанной смеси для удаления несвязанного детектирующего антитела из Т-клеток; (j) измерение: (i) количества Т-клеток, связанных детектирующим антителом, и/или (ii) величины сигнала от детектирующего антитела, причем увеличение либо количества Т-клеток, связанных детектирующим антителом, и величины сигнала от детектирующего антитела в (e), либо количества Т-клеток, связанных детектирующим антителом, и величины сигнала от детектирующего антитела в (j) для PD-1 и TCF-1, и уменьшение или отсутствие либо количества Т-клеток, связанных детектирующим антителом, и величины сигнала от детектирующего антитела в (e), либо количества Т-клеток, связанных детектирующим антителом, и величины сигнала от детектирующего антитела в (j) для Tim3 по сравнению со спленоцитами, не обработанными соединением, указывает на то, что соединение стимулирует пролиферацию антиген-специфичных прогениторных истощенных Т-клеток.

[155] Согласно некоторым вариантам реализации активирующий агент содержит один или более из пептидного антигена, антигенпрезентирующих клеток, анти-CD3, анти-CD28, форбол-12-миристан-13-ацетата (PMA) и иономицина.

[156] Согласно некоторым вариантам реализации пролиферация Т-клеток, стимулируемая соединением, разобщает размножение Т-клеток и дифференцировку.

[157] Согласно некоторым вариантам реализации трансгенный субъект представляет собой млекопитающее. Согласно некоторым вариантам реализации трансгенный субъект представляет собой мышь.

[158] Согласно некоторым вариантам реализации метка указанного детектирующего антитела может содержать флуоресцентную метку, причем указанная метка детектируется при облучении, как правило, в пределах определенных длин волн света в ультрафиолетовом, видимом или инфракрасном диапазоне (например, 200-800 нм), и может быть детектирована с помощью соответствующих приборов (например, проточного цитометра, считывающего устройства для планшетов или микрофлюидного чипа). Согласно некоторым вариантам реализации метка указанного детектирующего антитела содержит флуоресцентную молекулу, которая при облучении обеспечивает различимый спектр испускания флуоресценции. Согласно одному варианту реализации флуоресцентная молекула может представлять собой зеленый флуоресцентный белок (GFP). Согласно другому варианту реализации флуоресцентная молекула может представлять собой mCherry. Согласно другому варианту реализации флуоресцентная молекула может представлять собой tdTomato. Согласно другому варианту реализации флуоресцентная молекула может представлять собой KeimaRed. Согласно другому варианту реализации флуоресцентная молекула может представлять собой желтый флуоресцентный белок (YFP). Согласно другому варианту реализации флуоресцентная молекула может представлять собой голубой флуоресцентный белок (CFP). Мечение может включать, но не ограничивается этим, указанные выше флуоресцентные белки. Примеры таких белков обсуждаются для GFP в Chalfie et al., (1994) Science 263:802-805. Согласно некоторым вариантам реализации метка указанного детектирующего антитела содержит улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP).

[159] Согласно некоторым вариантам реализации Т-клеточный рецептор, специфичный в отношении пептидного антигена, содержит трансгенный Т-клеточный рецептор (TCR). Согласно некоторым вариантам реализации трансгенный TCR специфично распознает антигенный пептид. Согласно некоторым вариантам реализации трансгенный TCR специфично распознает антигенный пептид, характерный для заболевания или нарушения. Согласно некоторым вариантам реализации трансгенный TCR специфично распознает антигенный пептид, характерный для рака. Согласно некоторым вариантам реализации трансгенный TCR специфично распознает антигенный пептид, характерный для инфекции. Согласно некоторым вариантам реализации трансгенный TCR специфично

распознает гликопротеин пептида вируса *лимфоцитарного хориоменингита* (GP). Согласно некоторым вариантам реализации трансгенный TCR специфично распознает GP33-41.

[160] Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает суспендирование спленоцитов в культуральной среде. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает суспендирование спленоцитов в культуральной среде. Согласно некоторым вариантам реализации среда для применения в способах, описанных в настоящем документе, включает, но не ограничивается этим, среду Дульбекко, модифицированную Исковым (с фетальной бычьей сывороткой или без нее или другой подходящей сывороткой). Иллюстративная среда также включает, но не ограничивается перечисленными, IMDM, RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 и X-Vivo 20. Согласно некоторым вариантам реализации среда может содержать поверхностно-активное вещество, антитело, плазманат или восстанавливающий агент, один или более антибиотиков и/или добавки, такие как инсулин, трансферрин, селенит натрия и циклоспорин.

[161] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда содержит антигенный пептид. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда содержит антигенный пептид, характерный для заболевания или нарушения. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда содержит антиген, характерный для рака. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда содержит антиген, характерный для инфекции. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда содержит антигенный пептид, причем указанный пептид представляет собой гликопротеин пептида вируса *лимфоцитарного хориоменингита*. Согласно некоторым вариантам реализации гликопротеин пептида вируса *лимфоцитарного хориоменингита* представляет собой GP33-41. Согласно некоторым вариантам реализации пептид GP33-41 содержит полипептид, имеющий последовательность, идентичную SEQ ID NO: 4 (например, KAVYNFATM). Согласно некоторым вариантам реализации пептид GP33-41 может содержать альтернативные производные, причем указанный пептид содержит последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85% или 90% идентична SEQ ID NO: 4.

[162] Согласно некоторым вариантам реализации концентрация гликопротеина пептида вируса *лимфоцитарного хориоменингита* составляет по меньшей мере примерно 10 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 200 нМ, 300 нМ, 400 нМ, 500 нМ, 600 нМ, 700 нМ, 800 нМ, 900 нМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 3 мкМ, 4 мкМ, 5 мкМ или более. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация гликопротеина пептида вируса *лимфоцитарного хориоменингита*

гликопротеина пептида вируса *лимфоцитарного хориоменингита* составляет примерно 1,3 мкМ или по меньшей мере 1,3 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация гликопротеина пептида вируса *лимфоцитарного хориоменингита* составляет примерно 1,4 мкМ или по меньшей мере 1,4 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация гликопротеина пептида вируса *лимфоцитарного хориоменингита* составляет примерно 1,5 мкМ или по меньшей мере 1,5 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация гликопротеина пептида вируса *лимфоцитарного хориоменингита* составляет примерно 1,0 мкМ.

[163] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда дополнительно содержит активирующие факторы, которые могут быть добавлены к культуре клеток *in vitro* в различных концентрациях для достижения желаемого результата (например, размножения, разобшенного с дифференцировкой). Предусмотрено, что активирующий Т-клетки фактор можно применять в культуральной среде для размножения Т-клеток, но не для дифференцировки Т-клеток. Например, Т-клетки можно культивировать с одним или более активирующими Т-клетки факторами, включая, но не ограничиваясь этим, IL-2. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда содержит IL-2. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет по меньшей мере примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400, 500, 1000 МЕ/мл или более. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет от примерно 10 до 100 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет от примерно 100 до 200 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет от примерно 200 до 500 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет от примерно 500 до 1000 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 10 МЕ/мл или по меньшей мере 10 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 20 МЕ/мл или по меньшей мере 20 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 30 МЕ/мл или по меньшей мере 30 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 40 МЕ/мл или по меньшей мере 40 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 50 МЕ/мл или по меньшей мере 50 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 60 МЕ/мл или по меньшей мере 60 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 70 МЕ/мл или по меньшей мере 70 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 90 МЕ/мл или по меньшей мере 90 МЕ/мл. Согласно

[illegible]

добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 0 культивирования, причем концентрацию указанного соединения уменьшают на протяжении всего культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 0 культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 0 культивирования или на примерно день 3 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 0 культивирования или на примерно день 5 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 0 культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 1 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 2 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 3 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 4 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 5 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации культивирование включает добавление соединения, подвергаемого скринингу, на примерно день 6 после начала культивирования.

[165] Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время культивирования, составляет примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время культивирования, составляет примерно 1 день. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время культивирования, составляет примерно 2 дня. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время

[illegible]

МЕ/мл или по меньшей мере 190 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 200 МЕ/мл или по меньшей мере 200 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 210 МЕ/мл или по меньшей мере 210 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 220 МЕ/мл или по меньшей мере 220 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 230 МЕ/мл или по меньшей мере 230 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 240 МЕ/мл или по меньшей мере 240 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 250 МЕ/мл или по меньшей мере 250 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 200 МЕ/мл.

обеспечения стимуляции и/или пролиферации Т-клеток во время повторной стимуляции (d), составляет примерно 58 часов.

[168] Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения пролиферации Т-клеток во время размножения (e), составляет примерно 24 часа.

[169] Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения пролиферации Т-клеток во время размножения (e), составляет от примерно 6 до 12 часов. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения пролиферации Т-клеток во время размножения (e), составляет от примерно 12 до 18 часов. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения пролиферации Т-клеток во время размножения (e), составляет от примерно 18 до 24 часов. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения пролиферации Т-клеток во время размножения (e), составляет от примерно 24 до 30 часов. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения пролиферации Т-клеток во время размножения (e), составляет от примерно 12 до 36 часов. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения пролиферации Т-клеток во время размножения (e), составляет по меньшей мере примерно 5, 10, 15, 20 или 25 часов. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения пролиферации Т-клеток во время размножения (e), составляет примерно 18 часов. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения пролиферации Т-клеток во время размножения (e), составляет примерно 24 часа. Согласно некоторым вариантам реализации период времени, достаточный для обеспечения пролиферации Т-клеток во время размножения (e), составляет примерно 30 часов.

[170] Согласно некоторым вариантам реализации измерение (j) проводят на примерно день 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации измерение (j) проводят в период от примерно дня 5 до примерно дня 9 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации измерение (j) проводят в период от примерно дня 9 до примерно дня 12 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации измерение (j) проводят в период от примерно дня 12 до примерно дня 15 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации измерение (j) проводят в период от примерно дня 15 до примерно дня 18 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации измерение (j) проводят на примерно день 7 после начала

культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации измерение (j) проводят на примерно день 8 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации измерение (j) проводят на примерно день 9 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации измерение (j) проводят на примерно день 10 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации измерение (j) проводят на примерно день 11 после начала культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации измерение (j) проводят на примерно день 12 после начала культивирования.

Применение сахаров и других соединений, которые разобщают размножение Т-клеток и дифференцировку

[171] Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены способы размножения активированных Т-клеток с получением Т-клеток с повышенной устойчивостью *in vivo* после адоптивного переноса с применением одного из соединений, описанных в настоящем документе, которые способны разобщать размножение Т-клеток и дифференцировку. Согласно связанному аспекту настоящего изобретения предложены способы поддержания менее дифференцированного статуса (например, «стволовости») популяции активированных Т-клеток (например, прогениторных истощенных Т-клеток). Согласно некоторым вариантам реализации соединение, применяемое для реализации способов согласно настоящему изобретению, может быть выбрано, например, из соединений сахара, таких как GlcNAc и Neu5Ac, ингибиторов EZH2 или ингибиторов KRAS (G12C). Согласно некоторым другим вариантам реализации применяемое соединение может быть выбрано из промежуточных и конечных продуктов биосинтеза пурина и пиримидина, а также соединений, ингибирующих глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, как описано в настоящем документе. Различные активированные Т-клетки поддаются размножению с помощью указанных способов. Они включают, например, стволовые Т-клетки памяти (Tscm), Т-клетки центральной памяти (Tcm), Т-клетки эффекторной памяти, эффекторные Т-клетки, прогениторные истощенные Т-клетки (Treh) или терминально истощенные Т-клетки (Ttex). Согласно некоторым вариантам реализации полученные Т-клетки можно оценить на предмет менее дифференцированного состояния по сравнению с активированными Т-клетками, не обработанными указанным соединением. Согласно некоторым вариантам реализации способы направлены на стимулирование размножения и/или пролиферации прогениторных истощенных Т-клеток с повышенным размножением и/или устойчивостью, и включают приведение популяции клеток, содержащей прогениторные истощенные Т-клетки, в контакт с эффективным количеством соединения. Согласно

некоторым другим вариантам реализации настоящего изобретения предложены способы применения указанных соединений (например, соединений производного сахара, таких как Neu5Ac и GlcNAc) для поддержания TCF-положительных Т-клеток или для превращения TCF-1-отрицательных Т-клеток в TCF-1-положительные или частично положительные. Некоторые из этих способов направлены на обращение TCF-отрицательного фенотипа инфильтрирующих опухоль Т-клеток, таких как терминально истощенные Tim-3⁺TCF⁻ клетки.

[172] Согласно некоторым вариантам реализации пролиферация Т-клеток, стимулируемая соединением, разобщает размножение Т-клеток и дифференцировку. Согласно некоторым вариантам реализации эффективное количество представляет собой количество, достаточное для того, чтобы вызвать пролиферацию клетки или популяции клеток.

[173] Согласно некоторым вариантам реализации соединение представляет собой сахар. Согласно некоторым вариантам реализации сахар представляет собой трегалозу, сахарозу, лактозу, глюкозу, галактозу, фруктозу, нейраминовую кислоту или их производное. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация сахара выше физиологических уровней. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет по меньшей мере примерно 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ, 20 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ, 50 мМ, 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 85 мМ, 90 мМ, 95 мМ, 100 мМ, 150 мМ, 200 мМ, 250 мМ, 300 мМ, 350 мМ, 400 мМ, 450 мМ, 500 мМ или более. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет по меньшей мере примерно 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ, 100 мМ, 110 мМ, 120 мМ, 130 мМ, 140 мМ или 150 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет от примерно 10 мМ до 500 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет от примерно 10 мМ до 250 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет от примерно 10 мМ до 150 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет от примерно 10 мМ до 100 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 40 мМ или по меньшей мере 50 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 50 мМ или по меньшей мере 50 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 60 мМ или по меньшей мере 60 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 70 мМ или по меньшей мере 70 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 80 мМ или по меньшей мере 80 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 90 мМ или по меньшей мере 90 мМ. Согласно

некоторым вариантам реализации концентрация составляет 100 мМ или по меньшей мере 100 мМ.

[174] Согласно некоторым вариантам реализации приведение популяции клеток, содержащей прогениторные истощенные Т-клетки, в контакт с эффективным количеством указанного соединения поддерживается в течение периода времени, достаточного для стимуляции пролиферации прогениторных истощенных Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетки приводят в контакт в условиях и в течение достаточных периодов времени так, что 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или даже 100% Т-клеток размножаются, по желанию. Т-клетки приводят в контакт в условиях и в течение периодов времени, достаточных для достижения желаемого размножения. Согласно некоторым вариантам реализации период времени составляет по меньшей мере примерно 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, 28, 29 или более дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени составляет от примерно 3 дней до 5 дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени составляет от примерно 3 дней до 7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени составляет от 3 дней до 10 дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени составляет примерно 1 день или по меньшей мере 1 день. Согласно некоторым вариантам реализации период времени составляет примерно 2 дня или по меньшей мере 2 дня. Согласно некоторым вариантам реализации период времени составляет примерно 3 дня или по меньшей мере 3 дня. Согласно некоторым вариантам реализации период времени составляет примерно 4 дня или по меньшей мере 4 дня. Согласно некоторым вариантам реализации период времени составляет примерно 5 дней или по меньшей мере 5 дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени составляет примерно 6 дней или по меньшей мере 6 дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени составляет примерно 7 дней или по меньшей мере 7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени составляет примерно 8 дней или по меньшей мере 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени составляет примерно 9 дней или по меньшей мере 9 дней. Согласно некоторым вариантам реализации период времени составляет примерно 10 дней или по меньшей мере 10 дней. Согласно некоторым вариантам реализации приведение популяции клеток, содержащей прогениторные истощенные Т-клетки, в контакт с эффективным количеством соединения поддерживают в течение периода времени примерно 3 дня. Согласно некоторым вариантам реализации приведение популяции клеток, содержащей прогениторные истощенные Т-клетки, в контакт с эффективным количеством соединения поддерживают в течение периода

времени примерно 4 дня. Согласно некоторым вариантам реализации приведение популяции клеток, содержащей прогениторные истощенные Т-клетки, в контакт с эффективным количеством соединения поддерживают в течение периода времени примерно 5 дней. Согласно некоторым вариантам реализации приведение популяции клеток, содержащей прогениторные истощенные Т-клетки, в контакт с эффективным количеством соединения поддерживают в течение периода времени примерно 6 дней. Согласно некоторым вариантам реализации приведение популяции клеток, содержащей прогениторные истощенные Т-клетки, в контакт с эффективным количеством соединения поддерживают в течение периода времени примерно 7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации приведение популяции клеток, содержащей прогениторные истощенные Т-клетки, в контакт с эффективным количеством соединения поддерживают в течение периода времени примерно 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации приведение популяции клеток, содержащей прогениторные истощенные Т-клетки, в контакт с эффективным количеством соединения поддерживают в течение периода времени примерно 9 дней. Согласно некоторым вариантам реализации приведение популяции клеток, содержащей прогениторные истощенные Т-клетки, в контакт с эффективным количеством соединения поддерживают в течение периода времени примерно 10 дней. Согласно некоторым вариантам реализации приведение популяции клеток, содержащей прогениторные истощенные Т-клетки, в контакт с эффективным количеством соединения поддерживают в течение периода времени примерно 11 дней. Согласно некоторым вариантам реализации приведение популяции клеток, содержащей прогениторные истощенные Т-клетки, в контакт с эффективным количеством соединения поддерживают в течение периода времени примерно 12 дней.

[175] Согласно некоторым вариантам реализации приведение Т-клеток в контакт с соединением включает приведение Т-клеток в контакт с культуральной средой, содержащей соединение. Согласно некоторым вариантам реализации приведение Т-клеток в контакт с культуральной средой включает культивирование *in vitro*. Соединение способов согласно настоящему изобретению можно применять с любым видом культуральных сред, которые будут известны специалисту в данной области техники (см., например, Current Protocols in Cell Culture, 2000- 2009 за авторством John Wiley & Sons, Inc.). Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит среду RPMI 1640, добавку GlutaMAX™ (Gibco, № по каталогу 61870-036), дополненную 10% ФБС (HyClone, № по каталогу SH30396.03), 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco, № по каталогу 15140-122), 1% MEM NEAA (Gibco, № по каталогу 1140-050), 1 мМ пирувата

натрия (Gibco, № по каталогу 11360-070), 10 mM HEPES (Gibco, № по каталогу 15630-080) и 55 мкМ 2-меркаптоэтанола (Gibco, № по каталогу 21985-023).

[176] Согласно определенным вариантам реализации через некоторый период времени, например, через 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более дней, к культивируемым Т-клеткам можно добавить дополнительный объем культуральной среды. Согласно некоторым вариантам реализации дополнительный объем культуральной среды может быть добавлен к культивируемым Т-клеткам через 1 день. Согласно некоторым вариантам реализации дополнительный объем культуральной среды может быть добавлен к культивируемым Т-клеткам через 2 дня. Согласно некоторым вариантам реализации дополнительный объем культуральной среды может быть добавлен к культивируемым Т-клеткам через 3 дня. Согласно некоторым вариантам реализации дополнительный объем культуральной среды может быть добавлен к культивируемым Т-клеткам через 4 дня. Согласно некоторым вариантам реализации дополнительный объем культуральной среды может быть добавлен к культивируемым Т-клеткам через 5 дней. Согласно некоторым вариантам реализации дополнительный объем культуральной среды может быть добавлен к культивируемым Т-клеткам через 6 дней. Согласно некоторым вариантам реализации дополнительный объем культуральной среды может быть добавлен к культивируемым Т-клеткам через 7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации дополнительный объем культуральной среды может быть добавлен к культивируемым Т-клеткам через 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации дополнительный объем культуральной среды может быть добавлен к культивируемым Т-клеткам через 9 дней. Согласно некоторым вариантам реализации дополнительный объем культуральной среды может быть добавлен к культивируемым Т-клеткам через 10 дней.

[177] Согласно определенным вариантам реализации Т-клетки, культивированные с соединением, характеризуются более значительным размножением по сравнению с Т-клетками, не культивированными с соединением. Согласно определенным вариантам реализации Т-клетки, культивированные с соединением, характеризуются по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 раз более значительным размножением по сравнению с Т-клетками, не культивированными с соединением. Согласно определенным вариантам реализации Т-клетки, культивированные с соединением, характеризуются 1- или 2-кратно более значительным размножением по сравнению с Т-клетками, не культивированными с соединением. Согласно определенным вариантам реализации Т-клетки, культивированные с соединением, характеризуются 7- или 14-кратно более значительным размножением по сравнению с Т-клетками, не культивированными с соединением.

[178] Согласно определенным вариантам реализации Т-клетки культивируют в условиях и в течение достаточных периодов времени так, что число клеток 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 20-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 90-, 100-кратно или более превышает число Т-клеток в начале культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации число клеток в 10-1000 раз больше, включая последовательные целые числа в пределах указанного диапазона, чем число Т-клеток в начале культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации размноженная популяция Т-клеток по меньшей мере в 10 раз превышает исходную выделенную популяцию Т-клеток. Согласно другому варианту реализации размноженная популяция Т-клеток по меньшей мере в 100 раз превышает исходную выделенную популяцию Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации размноженная популяция Т-клеток по меньшей мере в 500 раз превышает исходную выделенную популяцию Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации размноженная популяция Т-клеток по меньшей мере в 1000 раз превышает исходную выделенную популяцию Т-клеток.

[179] Предусмотрено, что Т-клетка могла быть трансфицирована или сконструирована для экспрессии одного или более представляющих интерес белков и собрана из культуры после размножения *in vitro*. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют перед культивированием Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют за 1 день до культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют за 2 дня до культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют за 3 дня до культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют за 4 дня до культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют за 5 дней до культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют за 6 дней до культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют за 7 дней до культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют за 8 дней до культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют за 9 дней до культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют за 10 дней до культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам

реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют за от примерно 1 до примерно 10 дней до культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют за от примерно 1 до примерно 5 дней до культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют после культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют через 1 день после культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют через 2 дня после культивирования Т-клетки соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют через 3 дня после культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют через 4 дня после культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют через 5 дней после культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют через 6 дней после культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют через 7 дней после культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют через 8 дней после культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют через 9 дней после культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют через 10 дней после культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют через от примерно 1 до примерно 10 дней после культивирования Т-клетки с соединением. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку трансфицируют или конструируют через от примерно 1 до примерно 5 дней после культивирования Т-клетки с соединением.

[180] Согласно некоторым вариантам реализации приведение Т-клеток в контакт с соединением включает обработку *in vivo*, включающую приведение соединения в контакт с Т-клетками *in vivo*. Согласно некоторым вариантам реализации обработка *in vivo* включает введение соединения субъекту, причем указанное соединение приводят в контакт с Т-клеткой. Согласно некоторым вариантам реализации обработка *in vivo* включает введение соединения и одного или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ или разбавителей. Согласно некоторым вариантам реализации соединение, по отдельности или с популяцией целевых клеток (например, популяцией

антиген-специфичных или трансфицированных или иным образом сконструированных и размноженных Т-клеток) согласно настоящему изобретению, можно вводить совместно субъекту для поддержания Т-клеточной адоптивной терапии. Согласно некоторым вариантам реализации соединение вводят субъекту после введения Т-клеток, причем Т-клетки применяют для адоптивной клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам реализации соединение вводят субъекту одновременно с Т-клетками, причем Т-клетки применяют для адоптивной клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам реализации обработка *in vivo* повышает размножение *in vivo* перенесенных Т-клеток, используемых для адоптивной клеточной терапии, по сравнению с Т-клетками, перенесенными без введения соединения. Согласно некоторым вариантам реализации обработка *in vivo* поддерживает большую стволовость перенесенных Т-клеток, используемых для адоптивной клеточной терапии, по сравнению с Т-клетками, перенесенными без введения соединения. Согласно некоторым вариантам реализации обработка *in vivo* повышает устойчивость *in vivo* перенесенных Т-клеток, используемых для адоптивной клеточной терапии, по сравнению с Т-клетками, перенесенными без введения соединения. Согласно некоторым вариантам реализации соединение вводят субъекту одновременно с Т-клетками, причем Т-клетки применяют для адоптивной клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам реализации соединение приводят в контакт с Т-клетками *in vitro* до переноса, а также *in vivo* после переноса Т-клеток субъекту. Согласно некоторым вариантам реализации соединение не приводят в контакт с Т-клетками *in vitro* до переноса и не приводят в контакт с Т-клетками *in vivo* после переноса Т-клеток субъекту.

[181] Введение средства лечения *in vivo* может быть выполнено несколькими способами в зависимости от того, является ли желательным местное или системное введение. Соединение, как правило, подходит для парентерального введения, причем введение включает любой путь введения, характеризующийся физическим разрушением ткани субъекта, и введение соединения посредством разрушения в ткани, что обычно приводит к непосредственному введению в кровоток, в мышцу или во внутренний орган. Таким образом, парентеральное введение включает, но не ограничивается этим, введение соединения путем инъекции, путем нанесения соединения через хирургический разрез, путем нанесения соединения через проникающую в ткань нехирургическую рану и тому подобное. В частности, предусмотрено, что парентеральное введение включает, но не ограничивается перечисленными, подкожную, внутрибрюшинную, внутримышечную, интрастернальную, внутривенную, интраназальную, интратрахеальную, внутриартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, интрауретральную,

внутричерепную, внутриопухолевую, внутриглазную, внутрикожную, интрасиновиальную инъекцию или инфузии, а также внутриопухолевые методики. Согласно некоторым вариантам реализации соединение вводят внутривенно.

Культуральный состав

[182] Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена культуральная среда для стимуляции размножения и/или пролиферации прогениторных истощенных Т-клеток с повышенным размножением и/или устойчивостью, содержащая эффективное количество соединения, причем указанное соединение идентифицировано в способах скрининга соединений, которые стимулируют пролиферацию прогениторных истощенных Т-клеток.

[183] Согласно некоторым вариантам реализации среда для применения в способах, описанных в настоящем документе, включает, но не ограничивается этим, среду Дульбекко, модифицированную Исковым (с фетальной бычьей сывороткой или без нее или другой подходящей сывороткой). Иллюстративная среда также включает, но не ограничивается перечисленными, IMDM, RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 и X-Vivo 20. Согласно некоторым вариантам реализации среда может содержать поверхностно-активное вещество, антитело, плазманат или восстанавливающий агент, один или более антибиотиков и/или добавки, такие как инсулин, трансферрин, селенит натрия и циклоспорин. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит среду RPMI 1640, добавку GlutaMAX™ (Gibco, № по каталогу 61870-036), дополненную 10% ФБС (HyClone, № по каталогу SH30396.03), 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco, № по каталогу 15140-122), 1% MEM NEAA (Gibco, № по каталогу 1140-050), 1 мМ пирувата натрия (Gibco, № по каталогу 11360-070), 10 мМ HEPES (Gibco, № по каталогу 15630-080) и 55 мкМ 2-меркаптоэтанола (Gibco, № по каталогу 21985-023).

[184] Согласно некоторым вариантам реализации пролиферация Т-клеток, стимулируемая соединением, разобщает размножение Т-клеток и дифференцировку. Согласно некоторым вариантам реализации эффективное количество представляет собой количество, достаточное для того, чтобы вызвать пролиферацию популяции Т-клеток.

[185] В Примере 5 описан транскриптомный анализ Т-клеток, культивированных *in vitro* с идентифицированным соединением или без него, которое разобщает пролиферацию и дифференцировку. Было выявлено, что многочисленные гены в значительной степени дифференциально экспрессируются в Т-клетках, обработанных соединением (например, GlcNac или Neu5Ac), по сравнению с клетками без обработки соединением, которое идентифицировано как разобщающее пролиферацию и дифференцировку. Кроме того,

наблюдали заметное сходство между вторичными анализами ПСА из Т-клеток, подвергшихся воздействию различных соединений, идентифицированных как разобщающие пролиферацию и дифференцировку. Таким образом, в значительной степени дифференциально регулируемые гены, обнаруженные в образцах, обработанных соединением, идентифицированным как разобщающее пролиферацию и дифференцировку, вероятно, играют существенную роль в молекулярных механизмах, ответственных за разобщение. Таким образом, соединение, которое модулирует один или более из генов Cd24a, Igfbp7, Tcf7, Igfbp4, Adcy5, Nt5e, Hck, Lif, Apol9b, Gm4951, ligp1, Gzmk, Serpina3f, Nt5dc2, Maged1, Bmf, Cacnb3, Fut4, Egr1, Slc6a12, Fbxo2, Egr2, Fos, Plxnb2, Marcksl1, Ikzf2, Filip1I, Trerf1, Stard10, Pls1, Gm13546, Ccr7, Igha, Itgae, Hic1, Klrh1, Als2cl, Tanc2, Slco4a1, Piwil4, Slc25a23, Itga4, Ckb, Actn1, Sema7a, Gm24187, Mir6236, H4c12, Gzmc, Prf1, Csf1, Gzmd, Tspan32, Atp6v0a1, Map6, Lmna, Rxra, Gpr141, Gm20559, Adam8, Anxa1, Stc2, Fosl2, Akr1c13, Cdkn2a, Crmp1, Tnfrsf21, Kctd12, Ccr2, Samd9I, Sytl2, Ccr5, Tnfrsf9, Mme, Asns, Eomes, Oas3, Ly6a2, Ifi204, Ifit1, Cdh1, Ifit3, Isg15, Rtp4, Mx1, Oasl2, Rpl12, Rrp1, Rrp1b, Rrp12, Rrp15, mt.Rnr2, CT010467.2, Gm23935, Ct010467.1 и Lars2, как ожидается, повлияет на разобщение дифференцировки и пролиферации Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации соединение представляет собой соединение, которое модулирует один или более из генов Cd24a, Igfbp7, Tcf7, Igfbp4, Adcy5, Nt5e, Hck, Lif, Apol9b, Gm4951, ligp1, Gzmk, Serpina3f, Nt5dc2, Maged1, Bmf, Cacnb3, Fut4, Egr1, Slc6a12, Fbxo2, Egr2, Fos, Plxnb2, Marcksl1, Ikzf2, Filip1I, Trerf1, Stard10, Pls1, Gm13546, Ccr7, Igha, Itgae, Hic1, Klrh1, Als2cl, Tanc2, Slco4a1, Piwil4, Slc25a23, Itga4, Ckb, Actn1, Sema7a, Gm24187, Mir6236, H4c12, Gzmc, Prf1, Csf1, Gzmd, Tspan32, Atp6v0a1, Map6, Lmna, Rxra, Gpr141, Gm20559, Adam8, Anxa1, Stc2, Fosl2, Akr1c13, Cdkn2a, Crmp1, Tnfrsf21, Kctd12, Ccr2, Samd9I, Sytl2, Ccr5, Tnfrsf9, Mme, Asns, Eomes, Oas3, Ly6a2, Ifi204, Ifit1, Cdh1, Ifit3, Isg15, Rtp4, Mx1, Oasl2, Rpl12, Rrp1, Rrp1b, Rrp12, Rrp15, mt.Rnr2, CT010467.2, Gm23935, Ct010467.1 и Lars2.

[186] Согласно некоторым вариантам реализации соединение представляет собой сахар. Согласно некоторым вариантам реализации сахар представляет собой трегалозу, сахарозу, лактозу, глюкозу, галактозу, фруктозу, нейраминную кислоту или их производное. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация сахара выше физиологических уровней. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет по меньшей мере примерно 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ, 20 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ, 50 мМ, 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 85 мМ, 90 мМ, 95 мМ, 100 мМ, 150 мМ, 200 мМ, 250 мМ, 300 мМ, 350 мМ, 400 мМ, 450 мМ, 500 мМ или более. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет по

меньшей мере примерно 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ, 100 мМ, 110 мМ, 120 мМ, 130 мМ, 140 мМ или 150 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет от примерно 10 мМ до 500 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет от примерно 10 мМ до 250 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет от примерно 10 мМ до 150 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет от примерно 10 мМ до 100 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 40 мМ или по меньшей мере 50 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 50 мМ или по меньшей мере 50 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 60 мМ или по меньшей мере 60 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 70 мМ или по меньшей мере 70 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 80 мМ или по меньшей мере 80 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 90 мМ или по меньшей мере 90 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 100 мМ или по меньшей мере 100 мМ. I

[187] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда дополнительно содержит активирующие факторы, которые могут быть добавлены к культуре клеток *in vitro* в различных концентрациях для достижения желаемого результата (например, размножения, разобщенного с дифференцировкой). Предусмотрено, что активирующий Т-клетки фактор можно применять в культуральной среде для размножения Т-клеток, но не для дифференцировки Т-клеток. Например, Т-клетки можно культивировать с одним или более активирующими Т-клетки факторами, включая, но не ограничиваясь этим, IL-2. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда содержит IL-2. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет по меньшей мере примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400, 500, 1000 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет от примерно 10 до примерно 100 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет от примерно 100 до примерно 200 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет от примерно 200 до примерно 500 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет от примерно 500 до примерно 1000 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 10 МЕ/мл или по меньшей мере 10 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 20 МЕ/мл или по меньшей мере 20 МЕ/мл. Согласно

[illegible]

количество IL-2 составляет примерно 60 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 200 МЕ/мл.

FucoID и применение сахаров

[188] Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ идентификации прогениторных истощенных Т-клеток, специфичных в отношении антигена, включающий: (a) культивирование популяции клеток, содержащей прогениторные истощенные Т-клетки, в культуральной среде; (b) приведение популяции клеток в контакт с модифицированной дендритной клеткой в присутствии донорного сахарного нуклеотида, конъюгированного с меткой, причем (i) модифицированная дендритная клетка сконструирована таким образом, чтобы содержать на своей клеточной поверхности активную фукозилтрансферазу, которая способна катализировать гликозилирование гликана клеточной поверхности на Т-клетке с использованием донорного сахарного нуклеотида; и (ii) модифицированная дендритная клетка праймирована одним или более антигенами; и (c) анализ клеточной поверхности популяции прогениторных истощенных Т-клеток после приведения в контакт, чтобы определить присутствие какой-либо метки; причем присутствие метки на клеточной поверхности прогениторных истощенных Т-клеток указывает на то, что прогениторная истощенная Т-клетка специфична в отношении антигена со специфичностью в отношении по меньшей мере одного из одного или более антигенов.

[189] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда содержит эффективное количество сахара. Согласно некоторым вариантам реализации сахар представляет собой трегалозу, сахарозу, лактозу, глюкозу, галактозу, фруктозу, нейраминовую кислоту или их производное. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация сахара выше физиологических уровней. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет по меньшей мере примерно 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM, 80 mM, 85 mM, 90 mM, 95 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 500 mM или более. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет по меньшей мере примерно 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM или 150 mM. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет от примерно 10 mM до 500 mM. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет от примерно 10 mM до 250 mM. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет от примерно 10 mM до 150 mM. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет от примерно 10 mM до 100 mM. Согласно

некоторым вариантам реализации концентрация составляет 40 мМ или по меньшей мере 50 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 50 мМ или по меньшей мере 50 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 60 мМ или по меньшей мере 60 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 70 мМ или по меньшей мере 70 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 80 мМ или по меньшей мере 80 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 90 мМ или по меньшей мере 90 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации концентрация составляет 100 мМ или по меньшей мере 100 мМ.

[190] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда дополнительно содержит активирующие факторы, которые могут быть добавлены к культуре клеток *in vitro* в различных концентрациях для достижения желаемого результата (например, размножения, разобшенного с дифференцировкой). Предусмотрено, что активирующий Т-клетки фактор можно применять в культуральной среде для размножения Т-клеток, но не для дифференцировки Т-клеток. Например, Т-клетки можно культивировать с одним или более активирующими Т-клетки факторами, включая, но не ограничиваясь этим, IL-2. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда содержит IL-2. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет по меньшей мере примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400, 500, 1000 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет от примерно 10 до примерно 100 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет от примерно 100 до примерно 200 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет от примерно 200 до примерно 500 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет от примерно 500 до примерно 1000 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 10 МЕ/мл или по меньшей мере 10 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 20 МЕ/мл или по меньшей мере 20 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 30 МЕ/мл или по меньшей мере 30 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 40 МЕ/мл или по меньшей мере 40 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 50 МЕ/мл или по меньшей мере 50 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 60 МЕ/мл или по меньшей мере 60 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 70 МЕ/мл или по меньшей мере 70

МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 90 МЕ/мл или по меньшей мере 90 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 10 МЕ/мл или по меньшей мере 10 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 100 МЕ/мл или по меньшей мере 100 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 110 МЕ/мл или по меньшей мере 110 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 120 МЕ/мл или по меньшей мере 120 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 130 МЕ/мл или по меньшей мере 130 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 140 МЕ/мл или по меньшей мере 140 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 150 МЕ/мл или по меньшей мере 150 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 160 МЕ/мл или по меньшей мере 160 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 170 МЕ/мл или по меньшей мере 170 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 180 МЕ/мл или по меньшей мере 180 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 190 МЕ/мл или по меньшей мере 190 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 200 МЕ/мл или по меньшей мере 200 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 210 МЕ/мл или по меньшей мере 210 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 220 МЕ/мл или по меньшей мере 220 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 230 МЕ/мл или по меньшей мере 230 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 240 МЕ/мл или по меньшей мере 240 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 250 МЕ/мл или по меньшей мере 250 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 60 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации количество IL-2 составляет примерно 200 МЕ/мл.

[191] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено применение композиций и способов для идентификации и обогащения Т-клеток, реактивных в отношении опухолеспецифического антигена (TSA), из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) или циркулирующих Т-клеток и/или для идентификации и обогащения Т-клеток, распознающих антигены конкретного заболевания.

[192] В настоящем документе термин «FusoID» или «мечение FusoID» относится к способу идентификации и обогащения антиген-специфичных Т-клеток с применением фукозилтрансферазы. FusoID включает приведение популяции Т-клеток в контакт с модифицированной дендритной клеткой в присутствии донорного сахарного нуклеотида, который конъюгирован с меткой, (i) причем указанная модифицированная дендритная клетка сконструирована таким образом, чтобы содержать на своей клеточной поверхности активную гликозилтрансферазу, способную катализировать гликозилирование гликана клеточной поверхности на Т-клетке с использованием донорного сахарного нуклеотида; и (i) причем указанная модифицированная дендритная клетка праймирована одним или более антигенами; и (b) анализ клеточной поверхности популяции Т-клеток после приведения в контакт для определения присутствия какой-либо метки; при этом присутствие метки на клеточной поверхности Т-клетки указывает на то, что Т-клетка представляет собой реактивную Т-клетку со специфичностью в отношении по меньшей мере одного из одного или более антигенов.

[193] Термины «фукозилтрансфераза», «FucT» и «FT» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к ферменту (например, гликозилтрансферазе), который катализирует перенос фукозы от ГДФ-β-L-фукозы («ГДФ-фукоза») к акцепторному субстрату. Акцепторный субстрат может находиться на олигосахариде и/или белке. Например, фукозилтрансферазы могут переносить фукозу к самому внутреннему остатку GlcNAc (N-ацетилглюкозамин), присутствующему в N-гликане (например, тип 1: Galβ1,3GlcNAc), что приводит к α-1,6-фукозилированию, известному как «фукозилирование кора». Фукозилтрансферазы также могут катализировать «концевое фукозилирование», при котором фукоза присоединяется к концевым остаткам галактозы на олигосахаридах, например, Galβ1,4GlcNAc (тип II, также называемый LacNAc) или Galβ1,3GlcNAc (тип III). На сегодняшний день описано тринадцать типов фукозилтрансфераз (включая FUT1-FUT11, POFUT1 и POFUT2), которые катализируют различные типы фукозилирования. Например, FUT1 (NM_000148.1) и FUT2 (NM_000511.1) катализируют синтез α-1,2-фукозилирования; FUT3 (NM_000149.1) катализирует синтез α-1,3- и α-1,4-фукозилирования (α-1,3/4-фукозилирования); FUT4 (NM_002033.1), FUT5 (NM_002034.1), FUT6 (NM_000150.1) FUT7 (NM_004479.1), FUT9 (NM_006581.1), FUT10 (NM_032664.2) и FUT11 (NM_173540.1) катализируют α-1,3-фукозилирование; FUT8 (NM_004480.1) катализирует α-1,6-фукозилирование; и POFUT1(NM_015352.1) и POFUT2 (NM_015227.1) катализируют добавление фукозы непосредственно к полипептидам за счет О-гликозидной связи с остатками серина и треонина. Каждая из последовательностей, соответствующих вышеуказанным номерам

референсных последовательностей NCBI для тринадцати ферментов фукозилтрансфераз, полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

[194] Термин LacNAc относится к N-ацетиллактозамину и взаимозаменяемо относится к Gal 1,4 GlcNAc.

[195] Термины sLacNAc и сиалил-LacNAc относятся к α 2,3-сиалированному LacNAc, также называемому в настоящей заявке сиалиллактозаминном.

[196] Согласно различным вариантам реализации в композициях и способах согласно настоящему изобретению предложены клетки, сконструированные таким образом, чтобы на их клеточной поверхности присутствовал фермент, так, что при контакте с другой клеткой фермент на сконструированной клетке катализирует реакцию мечения, которая присоединяет метку (или «тэг») на другую клетку. Этот процесс упоминается в настоящем документе как «мечение, зависящее от взаимодействия»; и сконструированная клетка, катализирующая реакцию мечения, упоминается как «клетка-приманка», а клетка, которая помечена клеткой-приманкой, упоминается как «клетка-жертва». Согласно некоторым вариантам реализации с помощью методик, описанных в настоящем документе, модифицированные фукозилтрансферазой (FT)- (или другим ферментом) аутологичные иДК, праймированные антигеном, например, опухолевым лизатом, можно применять в качестве клеток-приманок, которые индуцируют перенос при сближении биотининовых (или других) меток к поверхности клеток, которые взаимодействуют с ДК, например, TIL или циркулирующих Т-клеток. С помощью флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS) (например, или других способов обогащения) биотинилированные Т-клетки (или иным образом меченые клетки) могут быть выделены как полноценные антиген-реактивные клетки, например, TSA-реактивные TIL. Эти выделенные клетки также могут экспрессировать используемые в настоящее время поверхностные маркеры, обозначающие перспективную TSA-реактивность (например, PD-1, CD134 или CD137), или другие маркеры, такие как CXCR5 и/или TIM3. Согласно таким вариантам реализации, поскольку биотинилирование при сближении происходит только на клетках, которые взаимодействуют с антигенпрезентирующими ДК, при применении данного способа эффективно исключаются случайные (bystander) CD8⁺ Т-клетки, обнаруженные в инфильтратах опухолей человека, которые также экспрессируют PD-1, CD134, CD137, CXCR5 и/или TIM330. Таким образом, в различных вариантах реализации настоящее изобретение включает композиции (включая фармацевтические композиции) TSA-реактивных TIL или Т-клеток, которые выделены с помощью способов мечения при сближении, раскрытых в настоящем документе, а также размноженные популяции таких

TSA-реактивных ТП или Т-клеток. Такие композиции можно применять при лечении или предотвращении заболеваний (например, рака).

[197] Согласно различным вариантам реализации клетки-приманки согласно настоящему изобретению содержат фермент на их клеточной поверхности для катализа переноса метки (или «тэга») к целевой клетке-жертве, когда клетка-приманка и клетка-жертва вступают в контакт. Ферменты, подходящие для применения на поверхности клетки-приманки, описаны в настоящем документе и включают, без ограничения, гликозилтрансферазы (например, фукозилтрансферазы и сиалилтрансферазы), сортазы и универсальные биотинлигазы.

[198] В качестве клетки-приманки может быть использована любая клетка, способная контактировать с другой клеткой, при условии, что она может быть сконструирована таким образом, чтобы иметь на своей поверхности подходящий фермент для катализа мечения контактирующей клетки-жертвы, индуцированного контактом и зависящего от взаимодействия. Согласно некоторым вариантам реализации клетка-приманка представляет собой антигенпрезентирующую клетку (АПК). В некоторых случаях клетка-приманка представляет собой специализированную АПК. В некоторых случаях клетка-приманка представляет собой неспециализированную АПК. В некоторых случаях клетка-приманка экспрессирует молекулу ГКГС класса I. В некоторых случаях клетки-приманки экспрессируют молекулу ГКГС класса II. В некоторых случаях клетка-приманка представляет собой лейкоцит. В некоторых случаях клетка-приманка представляет собой нетипичную АПК. В некоторых случаях клетка-приманка представляет собой клетку, выбранную из ДК, макрофага, В-клетки, моноцита, гранулоцита, тучной клетки, нейтрофила, эндотелиальной клетки, эпителиальной клетки. Согласно некоторым вариантам реализации клетка-приманка представляет собой сконструированную АПК, например, искусственную АПК («иАПК»). Такие иАПК известны в данной области техники. иАПК может представлять собой иАПК на клеточной основе или иАПК не на клеточной основе. В некоторых случаях иАПК не на клеточной основе содержит сигнал 1 и сигнал 2, и необязательно сигнал 3 на иАПК наночастицы или микрочастицы включает два сигнала: сигнал главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) и костимулирующую молекулу. В некоторых случаях сигнал ГКГС в иАПК представляет собой ГКГС класса I. В некоторых случаях сигнал ГКГС в иАПК представляет собой ГКГС класса II. В некоторых случаях костимулирующий сигнал в иАПК создается CD80 (B7.1) или CD86 (B7.2). иАПК также может содержать третий сигнал, который стимулирует секрецию цитокинов, что способствует стимуляции и размножению Т-клеток. В некоторых случаях иАПК содержит третий сигнал, который стимулирует секрецию IL-2 после связывания

иАПК с Т-клеткой. В некоторых случаях иАПК представляет собой фибробласт, сконструированный для экспрессии первого сигнала и второго сигнала и необязательно третьего сигнала. Фибробласт также может экспрессировать ICAM-1 и/или LFA-3. Например, в определенных вариантах реализации клетка-приманка представляет собой дендритную клетку, а клетка-жертва представляет собой эффекторную клетку. Дендритная клетка может представлять собой незрелую дендритную клетку. Дендритная клетка может быть праймирована антигеном. Согласно некоторым вариантам реализации антиген происходит из рака, инфекции патогеном, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или генетического нарушения. Согласно некоторым вариантам реализации эффекторные клетки, применяемые в качестве клеток-жертв в настоящем изобретении в комбинации с клетками-приманками, которые представляют собой дендритные клетки, включают эффекторные клетки, выбранные из наивной Т-клетки, стволовой Т-клетки памяти, Т-клетки центральной памяти, Т-клетки эффекторной памяти, хелперной Т-клетки, CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, CD8/CD4⁺ Т-клетки, αβ Т-клетки, γδ Т-клетки, цитотоксической Т-клетки, естественной киллерной Т-клетки, естественной киллерной клетки и макрофага. В таких способах аутологичные незрелые ДК, праймированные опухолевыми лизатами, в некоторых вариантах реализации могут быть модифицированы ферментом, который индуцирует перенос меток при сближении (например, биотина) к поверхности клеток-жертв (т.е. TIL или циркулирующих Т-клеток), которые взаимодействуют с ДК-приманками. Меченые (например, биотинилированные) Т-клетки, которые также могут экспрессировать используемые в настоящее время поверхностные маркеры, обозначающие перспективную TSA-реактивность (например, PD-1, CD134 или CD137)28-30 или другие маркеры, такие как CXCR5 и/или Tim3, могут быть выделены с помощью флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS) (или других подходящих способов выделения). Выделенные Т-клетки высоко обогащены антиген-реактивными Т-клетками, например, опухолереактивными Т-клетками, реактивность которых направлена на TSA. Аналогичным образом, ДК, праймированные тканевыми лизатами из биопсий пациентов с аутоиммунным заболеванием, могут быть модифицированы ферментом, который индуцирует перенос меток при сближении (например, биотина) к поверхности клеток-жертв (циркулирующих аутореактивных Т-клеток), которые взаимодействуют с ДК-приманками. На основании этого анализа могут быть выделены меченные (например, биотин⁺) CD8⁺ Т-клетки, которые являются перспективными аутореактивными Т-клетками, и меченные (например, биотин⁺) CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ Т-клетки, которые являются перспективными антиген-специфичными регуляторными Т-клетками.

[199] Согласно некоторым вариантам реализации клетка-приманка представляет собой В-клетку. Согласно некоторым вариантам реализации клетка-приманка представляет собой В-клетку, а клетка-жертва представляет собой Т-клетку. Согласно некоторым вариантам реализации клетка-приманка представляет собой наивную В-клетку или В-клетку зародышевого центра.

[200] Аналогичным образом, согласно некоторым вариантам реализации клетка-приманка представляет собой такую эффекторную клетку (например, наивную Т-клетку, стволовую Т-клетку памяти, Т-клетку центральной памяти, Т-клетку эффекторной памяти, хелперную Т-клетку, $CD4^+$ Т-клетку, $CD8^+$ Т-клетку, $CD8/CD4^+$ Т-клетку, $\alpha\beta$ Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку, естественную киллерную Т-клетку, естественную киллерную клетку или макрофаг), и, соответственно, эффекторная клетка сконструирована таким образом, чтобы иметь на своей поверхности подходящий фермент для катализа мечения контактирующей клетки-жертвы, индуцированного контактом и зависящего от взаимодействия. Согласно некоторым вариантам реализации клетка-приманка представляет собой Т-клетку, экспрессирующую на своей поверхности подходящий фермент для катализа мечения контактирующей клетки-жертвы, индуцированного контактом и зависящего от взаимодействия, и клетка-жертва представляет собой В-клетку. Согласно некоторым вариантам реализации клетка-приманка представляет собой Т-клетку, экспрессирующую на своей поверхности подходящий фермент для катализа мечения контактирующей клетки-жертвы, индуцированного контактом и зависящего от взаимодействия, и клетка-жертва представляет собой наивную В-клетку и В-клетку зародышевого центра. Согласно некоторым вариантам реализации клетка-приманка представляет собой Т-клетку, экспрессирующую на своей поверхности подходящий фермент для катализа мечения контактирующей клетки-жертвы, индуцированного контактом и зависящего от взаимодействия, и клетка-жертва представляет собой дендритную клетку. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения клетка-приманка представляет собой В-клетку, экспрессирующую на своей поверхности подходящий фермент для катализа мечения контактирующей клетки-жертвы, индуцированного контактом и зависящего от взаимодействия, и клетка-жертва представляет собой $CD4^+$ Т-клетку.

[201] Любой фермент, способный катализировать мечение контактирующей клетки-жертвы, индуцированное контактом и зависящее от взаимодействия, с использованием меченого субстрата, может быть расположен на поверхности клетки-приманки и применен в настоящем изобретении. Такой фермент упоминается в настоящем документе

как «подходящий фермент». Согласно некоторым вариантам реализации ферменты, подходящие для применения на клетке-приманке для облегчения мечения, зависящего от взаимодействия, в соответствии с настоящим изобретением (i) обладают высокой K_m по отношению к акцепторному субстрату, находящемуся на поверхности клеток-жертв, таким образом, что фоновое мечение является минимальным; и (ii) обладают высокой k_{cat} по отношению к запуску мечения, зависящего от взаимодействия, когда происходит взаимодействие между клеткой-приманкой и клеткой-жертвой. Фермент может представлять собой фермент человека. Фермент может представлять собой фермент, не являющийся человеческим. Фермент может представлять собой рекомбинантный фермент. Фермент может представлять собой выделенный фермент. Фермент может представлять собой нативный фермент. Фермент может представлять собой ненативный фермент. Фермент может содержать метку (например, эпитопную метку). Такие метки хорошо известны в данной области техники и могут быть использованы в настоящем изобретении, включая, без ограничения, любую метку, описанную в настоящем документе.

[202] В некоторых случаях фермент на поверхности клетки-приманки представляет собой трансферазу. В целом, трансферазы катализируют перенос одной молекулярной группы от одной молекулы к другой. Например, такие молекулярные группы включают фосфат, amino, метил, ацетил, ацил, фосфатидил, фосфорибозил, помимо других групп, и трансферазы, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают любую трансферазу, которая способна катализировать перенос одной молекулы к другой, даже если молекула мечена меткой (например, меткой, известной в данной области техники или описанной в настоящем документе).

[203] Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены клетки-приманки, имеющие на своей поверхности фермент, который представляет собой гликозилтрансферазу. Гликозилтрансферазы катализируют перенос доноров сахарного нуклеотида к акцепторным молекулам, которые могут включать, например, белки и другие сахарные фрагменты (гликаны), например, гликопротеины, гликолипиды, олигосахариды и т.д.

[204] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложены клетки-приманки, имеющие фукозилтрансферазу или сиалилтрансферазу на своей поверхности.

[205] Фукозилтрансферазы катализируют перенос фукозы от ГДФ-Фуc к Gal в $\alpha 1,2$ -связи и к GlcNAc в $\alpha 1,3$ -, $\alpha 1,4$ - или $\alpha 1,6$ -связи. Поскольку известные фукозилтрансферазы используют один и тот же нуклеотидный сахар, полагают, что их специфичность основана

на распознавании акцептора и типе образованной связи. На основании сходства белковых последовательностей эти ферменты были классифицированы на четыре различных семейства: (1) альфа-2-фукозилтрансферазы, (2) альфа-3-фукозилтрансферазы, (3) альфа-6-фукозилтрансферазы млекопитающих, и (4) бактериальные альфа-6-фукозилтрансферазы. В каталитических доменах всех альфа-2- и альфа-6-фукозилтрансфераз прокариотического и эукариотического происхождения идентифицированы консервативные структурные признаки, а также консенсусный пептидный мотив. Основываясь на сходстве последовательностей, альфа-2- и альфа-6-фукозилтрансферазы были сгруппированы в одно суперсемейство. Кроме того, в этом суперсемействе было обнаружено несколько строго консервативных аминокислот, и сообщалось, что два из этих остатков имеют большое значение для ферментативной активности альфа-2-фукозилтрансферазы человека. Альфа-3-фукозилтрансферазы представляют собой отдельное семейство, поскольку они лишены консенсусного пептида, но некоторые области имеют сходство с альфа-2- и альфа-6-фукозилтрансферазами. Все эти наблюдения убедительно свидетельствуют о том, что фукозилтрансферазы имеют некоторые общие структурные и/или каталитические признаки. У человека описано по меньшей мере 11 фукозилтрансфераз, и они кодируются человеческими генами FUT1; FUT2; FUT3; FUT4; FUT5; FUT6; FUT7; FUT8; FUT9; FUT10; и FUT11.

[206] Сиалилтрансферазы представляют собой гликозилтрансферазы, ответственные за терминальное сиалирование углеводных групп гликопротеинов, гликолипидов и олигосахаридов, которые содержат консервативную область гомологии в каталитическом домене. Члены семейства генов сиалилтрансфераз включают Gal/31,3GalNAc α 2,3 сиалилтрансферазу и Gal1,3(4)GlcNAc α 2,3 сиалилтрансферазу. Сиалирование относится к переносу сиаловой кислоты в конечное положение на сахарных цепях гликопротеинов, гликолипидов, олигосахаридов и тому подобного. Примерами ферментативно функциональных сиалилтрансфераз являются те, которые способны переносить сиаловую кислоту из ЦМФ-сиаловой кислоты к акцепторному олигосахариду, где олигосахаридный акцептор варьируется в зависимости от конкретной сиалилтрансферазы. Многочисленные сиалилтрансферазы известны в данной области техники и включают, без ограничения, сиалилтрансферазы человека SIAT4C; SIAT9; ST3GAL1; ST3GAL2; ST3GAL3; ST3GAL4; ST3GAL5; ST3GAL6; ST3GalIII; ST6GAL1; ST6GAL2; ST6Gal; ST8SIA1; ST8SIA2; ST8SIA3; ST8SIA4; ST8SIA5; ST8SIA6; и ST8Sia.

[207] Как правило, гликозилтрансферазы обладают строгой специфичностью в отношении донорного субстрата; однако авторы настоящего изобретения обнаружили и недавно сообщили, что α 1,3-фукозилтрансфераза *H. pylori* обладает значительной

толерантностью к субстрату (PCT/US2018/016503, опубликовано как WO2018/144769, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки) и по существу позволяет конъюгировать что-либо желательное, например, за счет линкера, со своим субстратом ГДФ-фукозой и при этом все еще будет способна катализировать реакцию фукозилирования. Авторы настоящего изобретения аналогичным образом показали в своей предыдущей работе, что ST6Gal1; мутант $\alpha(2,3)$ сиалилтрансферазы *Pasteurella multocida* M144D (Pm2,3ST-M144D); и $\alpha(2,6)$ сиалилтрансфераза *Photobacterium damsela* (Pd2,6ST) являются подходящими для функционализированных донорных субстратов ЦМФ-сиаловая кислота. Id. and Hong, S, et al., Bacterial glycosyltransferase-mediated cell-surface chemoenzymatic glycan modification. Nature Communications 10, Article number: 1799 (2019), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, авторы показали в настоящем документе, что $\alpha 1,3/1,4$ -фукозилтрансфераза *H. pylori*; $\alpha 1,3$ -фукозилтрансфераза человека (FUT6); и $\alpha 2,6\alpha$ -сиалилтрансфераза человека (ST6Gal1) также являются подходящими для конъюгированных донорных субстратов; как и $\alpha 1,3$ -фукозилтрансфераза человека FUT9 (данные не показаны).

[208] Таким образом, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены клетки-приманки, содержащие фукозилтрансферазу или сиалилтрансферазу, расположенную на поверхности указанных клеток, и способы применения таких клеток-приманок для обеспечения мечения, зависящего от взаимодействия, что позволяет детектировать, контактировали ли клетки-приманки с другой клеткой. В определенных аспектах, если клетка-приманка, несущая фукозилтрансферазу или сиалилтрансферазу, расположенную на ее поверхности, вступает в контакт с клеткой-жертвой, содержащей подходящий гликановый акцепторный фрагмент, в присутствии меченого конъюгата соответствующего донорного сахарного нуклеотида для соответствующих гликозилтрансфераз (т. е. ГДФ-фукозы для фукозилтрансфераз и ЦМФ-Neu5Ac для сиалилтрансфераз), то фермент на клетке-приманке будет катализировать гликозилтрансферазную реакцию, что приводит к присоединению соответствующего меченого донорного сахарного нуклеотида к клетке-жертве; что дает, таким образом, долговременный индикатор того, что взаимодействие между клеткой-приманкой и клеткой-жертвой произошло.

[209] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены клетки-приманки, содержащие на своей поверхности фермент фукозилтрансферазу человека, и способы применения указанных клеток для мечения клетки-жертвы, которое зависит от взаимодействия. Согласно одному варианту реализации фермент

фукозилтрансфераза человека представляет собой α 1,3-фукозилтрансферазу человека. Согласно одному варианту реализации α 1,3-фукозилтрансферазу человека получают рекомбинантным путем. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены клетки-приманки, содержащие на своей поверхности фермент фукозилтрансферазу *H. pylori*. Согласно одному варианту реализации фукозилтрансфераза *H. pylori* представляет собой α 1,3-фукозилтрансферазу *H. pylori*. Согласно одному варианту реализации фукозилтрансфераза *H. pylori* представляет собой α 1,3/1,4 фукозилтрансферазу *H. pylori*.

[210] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены клетки-приманки, содержащие на своей поверхности фермент сиалилтрансферазу человека, и способы применения указанных клеток для мечения клетки-жертвы, которое зависит от взаимодействия. Согласно одному варианту реализации сиалилтрансфераза человека представляет собой ST6GAL1. Согласно одному варианту реализации сиалилтрансфераза человека представляет собой ST6GalNAc1. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения фермент на поверхности клетки-приманки представляет собой сиалилтрансферазу, отличную от человеческой. Согласно одному варианту реализации сиалилтрансфераза, отличная от человеческой, представляет собой мутант α (2,3) сиалилтрансферазы *Pasteurella multocida* M144D (Pm2,3ST-M144D) или α (2,6) сиалилтрансферазу *Photobacterium damsela* (Pd2,6ST).

[211] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены клетки-приманки, содержащие на своей поверхности фермент сортазу, и способы применения указанных клеток для мечения клетки-жертвы, которое зависит от взаимодействия. Сортазы представляют собой семейство ферментов, способных осуществлять реакцию транспептидирования, конъюгируя С-конец первого белка с N-концом второго белка за счет трансамидирования. Если фермент сортаза, содержащийся на поверхности клетки-приманки, вступает в контакт с клеткой-жертвой, имеющей на своей поверхности полипептид, содержащий акцепторный пептид сортазы (например, остаток GGG) на своем N-конце, в присутствии меченого пептида, содержащего последовательность распознавания сортазы (например, LPXTG (SEQ ID NO: 5)), где X представляет собой любую аминокислоту для сортазы A, то сортаза будет катализировать присоединение меченого пептида к N-концу полипептида, содержащего последовательность распознавания сортазы; тем самым присоединяя метку к клетке-жертве. Любую сортазу, известную в данной области техники или описанную в настоящем документе, можно применять в связи с настоящим изобретением в качестве подходящего фермента для конъюгации с поверхностью клетки-приманки с целью

облегчения мечения клетки-жертвы, зависящего от взаимодействия, описанного в настоящем документе.

[212] Сортазы также называются трансамидазами и обычно характеризуются как протеазной активностью, так и активностью транспептидирования. Были идентифицированы различные сортазы прокариотических организмов. Например, некоторые сортазы из грамположительных бактерий расщепляют и транслоцируют белки к протеогликановым фрагментам в интактных клеточных стенках. Среди сортаз, которые выделены из *Staphylococcus aureus*, имеются сортаза А (Srt A) и сортаза В (Srt B). Таким образом, в определенных вариантах реализации трансамидаза, применяемая в соответствии со способами мечения, зависящего от взаимодействия, описанными в настоящем документе, представляет собой сортазу А, например, из *S. aureus*, также называемую в настоящем документе SrtAureus. В других вариантах реализации трансамидаза представляет собой сортазу В, например, из *S. aureus*, также называемую в настоящем документе SrtBaureus.

[213] Сортазы были классифицированы на четыре класса, обозначенных А, В, С и D (т.е. сортаза А, сортаза В, сортаза С и сортаза D, соответственно) на основании выравнивания последовательностей и филогенетического анализа 61 сортазы из геномов грамположительных бактерий (Dramsi et al., Res Microbiol. 156(3):289-97, 2005; полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки). Эти классы соответствуют следующим подсемействам, на которые были классифицированы сортазы Comfort and Clubb (Comfort et al., Infect Immun., 72(5):2710-22, 2004; полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки): Класс А (подсемейство 1), класс В (подсемейство 2), класс С (подсемейство 3) и класс D (подсемейства 4 и 5). В упомянутых выше ссылках раскрыты многочисленные сортазы и их мотивы распознавания. См. также Pallen et al., TRENDS in Microbiology, 2001, 9(3), 97-101; полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Специалисты в данной области техники легко смогут отнести сортазу к правильному классу на основании ее последовательности и/или других характеристик, таких как описанные в Drami, et al., выше.

[214] Термин «сортаза А» используется в настоящем документе для обозначения сортазы класса А, обычно называемой SrtA у любого конкретного вида бактерий, например, SrtA из *S. aureus*. Аналогичным образом, термин «сортаза В» используется в настоящем документе для обозначения сортазы класса В, обычно называемой SrtB у любого конкретного вида бактерий, например, SrtB из *S. aureus*. Настоящее изобретение охватывает варианты реализации, относящиеся к любому из классов сортаз, известных в

данной области техники (например, сортаза А из любого вида или штамма бактерий, сортаза В из любого вида или штамма бактерий, сортаза класса С из любого вида или штамма бактерий и сортаза класса D из любого вида или штамма бактерий).

[215] Согласно некоторым вариантам реализации сортаза, применяемая в способах мечения, зависящего от взаимодействия, описанных в настоящем документе, представляет собой фермент дикого типа. Согласно другим вариантам реализации сортаза представляет собой модифицированный вариант, который может обладать улучшенными признаками по сравнению с аналогом дикого типа (например, более высокой каталитической активностью). В некоторых примерах сортаза может представлять собой мутант SrtA, который может содержать одно или более из следующих положений: P94, S102, A104, E105, K138, K152, D160, K162, T164, D165, K173, I182, K190 и K196. Например, мутант SrtA может содержать одну или более из следующих мутаций: P94R или P94S, S102C, A104H, E105D, K138P, K152I, D160K или D160N, K162H, T164N, D165A, K173E, I182V, K190E и K196S или K196T. В одном примере сортаза представляет собой тройной мутант P94S/D160N/K196T SrtA из *S. aureus*.

[216] Согласно другим вариантам реализации модифицированную сортазу, обладающую измененной специфичностью в отношении субстрата, можно применять в способах межклеточного мечения, описанных в настоящем документе. Например, мутанты сортазы А, имеющие одну или более мутаций в положениях S102 (например, S102C), A104 (например, A104H или A104V), E105 (например, E105D), K138 (например, K138P), K152 (например, K152I), N162 (например, N162N), T164 (например, T164N), K173 (например, K173E), I182 (например, I182V), T196 (например, T196S), N98 (например, N98D), A118 (например, A118T), F122 (например, F122A), K134 (например, K134R), F144 (например, F144L) и E189 (например, E189F). Такая модифицированная сортаза может распознавать последовательности, такие как LAXTG (SEQ ID NO: 6) и/или LPXSG (SEQ ID NO: 7), в которых X может представлять собой любой аминокислотный остаток. Примеры включают мутант S102C/A104H/E105D/K138P/K152I/N162N/T164N/K173E/I182V/T196S и мутант N98D/A104V/A118T/F122A/K134R/F144L/E189F. Дополнительные мутанты сортазы, имеющие измененную специфичность в отношении субстрата, описаны в US20140057317 и Dorr et al., PNAS 111 (37):13343-13348 (2014), соответствующие раскрытия включены в настоящий документ посредством ссылки.

[217] Модифицированный вариант сортазы дикого типа может иметь по меньшей мере 85% (например, 90%, 95%, 98% или выше) идентичности последовательности с аналогом дикого типа. Он может содержать мутации в одном или более положениях, соответствующих описанным выше, которые могут быть идентифицированы путем

анализа аминокислотной последовательности сортазы дикого типа с аминокислотной последовательностью SrtA. «Процент идентичности» двух аминокислотных последовательностей может быть определен с использованием алгоритма Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, модифицированного в соответствии с Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Поиски белков BLAST можно выполнять с помощью программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3, чтобы получить аминокислотные последовательности, гомологичные белковым молекулам согласно настоящему изобретению. Если при сравнении двух последовательностей обнаружены пропуски, можно использовать Gapped BLAST, описанную в Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

[218] Согласно некоторым вариантам реализации в способах мечения, зависящего от взаимодействия, можно применять активный фрагмент сортазы. Такой фрагмент конкретной сортазы может быть идентифицирован на основании знаний в данной области техники или путем сравнения аминокислотной последовательности этой сортазы с сортазой, имеющей известную корреляцию структура/функция (например, идентифицируемый активный домен). В некоторых примерах сортаза, применяемая в настоящей заявке, может представлять собой активный фрагмент сортазы A, такой как SrtA из *S. aureus*, например, фрагмент сортазы A, лишенный 59 или 60 N-концевых аминокислотных остатков, или его функциональные варианты, которые могут содержать одну или более мутаций, описанных в настоящем документе.

[219] Аминокислотные последовательности Srt A и Srt B и нуклеотидные последовательности, которые их кодируют, известны специалистам в данной области техники и раскрыты в ряде ссылок, цитируемых в настоящем документе, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. См., например, номера доступа GenBank NP_375640 и YP_043193. Аминокислотные последовательности *S. aureus* SrtA и SrtB являются гомологичными, имеют, например, 22% идентичности последовательности и 37% сходства последовательности. Аминокислотная последовательность сортазы-трансамидазы из *Staphylococcus aureus* также имеет существенную гомологию с последовательностями ферментов других грамположительных бактерий, и такие трансамидазы можно применять в процессах лигирования, описанных в настоящем документе. Например, SrtA имеет примерно 31% идентичности последовательности (и примерно 44% сходства последовательности) с

наилучшим выравниванием по всей секвенированной области открытой рамки считывания *S. pyogenes*. Существует примерно 28% идентичности последовательности с наилучшим выравниванием по всей секвенированной области открытой рамки считывания *A. naeslundii*. Следует понимать, что различные бактериальные штаммы могут характеризоваться различиями в последовательности конкретного полипептида, и последовательности, описанные в настоящем документе, являются примерными.

[220] Согласно определенным вариантам реализации трансамидаза, обладающая 18% или более идентичностью последовательности, 20% или более идентичностью последовательности или 30% или более идентичностью последовательности с открытой рамкой считывания *S. pyogenes*, *A. naeslundii*, *S. mutans*, *E. faecalis* или *B. subtilis*, кодирующей сортазу, может быть подвергнута скринингу, и могут применяться ферменты, обладающие трансамидазной активностью, сопоставимой с таковой Srt A или Srt B из *S. aureus* (например, сопоставимая активность иногда составляет 10% от активности Srt A или Srt B или более).

[221] Согласно некоторым вариантам реализации в способах мечения, зависящего от взаимодействия, описанных в настоящем документе, применяют сортазу A (SrtA) или ее активный фрагмент. SrtA распознает мотив LPXTX (SEQ ID NO: 8); где каждый случай X независимо представляет собой любой аминокислотный остаток, при этом общие мотивы распознавания представляют собой, например, LPKTG (SEQ ID NO: 9), LPATG (SEQ ID NO: 10) или LPNTG (SEQ ID NO: 11). Согласно некоторым вариантам реализации LPETG (SEQ ID NO: 12) применяется в качестве мотива распознавания сортазы. Однако мотивы, выходящие за рамки этого консенсуса, также могут быть распознаны. Например, согласно некоторым вариантам реализации мотив содержит «A», а не «T» в положении 4, например, LPXAG (SEQ ID NO: 13) или LPNAG (SEQ ID NO: 14). Согласно некоторым вариантам реализации мотив содержит «A», а не «G» в положении 5, например, LPXTA (SEQ ID NO: 15) или LPNTA (SEQ ID NO: 16). Согласно некоторым вариантам реализации мотив содержит «G», а не «P» в положении 2, например, LGXTG (SEQ ID NO: 17) или LGATG (SEQ ID NO: 18). Согласно некоторым вариантам реализации мотив содержит «I», а не «L» в положении 1, например, IPXTG (SEQ ID NO: 19), IPNTG (SEQ ID NO: 20) или IPETG (SEQ ID NO: 21). Дополнительные подходящие мотивы распознавания сортазы будут понятны специалистам в данной области техники, и настоящее изобретение не ограничено в этом отношении. Следует понимать, что термины «мотив распознавания» и «последовательность распознавания» в отношении последовательностей, распознаваемых трансамидазой или сортазой, используются взаимозаменяемо. Согласно некоторым вариантам реализации SrtA представляет собой мутант, описанный в настоящем

документе, который может обладать улучшенной ферментативной активностью по сравнению с аналогом дикого типа. Такой мутант может распознавать LAETG (SEQ ID NO: 22) и использовать пептид, содержащий последовательность распознавания, в качестве субстрата. Такие мотивы распознавания сортаз можно применять в любом из способов, описанных в настоящем документе.

[222] Согласно некоторым вариантам реализации сортаза представляет собой сортазу В (SrtB) или ее активный фрагмент, например, сортазу В *S. aureus*, *B. anthracis* или *L. monocytogenes*. Мотивы, распознаваемые сортазами класса В (SrtB), часто находятся в пределах консенсусных последовательностей NPXTX, например, NP[Q/K]-[T/s]-[N/G/s] (SEQ ID NO: 23), такие как NPQTN (SEQ ID NO: 24) или NPKTG (SEQ ID NO: 25). Например, сортаза В *S. aureus* или *B. anthracis* расщепляет мотив NPQTN (SEQ ID NO: 24) или NPKTG (SEQ ID NO: 25) IsdC в соответствующих бактериях (см., например, Marraffini et al., *Journal of Bacteriology*, 189(17): 6425-6436, 2007). Другие мотивы распознавания, обнаруженные в предполагаемых субстратах сортаз класса В, представляют собой NSKTA (SEQ ID NO: 26), NPQTG (SEQ ID NO: 27), NAKTN (SEQ ID NO: 28) и NPQSS (SEQ ID NO: 29). Например, SrtB из *L. monocytogenes* распознает определенные мотивы, в которых отсутствует Р в положении 2 и/или отсутствует Q или К в положении 3, такие как NAKTN (SEQ ID NO: 28) и NPQSS (SEQ ID NO: 29) (Mariscotti et al., *J Biol Chem.* 2009 Jan. 7). Такие мотивы распознавания сортаз также можно применять в любом из способов, описанных в настоящем документе.

[223] Согласно одному варианту реализации фермент сортаза выбран из сортазы А, сортазы В, сортазы С или сортазы D или их активного фрагмента.

[224] Акцепторный пептид сортазы может содержать последовательность распознавания сортазы (например, LPTXG) (SEQ ID NO: 5) для сортазы А, в которой X представляет собой любой аминокислотный остаток, причем указанный пептид связан с детектируемой меткой или тэгом, например, биотином или флуоресцентным красителем.

[225] Согласно некоторым вариантам реализации сортаза, расположенная на поверхности клетки-приманки, представляет собой мутантную сортазу (например, мутантную сортазу А), которая характеризуется улучшенной каталитической активностью по сравнению с ее аналогом дикого типа. В некоторых примерах мутантная сортаза А (SrtA) содержит одну или более мутаций P94R или P94S, S102C, A104H, E105D, K138P, K152I, D160K или D160N, K162H, T164N, D165A, K173E, I182V, K190E и K196S или K196T. В одном примере мутантная SrtA включает мутации P94S, D160N и K196T.

[226] Согласно одному варианту реализации фермент сортаза выбран из сортазы А: (5M) и mgSrtA.

[227] Согласно некоторым конкретным вариантам реализации клетка-приманка сконструирована таким образом, чтобы содержать на своей клеточной поверхности фермент сортазу, описанный выше. Согласно одному конкретному варианту реализации клетка-приманка сконструирована, чтобы содержать описанный выше фермент сортазу на своей поверхности, посредством способа гликоконъюгации, описанного в настоящем документе, при котором конъюгат ГДФ-Fuc-фермент представляет собой конъюгат ГДФ-Fuc-фермент сортаза, который используют в качестве донорного нуклеотидного субстрата для конъюгации фермента сортазы на поверхности клетки. Согласно одному конкретному варианту реализации клетка-приманка сконструирована, чтобы содержать описанный выше фермент сортазы на своей поверхности, посредством способа гликоконъюгации, описанного в настоящем документе, за исключением того, что вместо использования фукозилтрансферазы для присоединения конъюгата ГДФ-Fuc-фермент сортаза, в способе используют фермент сиалилтрансферазу, соответственно, и конъюгат ЦМФ-NeuAc-фермент сортаза для присоединения сортазы на поверхность клетки за счет реакции сиалирования.

[228] Согласно некоторым конкретным вариантам реализации сортаза, описанная выше, химически конъюгирована с поверхностью клетки-приманки.

[229] Согласно некоторым конкретным вариантам реализации сортаза расположена на поверхности клетки-приманки за счет способа, который не включает экспрессию фермента сортазы за счет генетической модификации клетки-приманки.

[230] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены клетки-приманки, содержащие фермент на их поверхности, причем указанный фермент представляет собой универсальную биотинлигазу, выбранную из TurboID, miniTurbo, BioID и BioID2; и способы их применения в зависящем от взаимодействия мечении клетки-жертвы. В случае универсальных биотинлигаз зависящее от взаимодействия мечение происходит, когда клетки-приманки контактируют с клетками-жертвами с вицинальными белками на их поверхности в присутствии биотина; в этом случае универсальная биотинлигаза будет переносить биотин к вицинальным белкам.

[231] Специалисты в данной области техники поймут, что природа акцепторной молекулы на клетке-жертве и конъюгата донорный сахарный нуклеотид-метка или другого меченого субстрата, который присоединен к клетке-жертве клеткой-приманкой, в различных вариантах реализации обусловлена ферментом, который расположен на клетке-приманке. Например, согласно различным вариантам реализации, когда клетка-приманка содержит фукозилтрансферазу на своей клеточной поверхности, акцепторная молекула на клетке-жертве представляет собой акцептор фукозы, способный фукозилироваться

фукозилтрансферазой, и конъюгат донорный сахарный нуклеотид-метка представляет собой конъюгат ГДФ-фукоза, содержащий метку. Такие акцепторы фукозы известны в данной области техники и включают LacNAc и α 2,3-сиалированный LacNAc (sLacNAc), которые обычно встречаются в сложных и гибридных N-гликанах, находящихся на большинстве клеточных поверхностей. Аналогичным образом, когда клетка-приманка содержит сиалилтрансферазу на своей клеточной поверхности, акцепторная молекула на клетке-жертве представляет собой акцептор сиаловой кислоты (NeuAc), который может быть сиалирован сиалилтрансферазой, и конъюгат донорный сахарный нуклеотид-метка представляет собой конъюгат ЦМФ-Neu5Ac, содержащий метку. Такие акцепторы NeuAc известны в данной области техники и включают галактозу и N-ацетилгалактозамин GalNAc.

[232] Согласно различным вариантам реализации в композициях и способах, раскрытых в настоящем документе, применяются донорные сахарные нуклеотиды-субстраты, которые содержат метку; меченые акцепторные пептиды сортазы, содержащие последовательности распознавания сортазы; или другие меченые субстраты. Любая подходящая метка может быть конъюгирована с такими субстратами для обеспечения возможности детектирования переноса метки при сближении. Такие метки могут включать, без ограничения, моно- или полигистидиновые последовательности (например, 6xHis), FLAG-метку, мус-метку, HA-метку, V5, VSVG, GFP (и его варианты), пероксидазу хрена (ПХ); щелочную фосфатазу (ЩФ), глюкозооксидазу, белок, связывающий мальтозу; SUMO-метку, тиоредоксин, поли(NANP), поли-Arg, кальмодулинсвязывающий белок, фрагмент PurF, кетостероидизомеразу, РаР3.30, домен укладки гистонов TAF12, FKBP-метку, SNAP-метку, Halo-метку, части Fc иммуноглобулина (и их варианты), биотин, стрептавидин, авидин, кальмодулин, S-метку, SBP, CBP, softag 1, softag 3, Xpress, изопеп-метку, spy-метку, BCCP, глутатион-S-трансферазу (GST), белок, связывающий мальтозу (MBP), Nus, тиоредоксин, NANP, TC, Ty, GCN4, флуоресцентные молекулы или зонды (например, Alexa Fluor; флуоресцеины, такие как, например, FAM), флуоресцентный зонд Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7 (или другие цианиновые красители), комплекс перидинин-хлорофилл-белок, флуоресцентный белок (например, зеленый флуоресцентный белок (GFP) или красный флуоресцентный белок (RFP)), фикоэритрин (PE); и тому подобное. При необходимости метка может быть отщепляемой и, таким образом, может быть удалена, например, с помощью протеазы. Согласно некоторым вариантам реализации это достигается путем включения сайта расщепления протеазы в метку, например, прилегающего или связанного с функциональной частью метки. Неограничивающие примеры протеазных меток, которые можно применять таким

образом, включают тромбин, протеазу TEV, фактор Ха и протеазу PreScission. Согласно некоторым вариантам реализации метка представляет собой биотин. Кроме того, в некоторых вариантах реализации субстрат и метка представляют собой одно и то же. Например, если фермент, который расположен на поверхности клетки-приманки, представляет собой универсальную биотинлигазу, то субстрат представляет собой биотин. Как отмечено выше, биотин представляет собой подходящую метку. Таким образом, не требуется конъюгация метки с биотиновым субстратом, чтобы облегчить детектирование присутствия субстрата на клетке-жертве после индуцированной контактом конъюгации меченого субстрата с клеткой-жертвой.

[233] Клетки-приманки согласно настоящему изобретению могут быть сконструированы любым подходящим способом так, чтобы иметь фермент на своей поверхности. Согласно определенным вариантам реализации клетки-приманки содержат фермент, связанный с их клеточной поверхностью за счет конъюгации. Конъюгация может быть осуществлена любым подходящим способом. Например, согласно некоторым вариантам реализации конъюгация осуществляется за счет химической или ферментативной конъюгации. Такие способы конъюгации известны в данной области техники и описаны в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации фермент экспрессируется на поверхности клетки-приманки за счет генетической модификации.

[234] Например, согласно некоторым вариантам реализации клетки-приманки содержат фермент, связанный с их клеточной поверхностью за счет способа конъюгации на основе гликозилирования, такого как, например, описанный ранее нами в международной заявке PCT/US2018/016503 (опубликованной как WO2018/144769), содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Подходящие виды конъюгации на основе гликозилирования включают способы, описанные в настоящем документе. α 1,3-фукозилтрансфераза H. pylori обладает значительной толерантностью к субстрату, и по существу все желаемое может быть конъюгировано, например, за счет линкера, с ГДФ-фукозой и все еще может быть использовано ферментом в реакции гликозилирования. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации фермент может быть конъюгирован с поверхностью клетки-приманки способом, включающим следующие этапы: Во-первых, фермент связывают с «кликабельной» группой, такой как тетразин, азид или алкин, путем связывания по аминок группам или сайт-специфичной модификации (такой как альдегидная метка или модификация неприродной аминокислотой). Затем фермент дополнительно связывают с легкодоступными производными ГДФ-фукозы, содержащими комплементарные «кликабельные» группы, с образованием ГДФ-Фус-фермент посредством клик-химии. Наконец, ГДФ-Фус-фермент

переносят на поверхность клетки за счет катализа α 1,3-фукозилтрансферазой *H. pylori*, которая гликозилирует гликоакцепторы на поверхности клетки, такие как гликаны LacNAc/сиалилLacNAc. Аналогичным образом, в некоторых вариантах реализации для катализа переноса ГДФ-Фус-фермент на поверхность клетки-приманки можно применять другие фукозилтрансферазы. Например, в определенных вариантах реализации для катализа переноса ГДФ-FUC-фермент на поверхность клетки-приманки применяют α 1-2-фукозилтрансферазу *Helicobacter mustelae* (Hm1,2FT), α 1,3/1,4-фукозилтрансферазу *H. pylori*; или человеческую α 1,3-фукозилтрансферазу (FUT6). Аналогичным образом, в определенных вариантах реализации для катализа переноса ЦМФ-NeuAc-фермент на поверхность клетки-приманки применяют сиалилтрансферазу. Например, в определенных вариантах реализации для катализа переноса ЦМФ-NeuAc-фермент на поверхность клетки-приманки применяют ST6GAL1; ST6GalNAc1; ST3Gal1; мутант α (2,3) сиалилтрансферазы *Pasteurella multocida* M144D (Pm2,3ST-M144D); или α (2,6) сиалилтрансферазу *Photobacterium damsela* (Pd2,6ST).

[235] Согласно некоторым вариантам реализации фермент конъюгируют с поверхностью клетки-приманки способом химической конъюгации. Согласно определенным вариантам реализации фермент химически конъюгирован с поверхностью клетки-приманки способами, раскрытыми в настоящем документе: первый фермент связывают с тетразином путем связывания по аминок группам с образованием конъюгатов фермент-тетразин (фермент-Tz). Затем клетки, которые должны быть конъюгированы с ферментом, обрабатывают сложным эфиром TCO-NHS для введения фрагментов TCO на их клеточные поверхности. Наконец, конъюгаты фермент-Tz подвергают реакции с фрагментами TCO-NHS на поверхности клеток путем биортогональной реакции с образованием конъюгатов поверхность клетки-фермент.

[236] Согласно некоторым вариантам реализации фермент экспрессируется на поверхности клетки-приманки за счет генетической модификации. Способы генетического изменения клетки хорошо известны в данной области техники, и любой подходящий способ можно применять для конструирования клетки-приманки согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации фермент экспрессируется на поверхности клетки-приманки с использованием стандартных рекомбинантных методик в молекулярной биологии, которые хорошо известны (например, см. Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., 1.53 [Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989], включенный в настоящий документ). Методология не ограничена какой-либо конкретной стратегией клонирования. Специалисту в данной области техники будет полностью понятно, что для получения

вектора экспрессии, содержащего фермент для экспрессии на клетке-приманке в соответствии с настоящим изобретением, можно применять любые типы стратегий клонирования. Например, один или более полинуклеотидов, кодирующих фермент, могут быть клонированы в вектор экспрессии вместе с подходящими векторными элементами для управления экспрессией фермента на поверхности клетки-приманки. В некоторых случаях, после определения нуклеотидной последовательности для фермента (необязательно «оптимизированной по кодонам» последовательности) ген (или взаимозаменяемо «полинуклеотид») синтезируют *de novo* с образованием кДНК, которая содержит ген и дополнительные нуклеотидные последовательности, содержащие уникальные сайты расщепления рестрикционного фермента на 5'- и 3'-концах гена. Для этой цели можно применять несколько способов прямого синтеза генов, эти способы хорошо известны специалистам в данной области техники (Montague MG, Lartigue C, Vashee S. (2012) Synthetic genomics: potential and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23(5):659-665, включена в настоящий документ). Полинуклеотиды, представляющие полный ген фермента, плюс вышеупомянутые дополнительные нуклеотидные последовательности могут быть непосредственно синтезированы, или, альтернативно, субфрагменты гена могут быть непосредственно синтезированы с последующим лигированием этих фрагментов с использованием праймеров ПЦР для создания полноразмерного гена. После синтеза гена нуклеотидная последовательность нового гена с фланкирующими сайтами рестрикции и необязательными регуляторными элементами может быть подтверждена непосредственным секвенированием генов кДНК, которое хорошо известно специалистам в данной области техники (Pettersson E, Lundeborg J, Ahmadian A. (2009) Generations of sequencing technologies. *Genomics* 93:(2)105-111, включена в настоящий документ). После подтверждения последовательности кДНК указанную кДНК клонируют в вектор экспрессии рекомбинантного белка с использованием стандартных рекомбинантных методик в молекулярной биологии. Векторы экспрессии, как правило, выбирают таким образом, чтобы они соответствовали конкретной клетке-хозяину, используемой для экспрессии рекомбинантного белка, с целью оптимизации количества и качества экспрессируемого рекомбинантного белка. Векторы экспрессии, как правило, сконструированы с нуклеотидными последовательностями, которые представляют собой дополнительные элементы, необходимые для оптимизации экспрессии нового гена в конкретной клетке-хозяине, включая, но не ограничиваясь ими, сайты клонирования для облегчения вставки кДНК, содержащей новый ген, промоторный/энхансерный элемент для обеспечения эффективной экспрессии генов на высоком уровне, сайты праймеров для обеспечения

секвенирования вставки кДНК, сигнал полиаденилирования для обеспечения эффективной терминации транскрипции и полиаденилирования мРНК нового гена и селективные гены для обеспечения отбора трансформантов в клетках бактерий и млекопитающих. Вектор экспрессии может представлять собой эукариотический вектор экспрессии. Вектор экспрессии может представлять собой вектор экспрессии у млекопитающих. Вектор экспрессии может представлять собой вирусный вектор экспрессии. Вектор экспрессии может представлять собой лентивирусный вектор экспрессии. Способы могут дополнительно включать подтверждение клонирования одного или более полинуклеотидов, кодирующих фермент, в вектор экспрессии, включая секвенирование вектора экспрессии, выполнение гель-электрофореза вектора и/или наблюдение фермента на геле после электрофореза в ДСН-ПААГ. Способы могут дополнительно включать амплификацию полинуклеотида, кодирующего фермент, и клонирование фермента в вектор экспрессии. Амплификация полинуклеотида, кодирующего фермент, может включать синтез олигонуклеотидов, по меньшей мере частично комплементарных гену. Олигонуклеотиды могут быть в достаточной степени комплементарны гену для ренатурации с полинуклеотидом. Олигонуклеотиды могут содержать линкерные последовательности. Многие подходящие линкеры известны в данной области техники и подходят для применения в настоящем изобретении.

[237] Способы могут включать трансфекцию или инфицирование клетки вектором экспрессии. Способы могут дополнительно включать экспрессию фермента в клетке. Способы могут дополнительно включать экспрессию фермента в бесклеточной системе. Способы могут дополнительно включать получение вируса, содержащего вектор экспрессии. Способы могут дополнительно включать размножение вируса. Способы могут дополнительно включать инфицирование клетки вирусом, содержащим вектор экспрессии. Способы могут дополнительно включать размножение клетки.

[238] Согласно некоторым вариантам реализации фермент экспрессируется с использованием лентивирусного вектора, при этом FUT6 человека экспрессируется на поверхности клетки-приманки. Эта конструкция включает от N- к С-концу трансмембранный домен мембранной аланиламинопептидазы (TMD), связанный с НА-меткой за счет двух глициновых аминокислот, и линкер (содержащий сайт расщепления TEV), связывающий НА-меченный TMD с эктодоменом FUT6. Белковая последовательность вставки FUT6 лентивирусной конструкции составляет 416 амк. и, как прогнозируется, кодирует белок 47,21 кДа со следующей аминокислотной последовательностью:

MAKGFYISKSLGILGILLGVAAVCTIIALSVVYSQEKNKNANSSPVASTTPS
ASATTNPASATTLLGGYPYDVPDYAEFASTSLYKKAGSENLYFQGDPTVYP
NGSRFPDSTGTPAHSIPLILLWTWPFNKPIALPRCSEMVPGTADCNITADR
KVYPQADAVIVHHREVMYNPSAQLPRSPRRQGQRWIWFSMESPSHCWQ
LKAMDGYFNLTMSYRSDSDIFTPYGWLEPW SGQPAHPPLNLSAKTELVA
WAVSNWGPNSARVRYYQSLQAHCLKVDVYGRSHKPLPQGTMMETLSRY
KFYLAFENSLHPDYITEKLWRNALEAWAVPVVLGPSRSNYERFLPPDAFI
HVDDFQSPKDLARYLQELDKDHARYLSYFRWRETLRPRSFSWALAFCKA
CWKLQEESRYQTRGIAAWFT (SEQ ID NO: 30)

[239] Вставка FUT6 лентивирусной конструкции может кодироваться следующей последовательностью ДНК (1251 п.о.).

ATGGCCAAGGGCTTCTATATTTCCAAGTCCCTGGGCATCCTGGGGATC
CTCCTGGGCGTGGCAGCCGTGTGCACAATCATCGCACTGTCAGTGGTG
TACTCCCAGGAGAAGAACAAGAACGCCAACAGCTCCCCCGTGGCCTC
CACCACCCCGTCCGCCTCAGCCACCACCAACCCCGCCTCGGCCACCAC
CTTGGGCGGCTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGAGTTCGCCAG
CACCAGCCTGTACAAGAAGGCCGGCAGCGAGAACCTGTACTTCCAGG
GCGATCCCCTGTGTACCCTAATGGGTCCCGCTTCCCAGACAGCACAG
GGACCCCGCCCACTCCATCCCCCTGATCCTGCTGTGGACGTGGCCTTT
TAACAAACCCATAGCTCTGCCCCGCTGCTCAGAGATGGTGCCTGGCAC
GGCTGACTGCAACATCACTGCCGACCGCAAGGTGTATCCACAGGCAG
ACGCGGTCATCGTGCACCACCGAGAGGTCATGTACAACCCCAAGTCCCC
AGCTCCCACGCTCCCCGAGGCGGCAGGGGCAGCGATGGATCTGGTTC
AGCATGGAGTCCCCAAGCCACTGCTGGCAGCTGAAAGCCATGGACGG
ATACTTCAATCTCACCATGTCTTACCAGCAGCGACTCCGACATCTTCAC
GCCCTACGGCTGGCTGGAGCCGTGGTCCGGCCAGCCTGCCACCCACC
GCTCAACCTCTCGGCCAAGACCGAGCTGGTGGCCTGGGCAGTGTCCAA
CTGGGGGGCCAACTCCGCCAGGGTGCGCTACTACCAGAGCCTGCAGG
CCCATCTCAAGGTGGACGTGTACGGACGCTCCCACAAGCCCCTGCCCC
AGGGAACCATGATGGAGACGCTGTCCCGGTACAAGTTCTATCTGGCCT
TCGAGAACTCCTTGCACCCCGACTACATCACCGAGAAGCTGTGGAGGA
ACGCCCTGGAGGCCTGGGCGGTGCCCGTGGTGCTGGGCCCCAGCAGA
AGCAACTACGAGAGGTTCTTGCCACCCGACGCCTTCATCCACGTGGAC
GACTTCCAGAGCCCCAAGGACCTGGCCCGGTACCTGCAGGAGCTGGA
CAAGGACCACGCCCGCTACCTGAGCTACTTTCGCTGGCGGGAGACGCT

GCGGCCTCGCTCCTTCAGCTGGGCACTCGCTTTCTGCAAGGCCTGCTG
GAAACTGCAGGAGGAATCCAGGTACCAGACACGCGGCATAGCGGCTT
GGTTCACCTGA (SEQ ID NO: 31)

[240] FUT6 лентивирусной конструкции со вставкой в лентивирусный вектор экспрессии может кодироваться следующей последовательностью ДНК (8622 п.о.)

caggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttattttctaaatacattcaaatatgtatccgctcat
gagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgccttat
tccctttttgcggcattttgccttctgttttctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttg
gggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggaagatccttgagagttttgccccgaagaacgtttt
ccaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtc
gccgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtaactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagt
aagagaattatgcagtgtgccataaccatgagtataactgacggtgcaacttacttctgacaacgatcggaggacc
gaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatga
agccatacacaacgacgagcgtgacaccagatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggc
gaactacttacttagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgc
tcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcac
tggggccagatggttaagccctcccgtatcgtattatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaat
agacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggttaactgtcagaccaagtttactatatacttttagatt
gatttaaaacttcatttttaattaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatcccctaactga
gttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaactgc
tgcttgcaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgcccgatcaagagctaccaactcttttccgaagg
taactggcttcagcagagcgcagatacacaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactc
tgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaactctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccg
gggtggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacgggggggttctgtcacacagccca
gcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaag
ggagaaaggcggacaggtatccggttaagcggcaggggtcggaaaggagagcgcacgagggagcttcagggg
gaaacgcctggtatctttatagtctgtcgggttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagggg
ggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttctggccttttctggccttttctcacatgttc
tttctgcgttatcccctgattctgttgataaccgtattaccgcctttgagttagctgataccgctcggcgagccgaac
gaccgagcgcagcagtcagttagcaggaagcggaaagagcggccaatacgcgaaccgcctctccccgcgct
tggccgattcattaatgcagctggcacgacaggttcccactggaaagcgggcagtgagcgaacgcaattaatgt
gagttagctcactcattaggcaccacaggtttacatttattgcttccggctcgatgtgtgtggaattgtgagcggata
acaatttcacacaggaaacagctatgacctgattacgcgaagcgcgcaattaaccctcactaaagggaacaaaagc
tggagctgcaagcttaatgtagtcttatgcaatactctttagtcttgcaacatggtaacgatgagttagcaacatgcctt
acaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaagtaagggtgtacgatcgtgccttattaggaaggcaa

cagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcattgcagagatattgtatttaagtgcctagctcgat
acaataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggggaacccactgcttaag
cctcaataaagcttgccctgagtgcttcaagtagtggtgcccgtctgtgtgactctggtaactagagatccctcaga
cccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtgccgcccgaacagggacctgaaagcgaaagggaaaccagagct
ctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgagggcgggcgactgggtgagtacgcca
aaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagat
cgcgatgggaaaaaattcggtaaggccagggggaaagaaaaatataaattaaaacatatagtatgggcaagcag
ggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgtagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctac
aacatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaagg
atagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcaca
gcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggaacattggagaagtgaattatataaatataaa
gtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtggtgcagagagaaaaaagagca
gtgggaataggagctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcctcaatgacgctgac
ggtagaggccagacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaattgtctgagggtattgaggcgcaacagc
atctgttgcaactcacagctcggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaggat
caacagctcctggggatttggggttgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttggaatgctagtgtgagta
ataaatctctggaacagattggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagctta
acactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaag
tttgtggaattggttaacataacaattggctgtggtatataaaattattcataatgatataggaggcttggtaggttta
gaatagttttgtgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacctcccaac
cccgagggggacccgacaggcccgaagggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcg
attagtgaacggatctcgacggtaacttttaaaagaaaagggggattggggggtacagtgcaggggaaagaata
gtagacataatagcaacagacatacaaaactaaaagaattacaaaacaaattacaaaattcaaaattttatcgagcttg
caaagatggataaagttttaaacagagaggaatcttgcagctaattggacctttaggtcttgaaaggagtgccCG
TGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTC
CCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAG
AAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCC
GCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCG
CCGTGAACGTTCTTTTTTCGAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAA
GTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTATGGCC
CTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGA
TCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGC
TTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCG
CTGGGGCCGCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGC
TGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTGTATGACCTGCTGCG

ACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTG
CACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGT
GCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCC
ACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGT
GCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCT
GGCCCGGTTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCG
GCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGGCGCTCGGGAGAG
CGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTC
AGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCA
CCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGG
GAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACT
GAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCC
CTTTTGGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTC
AAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGAggaattcgggtaccgcgccgcccggg
gatccATGGCCAAGGGCTTCTATATTTCCAAGTCCCTGGGCATCCTGGGG
ATCCTCCTGGGCGTGGCAGCCGTGTGCACAATCATCGCACTGTCAGTG
GTGTACTCCCAGGAGAAGAACAAGAACGCCAACAGCTCCCCCGTGGC
CTCCACCACCCCGTCCGCCTCAGCCACCACCAACCCCGCCTCGGGCAC
CACCTTGGGCGGCTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGAGTTCGC
CAGCACCAGCCTGTACAAGAAGGCCGGCAGCGAGAACCTGTACTTCC
AGGGCGATCCCAGTGTGTACCCTAATGGGTCCCGCTTCCCAGACAGCA
CAGGGACCCCCGCCCAGTCCATCCCCCTGATCCTGCTGTGGACGTGGC
CTTTTAACAAACCCATAGCTCTGCCCCGCTGCTCAGAGATGGTGCCTG
GCACGGCTGACTGCAACATCACTGCCGACCGCAAGGTGTATCCACAG
GCAGACGCGGTCATCGTGACCAACCGAGAGGTCATGTACAACCCAG
TGCCCAGCTCCCACGCTCCCCGAGGCGGCAGGGGCAGCGATGGATCT
GGTTCAGCATGGAGTCCCCAAGCCACTGCTGGCAGCTGAAAGCCATG
GACGGATACTTCAATCTCACCATGTCTACCGCAGCGACTCCGACATC
TTCACGCCCTACGGCTGGCTGGAGCCGTGGTCCGGCCAGCCTGCCCAC
CCACCGCTCAACCTCTCGGCCAAGACCGAGCTGGTGGCCTGGGCAGTG
TCCAAGTGGGGGCCAACTCCGCCAGGGTGCGCTACTACCAGAGCCTG
CAGGCCCATCTCAAGGTGGACGTGTACGGACGCTCCCACAAGCCCCTG
CCCCAGGGAACCATGATGGAGACGCTGTCCCGGTACAAGTTCTATCTG
GCCTTCGAGAACTCCTTGCACCCCGACTACATCACCGAGAAGCTGTGG
AGGAACGCCCTGGAGGCCTGGGGCGTGGCCGTGGTGCTGGGCCCCAG

CAGAAGCAACTACGAGAGGTTTCCTGCCACCCGACGCCTTCATCCACGT
GGACGACTTCCAGAGCCCCAAGGACCTGGCCCGGTACCTGCAGGAGC
TGGACAAGGACCACGCCCCTACCTGAGCTACTTTCGCTGGCGGGAGA
CGCTGCGGCCTCGCTCCTTCAGCTGGGCACTCGCTTTCTGCAAGGCCT
GCTGGAACTGCAGGAGGAATCCAGGTACCAGACACGCGGCATAGCG
GCTTGGTTCACCTGAgtcgacaatcaacctctggattacaaaatttgtaaagattgactggtattctaac
tatgttgctccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttccgfatggctttcattttctc
ctcctgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccggtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgt
gtttgctgacgaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctcc
ctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttggcgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaat
tccgtggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgctgtgttggcacctggattctgcgcgggacgt
ccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttcttcccgcggcctgctgcgggctctgcggcctctcc
gcgtcttcgccttcgcctcagacgagtcggatctcctttgggcccctccccgctggaattcgagctcggtacctt
taagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaaggggggactggaagggttaattc
actccaacgaagacaagatctgctttttgcttgactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctct
ggctaactagggaaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcctcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtg
tgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttatt
attcagtatattataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgagaggaactgtttattgcagcttataatggttacaat
aaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcattttttactgcattctagtgtgtgttgcacaaactcatcaatgta
tcttatcatgtctggctctagctatcccccccctaactccgcccagttccgcccattctccgccccatggctgactaat
ttttatttatgcagaggccgaggccgcctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggccta
ggcttttgcgtcgagacgtaccaattcgccctatagtgaagtcgtattacgcgcgctcactggccgtcgtttacaacgt
cgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatgccttgagcacatcccccttccgagctggcgtaatagc
gaagaggcccgaccgatcgcccttccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcgacgcgcctgtagc
ggcgcatlaagcgcggcggtgtgtgtgttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccctagcgccgct
cctttcgctttcttcccttcttctcgccacgttcgcccggctttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttagggt
ccgatttagtgctttacggcacctcgacccccaaaaacttgattagggtgatggttcacgtagtgggccatcgccctga
tagacgggttttcgcccttgacgttggagtcacgttcttaatagtggactcttgttccaaactggaacaactcaac
cctatctcggtctattctttgattataagggttttgcgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaa
tttaacgcgaattttaacaaaatattaacgtttacaatttcc (SEQ ID NO: 32)

[241] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ зависящего от взаимодействия мечения клетки-жертвы клеткой-приманкой, причем указанный способ включает приведение клетки-жертвы в контакт с клеткой-приманкой в присутствии подходящего меченого субстрата. Упоминание в настоящем документе «подходящего меченого субстрата» означает субстрат, который можно

применять в реакции мечения, зависящего от взаимодействия, ферментом, который связан на поверхности клетки-приманки, причем указанный субстрат содержит метку, раскрытую в настоящем документе. Таким образом, например, но не ограничиваясь этим, если фермент, расположенный на клетке-приманке, представляет собой фукозилтрансферазу, то упоминание «подходящего меченого субстрата» означает меченую ГДФ-фукозу (например, ГДФ-Fuc-биотин). Аналогичным образом, если фермент, расположенный на клетке-приманке, представляет собой сиалилтрансферазу, то упоминание «подходящего меченого субстрата» означает меченую ЦМФ-сиаловую кислоту (например, ЦМФ-NeuAc-биотин). Из-за присутствия фермента на поверхности клетки-приманки такое событие приведения в контакт приводит к мечению, зависящему от взаимодействия; т.е., к индуцированной контактом конъюгации меченого субстрата с клеткой-жертвой. Как обсуждалось выше, выбор подходящего субстрата будет понятен специалисту в данной области техники и будет зависеть от фермента, сконструированного на клетке-приманке.

[242] Присутствие метки на клетке-жертве (т.е. «меченой клетке») может быть определено любым подходящим способом, включая, например, без ограничения, иммунофлуоресценцию; иммуногистохимию; иммуноблоттинг; проточную цитометрию; FACS; анализ микрочипов, электрофорез в ДСН-ПААГ; масс-спектрометрию; ВЭЖХ: Меченая клетка может быть обогащена, например, с использованием сортировки FACS по присутствию метки. Меченые клетки могут быть дополнительно отсортированы по наличию или отсутствию других маркеров, например, маркеров клеточной поверхности, таких как, например, PD-1, CD134, CD137, CXCR5 и/или TIM3, и/или дополнительных маркеров для указания типа клеток, например, CD45, CD8, CD4 и т.п.

[243] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены композиции и способы, с помощью которых фермент, например, фукозилтрансферазу (FT), конъюгируют с его субстратом ГДФ-Fuc за счет короткого линкера ПЭГ с образованием ГДФ-Fuc-FT. ГДФ-Fuc-FT служит самокатализатором для переноса Fuc-FT к LacNAc в гликокаликсе клеточной поверхности приблизительно через 15 минут. Конъюгат клетка-FT способен переносить молекулы зонда (например, ГДФ-Fuc-биотин или ГДФ-Fuc-метка) к поверхностным гликанам контактирующих клеток-жертв для детектирования межклеточного взаимодействия. Данная методика имеет ряд преимуществ: (1) она подходит для различных типов клеток, поскольку акцепторные гликаны для ГДФ-фукозы LacNAc или α 2,3-сиалилированный LacNAc (sLacNAc) обычно встречаются в сложных и гибридных N-гликанах, находящихся на большинстве клеточных поверхностей; (2) нет необходимости в длительной и сложной генетической

модификации; и (3) обычные лабораторные методики, такие как флуоресцентная микроскопическая визуализация и проточная цитометрия/FACS, используются для детектирования/мониторинга клеточных взаимодействий/сортировки для клеток, которые были помечены таким образом при сближении.

[244] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ мечения специфичного антигена. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ мечения вирус-специфичного антигена. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ мечения Т-клетки, реактивной в отношении опухолеспецифического антигена (TSA), присутствующей в популяции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL).

[245] Согласно некоторым вариантам реализации способ включает клетки, причем (a) любые клетки, содержащие метку и характеризующиеся как экспрессией $CD8^{+}$, так и экспрессией $PD-1^{+}$, представляют собой антиген-реактивные цитотоксические Т-клетки; и (b) любые клетки, содержащие метку и характеризующиеся как экспрессией $CD4^{+}$, так и экспрессией $PD-1^{+}$, представляют собой антиген-реактивные хелперные Т-клетки. Согласно некоторым вариантам реализации количество метки, присутствующей на Т-клетке, указывает на аффинность связывания Т-клеточного рецептора, экспрессируемого на поверхности Т-клетки, с антигеном. Согласно некоторым вариантам реализации количество метки, присутствующей на Т-клетке, указывает на способность обогащенной Т-клетки уничтожать другие клетки, экспрессирующие антиген, и/или на способность обогащенной Т-клетки активироваться в присутствии антигена.

[246] Согласно некоторым вариантам реализации TSA-реактивные Т-клетки по существу или полностью представляют собой $CD4^{+}$. Согласно некоторым вариантам реализации TSA-реактивные Т-клетки по существу или полностью представляют собой $CD8^{+}$.

[247] Согласно некоторым вариантам реализации способ дополнительно включает секвенирование клетки, имеющей метку на ее клеточной поверхности, путем секвенирования Т-клеточного рецептора (TCR) отдельной клетки для идентификации антиген-специфичного TCR, экспрессируемого клеткой. Согласно некоторым вариантам реализации способ дополнительно включает размножение обогащенных клеток для терапии иммунными клетками, специфичной для субъекта.

[248] Согласно некоторым вариантам реализации анализ включает обогащение клеток, содержащих метку, методом флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS). Согласно некоторым вариантам реализации анализ дополнительно включает определение того, содержат ли клетки, содержащие метку, другие маркеры, указывающие на реактивность в отношении антигена. Согласно некоторым вариантам реализации способ

дополнительно включает обогащение клеток, содержащих другие маркеры, указывающие на реактивность в отношении антигена, методом FACS. Например, согласно некоторым вариантам реализации клетки сортируют с целью обогащения меченых клеток, экспрессирующих Т-клеточные маркеры (т.е., с целью обогащения $CD8^+$ клеток для цитотоксических Т-клеток; $CD4^+$ для хелперных Т-клеток); с целью исключения клеток, экспрессирующих маркеры ДК (т.е. с целью обогащения $CD45.1^{-/-}$ клеток); и/или с целью обогащения маркеров, указывающих на проспективную TSA-реактивность (т.е. с целью обогащения клеток, которые представляют собой $PD-1^+$, $CD134^+$, $CD137^+$), и/или других маркеров, таких как $CXCR5^+$ и/или $TIM3^+$. Согласно некоторым вариантам реализации другие маркеры включают одно или более из экспрессии PD-1, экспрессии TCF-1 и экспрессии TIM3. Согласно некоторым вариантам реализации способ включает обогащение клеток, имеющих как метку, так и экспрессию PD-1. Согласно некоторым вариантам реализации способ дополнительно включает обогащение клеток, экспрессирующих $CD8^+$ и/или $CD4^+$.

[249] Согласно некоторым вариантам реализации способа фермент представляет собой фукозилтрансферазу, и меченый субстрат представляет собой ГДФ-фукозу, конъюгированную с меткой. Согласно некоторым вариантам реализации фукозилтрансфераза представляет собой $\alpha 1,3$ -фукозилтрансферазу *H. pylori*. Согласно некоторым вариантам реализации донорный сахарный нуклеотид представляет собой ГДФ-фукозу. Согласно некоторым вариантам реализации метка представляет собой любую из меток, раскрытых в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации метка представляет собой биотин. Согласно некоторым вариантам реализации фермент фукозилтрансфераза представляет собой фукозилтрансферазу человека. Согласно некоторым вариантам реализации фермент фукозилтрансфераза представляет собой $\alpha 1,3$ -фукозилтрансферазу человека. Согласно одному варианту реализации $\alpha 1,3$ -фукозилтрансферазу человека получают рекомбинантным способом. Согласно некоторым вариантам реализации фермент фукозилтрансфераза не является фукозилтрансферазой человека. Согласно некоторым вариантам реализации фермент фукозилтрансфераза представляет собой фукозилтрансферазу *H. pylori*. Согласно одному варианту реализации фукозилтрансфераза *H. pylori* представляет собой $\alpha 1,3$ -фукозилтрансферазу *H. pylori*. Согласно одному варианту реализации фукозилтрансфераза *H. pylori* представляет собой $\alpha 1,3/1,4$ фукозилтрансферазу *H. pylori*. Согласно некоторым вариантам реализации способа фермент представляет собой сialiлтрансферазу, и меченый субстрат представляет собой ЦМФ-Neu5Ac, конъюгированный с меткой. Согласно некоторым вариантам реализации метка представляет собой биотин. Согласно некоторым вариантам

реализации фермент сиалилтрансфераза представляет собой сиалилтрансферазу человека. Согласно некоторым вариантам реализации фермент сиалилтрансфераза представляет собой ST6GAL1 человека. Согласно одному варианту реализации ST6GAL1 человека получают рекомбинантным способом. Согласно некоторым вариантам реализации фермент сиалилтрансфераза представляет собой ST6GalNAc1 человека. Согласно одному варианту реализации ST6GalNAc1 человека получают рекомбинантным способом. Согласно некоторым вариантам реализации фермент сиалилтрансфераза не является сиалилтрансферазой человека. Согласно некоторым вариантам реализации фермент сиалилтрансфераза представляет собой мутант $\alpha(2,3)$ сиалилтрансферазы *Pasteurella multocida* M144D (Pm2,3ST-M144D) или $\alpha(2,6)$ сиалилтрансферазу *Photobacterium damsela* (Pd2,6ST). Согласно некоторым вариантам реализации клетка-приманка сконструирована, чтобы содержать фермент на своей поверхности, за счет конъюгации фермента с поверхностью клетки или за счет рекомбинантной экспрессии фермента в клетке. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгация представляет собой химическую конъюгацию. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгацию осуществляют за счет ферментативной конъюгации фермента с поверхностью клетки. Согласно некоторым вариантам реализации ферментативную конъюгацию осуществляют за счет фукозилирования клетки с помощью конъюгата ГДФ-Фус-фермент. Согласно конкретным вариантам реализации фермент фукозилирования, катализирующий конъюгацию фермента с поверхностью клетки, представляет собой фермент $\alpha 1,3$ -фукозилтрансферазу *H. pylori*. Согласно некоторым вариантам реализации фермент фукозилирования, катализирующий конъюгацию фермента с поверхностью клетки, представляет собой $\alpha 1,3$ -фукозилтрансферазу человека (FUT6) или $\alpha 1,3/4$ -фукозилтрансферазу *H. pylori*. Согласно некоторым вариантам реализации ферментативную конъюгацию выполняют, как описано в настоящем документе, за исключением того, что вместо применения реакции фукозилирования с помощью фермента фукозилтрансферазы и конъюгата ГДФ-Фус-фермент в качестве донорного нуклеотидного субстрата для конъюгации фермента на поверхность клетки, в способе применяют фермент сиалилтрансферазу, соответственно, и ЦМФ-NeuAc-фермент для конъюгации фермента на поверхности клетки. Согласно некоторым вариантам реализации фермент сиалилтрансфераза представляет собой сиалилтрансферазу человека. Согласно некоторым вариантам реализации фермент сиалилтрансфераза представляет собой ST6GAL1 человека ST6GalNAc1 человека. Согласно некоторым вариантам реализации фермент сиалилтрансфераза не является сиалилтрансферазой человека. Согласно некоторым вариантам реализации фермент сиалилтрансфераза представляет собой мутант $\alpha(2,3)$ сиалилтрансферазы *Pasteurella*

multocida M144D (Pm2,3ST-M144D) или $\alpha(2,6)$ сиалилтрансферазу *Photobacterium damsela* (Pd2,6ST).

[250] Согласно некоторым вариантам реализации метка выбрана из малой молекулы, полинуклеотида, полипептида, антитела, химического или биологического маркера и/или зонда. Согласно некоторым вариантам реализации химический или биологический фрагмент представляет собой биотин, биотиновый зонд, флуоресцентную молекулу, зонд, содержащий флуоресцентную молекулу, краситель, зонд, содержащий краситель, меченую красителем одноцепочечную ДНК, метку FLAG или метку Strep.

[251] Согласно некоторым вариантам реализации гликан клеточной поверхности выбран из Gal, LacNAc и сиалил-LacNAc. Согласно некоторым вариантам реализации фукозилтрансфераза не является нативной для второй клетки-приманки. Согласно некоторым вариантам реализации фукозилтрансфераза конъюгирована с клеточной поверхностью второй клетки. Согласно некоторым вариантам реализации фукозилтрансфераза ковалентно связана с клеточной поверхностью второй клетки. Согласно некоторым вариантам реализации фукозилтрансфераза ковалентно связана с поверхностным гликаном второй клетки, присутствующим на поверхности второй клетки. Согласно некоторым вариантам реализации фукозилтрансфераза и поверхностный гликан второй клетки ковалентно связаны за счет реакции гликозилирования. Согласно некоторым вариантам реализации фукозилтрансфераза присоединена ко второму донорному сахарному нуклеотиду за счет линкерного фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации фукозилтрансфераза рекомбинантно экспрессируется на клеточной поверхности второй клетки-приманки.

[252] Согласно некоторым вариантам реализации экспрессия фукозилтрансферазы управляется условно активируемым промотором. Согласно некоторым вариантам реализации условно активируемый промотор активируется в присутствии экзогенного соединения. Согласно некоторым вариантам реализации экзогенное соединение представляет собой малую молекулу или полипептид.

[253] Согласно некоторым вариантам реализации для завершения способа необходимо менее двух недель. Согласно некоторым вариантам реализации способ не включает идентификацию кандидатных антигенов до обогащения антиген-реактивных Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации способ включает исключение небогатых Т-клеток из обогащенных Т-клеток.

[254] Кроме того, согласно некоторым вариантам реализации описанные выше способы мечения и выделения TSA-реактивных и аутореактивных Т-клеток легко адаптируются для применения для любого антигена без излишнего экспериментирования. Например,

чтобы пометить и выделить Т-клетки, специфичные в отношении других антигенов, например, антигенов патогена, таких как бактериальные или вирусные антигены, достаточно следовать тем же протоколам, что и изложенные выше, но использовать соответствующие источники антигена для праймирования дендритных клеток-приманок, а затем использовать соответствующие источники тканевых инфильтрирующих или циркулирующих Т-клеток из соответствующих источников так, чтобы эти источники содержали одну или более Т-клеток с TCR, специфичными в отношении праймирующих антигенов. Таким образом, вкратце, для идентификации Т-клеток с вирус-специфичной реактивностью необходимо только инкубировать дендритную клетку-приманку с вирус-специфичными антигенами или их источником (например, лизатом клеток пораженной ткани) для праймирования ДК, затем конъюгаты праймированные ДК-фермент смешивают с инфильтрирующими ткань или циркулирующими Т-клетками в присутствии подходящего меченого субстрата, и меченые Т-клетки детектируют и обогащают, как описано выше. Согласно различным вариантам реализации то же самое применимо к любому антигену, представляющему интерес, с незначительными изменениями способов, описанных в отношении способов выделения подходящих антигенов/источников антигенов для праймирования дендритных клеток, и незначительными изменениями способов выделения соответствующих популяций Т-клеток, которые содержат антиген-специфичные Т-клетки, подлежащие идентификации и выделению с помощью способов мечения, зависящего от взаимодействия, описанных в настоящем документе.

[255] Например, чтобы идентифицировать перспективные TSA-специфичные Т-клетки для гематологических злокачественных новообразований, таких как ОМЛ; ОЛЛ; ХЛЛ; в некоторых вариантах реализации можно следовать следующему протоколу. Раковые клетки выделяют у пациента (костный мозг или кровь) и лизируют для праймирования иДК, полученных от этого же пациента. Праймированные иДК или непраймированные (контрольные) иДК окрашивают с использованием CellTracker™ Green CMFDA и конъюгируют с фукозилтрансферазой (FT) на поверхности клетки, и культивируют с аутологичными МКПК этого же пациента в разных соотношениях в течение 1-2 часов. Затем добавляют ГДФ-Фус-биотин (50 мкМ) и инкубируют в течение еще 30 мин. После остановки реакции N-ацетил-D-лактозамином (LacNAc) клеточную смесь окрашивают Alexa Fluor 647-стрептавидином и по маркерам идентичности клеток, а затем анализируют методом проточной цитометрии. CD4⁺ (Foxp3⁻) и/или CD8⁺ Т-клетки, которые также являются Alexa Fluor 647⁺, будут выделены в качестве перспективных TSA-специфичных Т-клеток.

[256] Аналогичным образом, чтобы идентифицировать перспективные TSA-специфичные Т-клетки для солидных опухолей у человека, в некоторых вариантах реализации можно следовать следующему протоколу. Опухоли, выделенные у пациента, поперечно разрезают на мелкие кусочки, измельчают для приготовления опухолевых лизатов или приготовления суспензий отдельных клеток. Приготовление суспензий отдельных клеток выполняют с использованием заранее установленных протоколов центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-paque, хорошо известных в данной области техники. См., например, Tan Y.S., Lei Y.L. (2019) Isolation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes by Ficoll-Paque Density Gradient Centrifugation. B: Allen I. (eds) Mouse Models of Innate Immunity. Methods in Molecular Biology, vol 1960. Humana Press, New York, NY; содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Опухолевые лизаты используют для праймирования иДК, полученных от этого же пациента. Праймированные иДК или непраймированные (отрицательный контроль) иДК или иДК, праймированные лизатами нормальной ткани (отрицательный контроль), окрашивают CellTracker™ Green CMFDA, конъюгируют с фукозилтрансферазой (FT) на поверхности клетки и культивируют с суспензией отдельных аутологичных клеток, выделенной из опухоли, в различных соотношениях (отдельные аутологичные клетки:ДК = от 5:1 до 10:1) в течение 1-2 часов. Затем добавляют ГДФ-Фус-биотин (50 мкМ) и инкубируют в течение еще 30 мин. После остановки реакции с использованием LacNAc клеточную смесь окрашивают Alexa Fluor647-стрептавидином, а также по маркерам идентичности клеток и фенотипа и подвергают FACS. CD3+/CD4+/CD25-/Alexa Fluor 647+ или CD3+/CD8+/PD-1+/Alexa Fluor 647+ клетки выделяют в качестве перспективных TSA-специфичных CD4 или CD8 Т-клеток, соответственно.

[257] Согласно конкретным вариантам реализации Т-клетки экспрессируют TSA-специфичный Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий V α и V β , полученные из Т-клеточного рецептора дикого типа, причем каждый из V α и V β содержит определяющий комплементарность участок 1 (CDR-1), определяющий комплементарность участок 2 (CDR-2) и определяющий комплементарность участок 3 (CDR-3), при этом CDR-3 V α содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

ASGTDYAEQF	SEQ ID NO: 33	AWSLRLGGTYEQY	SEQ ID NO: 53
ASSPQLGGRREQY	SEQ ID NO: 34	ASSLTISNERLF	SEQ ID NO: 54
ASSIGTANTEVF	SEQ ID NO: 35	ASSFWGRQDTQY	SEQ ID NO: 55
AWSGNTEVF	SEQ ID NO: 36	ASSFWGRGNTLY	SEQ ID NO: 56

ASRSGGSAETLY	SEQ ID NO: 37	ASGGPGQGFAEQF	SEQ ID NO: 57
ASSFVSSAETLY	SEQ ID NO: 38	ASSPTGAIMNS	SEQ ID NO: 58
ASSSDRGS AETLY	SEQ ID NO: 39	ASSLYRDRGYAEQF	SEQ ID NO: 59
ASSDRGGQDTQY	SEQ ID NO: 40	AWSLPLGQSYEQY	SEQ ID NO: 60
ASSSGTDTEVF	SEQ ID NO: 41	ASSFRGYEQY	SEQ ID NO: 61
AWRDWGGAEQF	SEQ ID NO: 42	ASSDDTYEQY	SEQ ID NO: 62
ASSGLGETLY	SEQ ID NO: 43	ASSDGDRYEQY	SEQ ID NO: 63
ASSLDNSGNTLY	SEQ ID NO: 44	ASSDNYNSPLY	SEQ ID NO: 64
ASSLDRVQDTQY	SEQ ID NO: 45	ASRDWGGRAETLY	SEQ ID NO: 65
AWTEVF	SEQ ID NO: 46	ASSLELGGREQY	SEQ ID NO: 66
ASSFGQNYAEQF	SEQ ID NO: 47	ASSDPGAANTEVF	SEQ ID NO: 67
ASSDG TSAETLY	SEQ ID NO: 48	ASSLDGADSDYT	SEQ ID NO: 68
ASRPGSAETLY	SEQ ID NO: 49	ASSMNNERLF	SEQ ID NO: 69
ASSPQLYEQY	SEQ ID NO: 50	ASSQVGGAETLY	SEQ ID NO: 70
ASSDGLGVNQDTQY	SEQ ID NO: 51	ASGDATDYS GNTLY	SEQ ID NO: 71
ASSDGGGGTEVF	SEQ ID NO: 52	ASGEGPANTEVF	SEQ ID NO: 72

[258] Согласно некоторым вариантам реализации такие Т-клетки сконструированы для экспрессии TCR. Согласно некоторым вариантам реализации такие Т-клетки сконструированы для экспрессии химерного TCR. Согласно некоторым вариантам реализации такие Т-клетки сконструированы для экспрессии одноцепочечного TCR, содержащего структуру V α -линкер-V β или V β -линкер-V α . Согласно некоторым вариантам реализации TCR является реактивным в отношении конкретного антигена. Согласно некоторым вариантам реализации такие Т-клетки сконструированы для экспрессии последовательности CDR-3 V α , выбранной из упомянутой выше группы (SEQ ID NO: 33 – SEQ ID NO:72). Согласно некоторым вариантам реализации сконструированная Т-клетка может экспрессировать химерный TCR, содержащий последовательность CDR-3 V α , выбранную из упомянутой выше группы (SEQ ID NO: 33 – SEQ ID NO:72).

[259] Антиген-специфичный TCR может представлять собой биспецифичный Т-клеточный рецептор, содержащий TCR или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело. TCR может содержать CDR-3 V α , содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из (SEQ ID NO: 33 – SEQ ID NO:72).

Размноженные с применением сахара клетки и композиции

[260] Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена популяция клеток, включающая создание популяции клеток с помощью способа стимуляции пролиферации

прогениторных истощенных Т-клеток с повышенным размножением и устойчивостью, включающего приведение популяции клеток, содержащей прогениторные истощенные Т-клетки, в контакт с эффективным количеством соединения, причем указанная популяция клеток содержит прогениторные истощенные Т-клетки.

[261] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложена размноженная *in vitro* или *ex vivo* популяции антиген-реактивных Т-клеток, причем указанные Т-клетки выделяли с помощью способа, описанного в настоящем документе. Антиген-реактивные Т-клетки в некоторых вариантах реализации могут распознавать антиген рака, инфекции патогеном, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или генетического нарушения.

[262] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложена размноженная *in vitro* или *ex vivo* популяции TSA-реактивных Т-клеток, причем указанные Т-клетки выделяли с помощью способа, описанного в настоящем документе.

[263] Согласно некоторым вариантам реализации популяцию клеток получают из наивного спленocyта.

[264] Согласно некоторым вариантам реализации наивный спленocyт необязательно содержит сконструированный связывающий агент на основе антитела, причем указанный связывающий агент на основе антитела специфично связывается с антигеном, идентифицированным в способе идентификации прогениторных истощенных Т-клеток, специфичных в отношении антигена, включающем приведение популяции клеток в контакт с модифицированной дендритной клеткой в присутствии донорного сахарного нуклеотида, конъюгированного с меткой.

[265] Согласно некоторым вариантам реализации связывающий агент специфично связывает вирус-специфичный антиген. Согласно некоторым вариантам реализации вирус-специфичный антиген представляет собой антиген вируса *лимфоцитарного хориоменингита* (LCMV), вируса гепатита С (ВГС) или вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Согласно некоторым вариантам реализации связывающий агент специфично связывает опухолеспецифический антиген (TSA). Согласно некоторым вариантам реализации опухолеспецифический антиген (TSA) представляет собой антиген овальбумина.

[266] Согласно некоторым вариантам реализации связывающий агент содержит лигандсвязывающий домен, содержащий определяющие комплементарность участки CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий домен содержит VH и VL. Согласно некоторым вариантам реализации лигандсвязывающий домен содержит одноцепочечный переменный

фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий агент содержит одну полипептидную цепь. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий агент представляет собой химерный антигенный рецептор.

[267] Согласно некоторым вариантам реализации популяция клеток представляет собой CD8⁺. Согласно некоторым вариантам реализации популяция клеток представляет собой TCF-1⁺, PD-1⁺ и Tim3⁻.

[268] Согласно некоторым вариантам реализации популяция клеток характеризуется повышенным размножением и устойчивостью.

[269] Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ или разбавителей.

[270] Т-клетки и размноженные популяции указанных клеток могут быть включены в состав фармацевтической композиции. Фармацевтическая композиция может представлять собой любую композицию, раскрытую в настоящем документе.

[271] В настоящем документе термин «фармацевтическая композиция» относится к фармацевтически приемлемой композиции, причем указанная композиция содержит прогениторные истощенные Т-клетки, и в некоторых вариантах реализации дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[272] В настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или приведенный в Фармакопее США, иной общепризнанной фармакопее в дополнение к другим составам, которые являются безопасными для применения у животных, и в более конкретном случае у человека и/или млекопитающих, отличных от человека.

[273] В настоящем документе термин «фармацевтически приемлемые носители» или «фармацевтически эффективные вспомогательные вещества» относится к вспомогательному веществу, разбавителю, консерванту, солюбилизатору, эмульгатору, адъюванту и/или носителю, с которыми вводят прогениторные истощенные Т-клетки. Такие носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая те, которые получены из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители. Антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как

этилендиаминтетрауксусная кислота; и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза, также могут быть носителем. Специалистам в данной области техники известны способы получения композиций в комбинации с носителями. Согласно некоторым вариантам реализации выражение «фармацевтически приемлемый носитель» предназначено для включения любых и всех растворителей, дисперсионных сред, покрытий, изотонических и замедляющих всасывание агентов и т. п., которые являются совместимыми с введением фармацевтического средства. Применение таких сред и агентов с фармацевтически активными веществами хорошо известно в данной области техники. См., например, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., (Lippincott, Williams & Wilkins 2003). За исключением случаев, когда какая-либо обычная среда или агент несовместима(несовместим) с активным соединением, предусмотрено такое применение в композициях.

[274] Составы фармацевтической композиции, подходящие для введения, как правило, обычно содержат активный ингредиент в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, таким как стерильная вода или стерильный изотонический физиологический раствор. Такие составы могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме, подходящей для болюсного введения или для непрерывного введения. Инъекционные составы могут быть приготовлены, упакованы или проданы в единичной лекарственной форме, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах, содержащих консервант. Составы для введения включают, но не ограничиваются ими, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных носителях, пасты и тому подобное. Такие составы также могут содержать один или более дополнительных ингредиентов, включая, но не ограничиваясь ими, суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие агенты. Составы также могут включать водные растворы, которые могут содержать вспомогательные вещества, такие как соли, углеводы и буферные агенты, или стерильную апиrogenную воду. Примерные формы для введения могут включать растворы или суспензии в стерильных водных растворах, например, водных растворах пропиленгликоля или декстрозы. При необходимости такие лекарственные формы могут быть соответствующим образом забуферены.

[275] Композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, обычно встречающиеся в фармацевтических композициях. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как, например, противозудные средства, вяжущие средства, локальные анестетики или противовоспалительные агенты, или могут содержать дополнительные материалы, подходящие для физического

изготовления различных лекарственных форм композиций согласно настоящему изобретению, такие как красители, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загущающие агенты и стабилизаторы. Однако такие материалы при добавлении не должны чрезмерно мешать разным видам биологической активности компонентов композиций согласно настоящему изобретению. Составы можно стерилизовать и, при необходимости, смешивать со вспомогательными агентами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими агентами, эмульгаторами, солями для корректировки осмотического давления, буферами, красителями и/или ароматическими веществами и т. п., которые не вступают во вредные взаимодействия с составом.

Применение клеток и композиций

[276] Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества популяции клеток или фармацевтической композиции.

[277] Согласно некоторым вариантам реализации любое заболевание или нарушение, которое приводит к экспрессии специфического для заболевания антигена на поверхности клетки, можно лечить с помощью антиген-реактивной прогениторной истощенной Т-клетки, выделенной с помощью способов, описанных в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей указанные клетки. Способы могут включать введение субъекту, нуждающемуся в этом, одной или более различных популяций прогениторных истощенных Т-клеток, выделенных и размноженных с помощью способов, описанных в настоящем документе, и способов, известных в данной области техники. Например, популяция прогениторных истощенных Т-клеток, направленных к конкретному антигену, может быть идентифицирована с помощью способов, раскрытых в настоящем документе, и размножена, и другая популяция прогениторных истощенных Т-клеток, направленных к другому отличающемуся антигену, может быть идентифицирована с помощью способов, раскрытых в настоящем документе, и размножена, и обе популяции могут быть введены субъекту, нуждающемуся в этом.

[278] В целом, введение может быть местным, парентеральным или энтеральным. Композиции согласно настоящему изобретению, как правило, подходят для парентерального введения. В настоящем документе «парентеральное введение» фармацевтической композиции включает любой путь введения, характеризующийся физическим разрушением ткани субъекта, и введение фармацевтической композиции через разрушение в ткани, что обычно приводит к непосредственному введению в кровотока, в мышцу или во внутренний орган. Таким образом, парентеральное введение

включает, но не ограничивается ими, введение фармацевтической композиции путем инъекции композиции, путем нанесения композиции через хирургический разрез, путем нанесения композиции через проникающую в ткань нехирургическую рану и тому подобное. В частности, предусмотрено, что парентеральное введение включает, но не ограничивается перечисленными, подкожную, внутрибрюшинную, внутримышечную, интрастернальную, внутривенную, интраназальную, интратрахеальную, внутриартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, интрауретральную, внутричерепную, внутриопухолевую, внутриглазную, внутрикожную, интрасиновиальную инъекцию или инфузии; и методики инфузии при диализе почек. Согласно некоторым вариантам реализации клетки и композиции согласно настоящему изобретению вводят внутривенно. Согласно некоторым вариантам реализации клетки и композиции согласно настоящему изобретению вводят внутримышечно. Согласно некоторым вариантам реализации клетки и композиции согласно настоящему изобретению вводят подкожно.

[279] Согласно некоторым вариантам реализации введение включает парентеральное введение. Согласно некоторым вариантам реализации введение включает внутривенное введение.

[280] Согласно некоторым вариантам реализации способы могут включать введение примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 24, 30, 35, 48, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 120, 150, 200, 300, 384, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более популяций антиген-реактивных прогениторных истощенных Т-клеток, выделенных и размноженных с помощью способов, описанных в настоящем документе.

[281] Согласно некоторым вариантам реализации прогениторные истощенные Т-клетки, размноженные с помощью способов, описанных в настоящем документе, можно вводить в виде однократной дозы. Согласно некоторым вариантам реализации прогениторные истощенные Т-клетки, размноженные с помощью способов, описанных в настоящем документе, можно вводить в виде многократных доз.

[282] Оптимальная дозировка и режим лечения для конкретного субъекта могут быть определены специалистом в области медицины путем наблюдения за пациентом на предмет признаков заболевания и соответствующей корректировки лечения. Лечение также может быть скорректировано после измерения уровней терапевтического агента (например, числа прогениторных истощенных Т-клеток) в биологическом образце (например, образце биологической жидкости или ткани), что также может быть использовано для оценки эффективности лечения, и лечение может быть соответствующим образом скорректировано в сторону увеличения или уменьшения.

[283] Согласно некоторым вариантам реализации однократную дозу прогениторных истощенных Т-клеток, размноженных с помощью способов, описанных в настоящем документе, вводят субъекту. Согласно некоторым вариантам реализации две или более доз прогениторных истощенных Т-клеток, размноженных с помощью способов, описанных в настоящем документе, вводят субъекту последовательно. Согласно некоторым вариантам реализации три дозы прогениторных истощенных Т-клеток, размноженных с помощью способов, описанных в настоящем документе, вводят субъекту последовательно. Согласно некоторым вариантам реализации дозу прогениторных истощенных Т-клеток, размноженных с помощью способов, описанных в настоящем документе, вводят субъекту еженедельно, раз в две недели, раз в месяц, раз в два месяца, раз в квартал, раз в полгода, раз в год или раз в два года. Согласно некоторым вариантам реализации вторую или последующую дозу прогениторных истощенных Т-клеток, размноженных с помощью способов, описанных в настоящем документе, вводят субъекту, когда количество прогениторных истощенных Т-клеток, размноженных с помощью способов, описанных в настоящем документе, уменьшается.

[284] Согласно одному варианту реализации антиген-реактивную Т-клетку или популяцию антиген-реактивных Т-клеток идентифицируют и обогащают с помощью способа, описанного в настоящем документе, и размножают и вводят пациенту для лечения заболевания или состояния. Заболевание или состояние может представлять собой клеточное пролиферативное нарушение. Клеточное пролиферативное нарушение может быть выбрано из солидной опухоли, лимфомы, лейкоза и липосаркомы. Клеточное пролиферативное нарушение может быть острым, хроническим, рецидивирующим, рефрактерным, ускоренным, в стадии ремиссии, стадии I, стадии II, стадии III, стадии IV, ювенильным или взрослым. Клеточное пролиферативное нарушение может быть выбрано из миелогенного лейкоза, лимфобластного лейкоза, миелоидного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, миеломоноцитарного лейкоза, нейтрофильного лейкоза, миелодиспластического синдрома, В-клеточной лимфомы, лимфомы Беркитта, крупноклеточной лимфомы, смешанно-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из мантийных клеток, лимфомы Ходжкина, рецидивирующей мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, множественной миеломы, базофильного лейкоза, эозинофильного лейкоза, мегакариобластного лейкоза, монобластного лейкоза, моноцитарного лейкоза, эритролейкоза, эритроидного лейкоза и гепатоцеллюлярной карциномы. Клеточное пролиферативное нарушение может включать гематологическое злокачественное новообразование. Гематологическое злокачественное новообразование может включать В-клеточное злокачественное новообразование.

Клеточное пролиферативное нарушение может включать хронический лимфоцитарный лейкоз. Клеточное пролиферативное нарушение может включать острый лимфобластный лейкоз. Клеточное пролиферативное нарушение может включать CD19-положительную лимфому Беркитта.

[285] Заболевание или состояние может представлять собой рак, инфекцию патогеном, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или генетическое нарушение.

[286] Рак может включать рецидивирующий и/или рефрактерный рак. Примеры разных видов рака включают, но не ограничиваются перечисленными, саркомы, карциномы, лимфомы или лейкозы. Рак может включать нейроэндокринный рак. Рак может включать рак поджелудочной железы. Рак может включать рак экзокринной части поджелудочной железы. Рак может включать рак щитовидной железы. Рак щитовидной железы может включать медуллярный рак щитовидной железы. Рак может включать рак предстательной железы. Рак может включать эпителиальный рак. Рак может включать рак молочной железы. Рак может включать рак эндометрия. Рак может включать рак яичников. Рак яичников может включать стромальный рак яичников. Рак может включать рак шейки матки. Рак может включать рак кожи. Рак кожи может включать неопластический рак кожи. Рак кожи может включать меланому. Рак может включать рак почки. Рак может включать рак легких. Рак легких может включать мелкоклеточный рак легких. Рак легких может включать немелкоклеточный рак легких. Рак может включать колоректальный рак. Рак может включать рак желудка. Рак может включать рак толстой кишки. Рак может включать рак головного мозга. Рак головного мозга может включать опухоль головного мозга. Рак может включать глиобластому. Рак может содержать астроцитому. Рак может включать рак крови. Рак крови может включать лейкоз. Лейкоз может включать миелоидный лейкоз. Рак может включать лимфому. Лимфома может включать неходжкинскую лимфому. Рак может включать саркому. Саркома может включать саркому Юинга.

[287] Саркомы представляют собой разные виды рака кости, хряща, жира, мышц, кровеносных сосудов или другой соединительной или поддерживающей ткани. Саркомы включают, но не ограничиваются перечисленными, рак кости, фибросаркому, хондросаркому, саркому Юинга, злокачественную гемангиоэндотелиому, злокачественную шванному, двустороннюю вестибулярную шванному, остеосаркому, саркомы мягких тканей (например, саркому альвеолярной мягкой части, ангиосаркому, филоидную цистосаркому, дерматофибросаркому, десмоидную опухоль, эпителиоидную саркому, экстраклеточную остеосаркому, фибросаркому, гемангиоперицитому, гемангиосаркому, саркому Капоши, лейомиосаркому, липосаркому, лимфангиосаркому,

лимфосаркому, злокачественную фиброзную гистиоцитому, нейрофибросаркому, рабдомиосаркому и синовиальную саркому).

[288] Карциномы представляют собой виды рака, которые начинаются из эпителиальных клеток, которые представляют собой клетки, покрывающие поверхность тела, вырабатывающие гормоны и составляющие железы. В качестве неограничивающего примера карциномы включают рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак легких, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак прямой кишки, рак почки, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак предстательной железы, рак печени, рак яичников, рак головного мозга, рак влагалища, рак вульвы, рак матки, рак ротовой полости, рак полового члена, рак яичек, рак пищевода, рак кожи, рак фаллопиевых труб, рак головы и шеи, гастроинтестинальный стромальный рак, аденокарциному, кожную или внутриглазную меланому, рак анальной области, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, рак уретры, рак почечной лоханки, рак мочеточника, рак эндометрия, рак шейки матки, рак гипофиза, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, глиому ствола головного мозга и опухоли оси позвоночника. В некоторых случаях рак представляет собой рак кожи, такой как базальноклеточная карцинома, плоскоклеточный рак, меланома, немеланомный рак или актинический (солнечный) кератоз.

[289] В некоторых случаях рак представляет собой рак легких. Рак легких может начинаться в дыхательных путях, которые ответвляются от трахеи, чтобы снабжать легкие (бронхи) или небольшие воздушные мешочки легких (альвеолы). Разные виды рака легких включает немелкоклеточную карциному легких (НМРЛ), мелкоклеточную карциному легких и мезотелиому. Примеры НМРЛ включают плоскоклеточную карциному, аденокарциному и крупноклеточную карциному. Мезотелиома может представлять собой раковую опухоль слизистой оболочки легких и грудной полости (плевры) или слизистой оболочки живота (брюшины). Мезотелиома может быть вызвана воздействием асбеста. Рак может представлять собой рак головного мозга, такой как глиобластома.

[290] В качестве альтернативы, рак может представлять собой опухоль центральной нервной системы (ЦНС). Опухоли ЦНС можно классифицировать как глиомы или неглиомы. Глиома может представлять собой злокачественную глиому, глиому высокой степени злокачественности, диффузную внутреннюю глиому моста. Примеры глиом включают астроцитомы, олигодендроглиомы (или смеси элементов олигодендроглиомы и астроцитомы) и эпендимомы. Астроцитомы включают, но не ограничиваются перечисленными, астроцитомы низкой степени злокачественности, анапластические

астроцитомы, мультиформную глиобластому, пилоцитарную астроцитому, плеоморфную ксантоастроцитому и субэпендимальную гигантоклеточную астроцитому. Олигодендроглиомы включают олигодендроглиомы низкой степени злокачественности (или олигоастроцитомы) и анапластические олигодендроглиомы. Неглиомы включают менингиомы, аденомы гипофиза, первичные лимфомы ЦНС и медуллобластомы. В некоторых случаях рак представляет собой менингиому.

[291] Лейкоз может представлять собой острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз или хронический миелоцитарный лейкоз. Дополнительные типы лейкозов включают волосатоклеточный лейкоз, хронический миеломоноцитарный лейкоз и ювенильный миеломоноцитарный лейкоз.

[292] Лимфомы представляют собой разные виды рака, происходящего из лимфоцитов, и могут развиваться из В- или Т-лимфоцитов. Два основных типа лимфом представляют собой лимфому Ходжкина, ранее известную как болезнь Ходжкина, и неходжкинскую лимфому. Лимфома Ходжкина характеризуется присутствием клеток Рид-Штернберга. Неходжкинские лимфомы представляют собой все лимфомы, которые не являются лимфомой Ходжкина. Неходжкинские лимфомы могут представлять собой вялотекущие лимфомы и агрессивные лимфомы. Неходжкинские лимфомы включают, но не ограничиваются перечисленными, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому лимфоидной ткани, ассоциированную со слизистой оболочкой (MALT), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лимфому из мантийных клеток, лимфому Беркитта, медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому, макроглобулинемию Вальденстрема, узловую В-клеточную лимфому из маргинальной зоны (NMZL), лимфому маргинальной зоны селезенки (SMZL), экстранодальную В-клеточную лимфому из маргинальной зоны, внутрисосудистую крупноклеточную В-клеточную лимфому, первичную выпотную лимфому и лимфоматоидный гранулематоз.

[293] Рак может включать солидную опухоль. Рак может включать саркому. Рак может быть выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, рака почки, рака легких, меланомы, миеломы, рака щитовидной железы, рака поджелудочной железы, глиомы, злокачественной глиомы головного мозга, глиобластомы, рака яичника и рака предстательной железы. Рак может иметь неоднородную экспрессию антигена. Рак может иметь модулированную экспрессию антигена. Антиген может представлять собой поверхностный антиген. Рак может не включать миелому. Рак может не включать меланому. Рак может не включать рак толстой кишки. Рак может представлять собой

острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ). Рак может представлять собой рецидивирующий ОЛЛ. Рак может представлять собой рефрактерный ОЛЛ. Рак может представлять собой рецидивирующий рефрактерный ОЛЛ. Рак может представлять собой хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ). Рак может представлять собой рецидивирующий ХЛЛ. Рак может представлять собой рефрактерный ХЛЛ. Рак может представлять собой рецидивирующий рефрактерный ХЛЛ.

[294] Рак может включать рак молочной железы. Рак молочной железы может представлять собой тройной положительный рак молочной железы (положительный по рецептору эстрогена, рецептору прогестерона и Her2). Рак молочной железы может представлять собой тройной отрицательный рак молочной железы (отрицательный по рецептору эстрогена, рецептору прогестерона и Her2). Рак молочной железы может быть положительным по рецептору эстрогена. Рак молочной железы может быть отрицательным по рецептору эстрогена. Рак молочной железы может быть положительным по рецептору прогестерона. Рак молочной железы может быть отрицательным по рецептору прогестерона. Рак молочной железы может включать Her2-отрицательный рак молочной железы. Рак молочной железы может включать Her2-низкоэкспрессирующий рак молочной железы. Рак молочной железы может включать Her2-положительный рак молочной железы. Клеточные линии, экспрессирующие Her2, хорошо охарактеризованы по плотности антигена, что отражает клиническую иммуногистохимическую характеристику, на основании которой злокачественные новообразования классифицируют как 0 (<20000 антигенов Her2 на клетку), 1+ (100000 антигенов Her2 на клетку), 2+ (500000 антигенов Her2 на клетку) и 3+ (>2000000 антигенов Her2 на клетку). Согласно настоящему изобретению предложены способы лечения разных видов рака молочной железы указанных классификаций. Рак молочной железы может включать рак молочной железы, классифицированный как Her2 0. Рак молочной железы может включать рак молочной железы, классифицированный как Her2 1+. Рак молочной железы может включать рак молочной железы, классифицированный как Her2 2+. Рак молочной железы может включать рак молочной железы, классифицированный как Her2 3+.

[295] Заболевание или состояние может представлять собой инфекцию патогеном. Инфекции патогеном могут быть вызваны одним или более патогенами. В некоторых случаях патоген представляет собой бактерию, грибок, вирус или простейшее.

[296] Примерные патогены включают, но не ограничиваются ими: Bordetella, Borrelia, Brucella, Campylobacter, Chlamydia, Chlamydophila, Clostridium, Corynebacterium, Enterococcus, Escherichia, Francisella, Haemophilus, Helicobacter, Legionella, Leptospira,

Listeria, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Vibrio* или *Yersinia*. В некоторых случаях заболевание или состояние, вызванное патогеном, представляет собой туберкулез, и гетерогенный образец содержит чужеродные молекулы, происходящие из бактерии *Mycobacterium tuberculosis*, и молекулы, происходящие от субъекта. В некоторых случаях заболевание или состояние, вызванное бактерией, представляет собой туберкулез, пневмонию, которая может быть вызвана бактериями, такими как *Streptococcus* и *Pseudomonas*, заболевание пищевого происхождения, которое может быть вызвано бактериями, такими как *Shigella*, *Campylobacter* и *Salmonella*, и инфекцию, такую как столбняк, брюшной тиф, дифтерия, сифилис и проказа. Заболевание или состояние может представлять собой бактериальный вагиноз, заболевание влагалища, вызванное дисбалансом встречающейся в природе бактериальной флоры. В качестве альтернативы, заболевание или состояние представляет собой бактериальный менингит, бактериальное воспаление мозговых оболочек (например, защитных мембран, покрывающих головной и спинной мозг). Другие заболевания или состояния, вызванные бактериями, включают, но не ограничиваются перечисленными, бактериальную пневмонию, инфекцию мочевыводящих путей, бактериальный гастроэнтерит и бактериальную инфекцию кожи. Примеры бактериальных инфекций кожи включают, но не ограничиваются перечисленными, импетиго, которое может быть вызвано *Staphylococcus aureus* или *Streptococcus pyogenes*; рожу, которая может быть вызвана бактериальной стрептококковой инфекцией глубокого эпидермиса с лимфатическим распространением; и целлюлит, который может быть вызван нормальной флорой кожи или экзогенными бактериями.

[297] Патоген может представлять собой грибок, такой как *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis* и *Stachybotrys*. Примеры заболеваний или состояний, вызванных грибом, включают, но не ограничиваются перечисленными, паховый зуд, инфекцию дрожжами, стригущий лишай и микоз стопы.

[298] Патоген может представлять собой вирус. Примеры вирусов включают, но не ограничиваются перечисленными, аденовирус, вирус Коксаки, вирус Эпштейна-Барр, вирус гепатита (например, гепатит А, В и С), вирус простого герпеса (тип 1 и 2), цитомегаловирус, вирус герпеса, ВИЧ, вирус гриппа, вирус кори, вирус паротита, вирус папилломы, вирус парагриппа, полиовирус, респираторно-синцитиальный вирус, вирус краснухи и вирус ветряной оспы. Примеры заболеваний или состояний, вызванных вирусами, включают, но не ограничиваются перечисленными, простуду, грипп, гепатит, СПИД, ветряную оспу, краснуху, свинку, корь, бородавки и полиомиелит.

[299] Патоген может представлять собой простейшее, например, *Acanthamoeba* (например, *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. polyphaga*, *A. rhysodes*, *A. healyi*, *A. divionensis*), *Brachiola* (например, *B. connori*, *B. vesicularum*), *Cryptosporidium* (например, *C. parvum*), *Cyclospora* (например, *C. cayetanensis*), *Encephalitozoon* (например, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*), *Entamoeba* (например, *E. histolytica*), *Enterocytozoon* (например, *E. bienersi*), *Giardia* (например, *G. lamblia*), *Isospora* (e.g. *I. belli*), *Microsporidium* (например, *M. africanum*, *M. ceylonensis*), *Naegleria* (например, *N. fowleri*), *Nosema* (например, *N. algerae*, *N. ocularum*), *Pleistophora*, *Trachipleistophora* (например, *T. anthropophthera*, *T. hominis*) и *Vittaforma* (например, *V. corneae*).

[300] Заболевание или состояние может представлять собой аутоиммунное заболевание или заболевание, связанное с аутоиммунитетом. Аутоиммунное нарушение может представлять собой нарушение функции иммунной системы организма, которое заставляет организм атаковать свои собственные ткани. Примеры аутоиммунных заболеваний и состояний, связанных с аутоиммунитетом, включают, но не ограничиваются перечисленными, болезнь Аддисона, очаговую алопецию, анкилозирующий спондилоартрит, антифосфолипидный синдром (АФС), аутоиммунную апластическую анемию, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный миокардит, болезнь Бехчета, глютеновую спру, болезнь Крона, дерматомиозит, эозинофильный фасцит, узловатую эритему, гигантоклеточный артериит (височный артериит), синдром Гудпасчера, болезнь Грейвса, болезнь Хашимото, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), IgA-нефропатию, ювенильный артрит, диабет, ювенильный диабет, синдром Кавасаки, синдром Ламберта-Итона, волчанку (СКВ), смешанное заболевание соединительной ткани (СЗСТ), рассеянный склероз, тяжелую миастению, пузырчатку, узелковый полиартериит, аутоиммунные полигландулярные синдромы I, II и III типа, ревматическую полимиалгию, полимиозит, псориаз, псориатический артрит, синдром Рейтера, рецидивирующий полихондрит, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, аутоиммунитет сперматозоидов и яичек, синдром ригидности, артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, язвенный колит, увеит, васкулит, витилиго и гранулематоз Вегенера.

[301] Заболевание или состояние может представлять собой воспалительное заболевание. Примеры воспалительных заболеваний включают, но не ограничиваются перечисленными, альвеолит, амилоидоз, ангиит, анкилозирующий спондилит, аваскулярный некроз, Базедову болезнь, паралич Белла, бурсит, синдром запястного канала, целиакию, холангит, хондромалицию надколенника, хронический активный

гепатит, синдром хронической усталости, синдром Когана, врожденную дисплазию тазобедренного сустава, костохондрит, болезнь Крона, муковисцидоз, тендинит де Кервена, артрит, связанный с диабетом, диффузный идиопатический скелетный гиперостоз, дискоидную волчанку, синдром Элерса-Данлоса, семейную средиземноморскую лихорадку, фасциит, фиброз/фибромиалгию, плечелопаточный периартериит, ганглиозные кисты, гигантоклеточный артериит, подагру, болезнь Грейвса, синдромы ВИЧ-ассоциированных ревматических заболеваний, артрит, связанный с гиперпаратиреозом, инфекционный артрит, синдром воспаленного кишечника/синдром раздраженного кишечника, ювенильный ревматоидный артрит, болезнь Лайма, синдром Марфана, болезнь Микулича, смешанное заболевание соединительной ткани, рассеянный склероз, синдром миофасциальной боли, остеоартрит, остеомаляцию, остеопороз и кортикостероид-индуцированный остеопороз, болезнь Педжета, палиндромный ревматизм, болезнь Паркинсона, болезнь Пламмера, ревматическую полимиалгию, полимиозит, псевдоподагру, псориатический артрит, феномен/синдром Рейно, синдром Рейтера, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, ишиаз (поясничную радикулопатию), склеродермию, цингу, серповидноклеточный артрит, синдром Шегрена, стеноз позвонков, смещение позвонка, болезнь Стилла, системную красную волчанку, болезнь Такаясу (болезнь отсутствия пульса), тендинит, теннисный локоть/локоть гольфиста, артрит, связанный со щитовидной железой, синдром щелкающего пальца, язвенный колит, гранулематоз Вегенера и болезнь Уиппла.

[302] Согласно некоторым вариантам реализации способы могут включать титрование прогениторных истощенных Т-клеток или популяции прогениторных истощенных Т-клеток для выявления желаемого эффекта. Титрование прогениторных истощенных Т-клеток или популяции прогениторных истощенных Т-клеток может обеспечить различие плотности антигена. Например, фатальная нацеленная внеопухолевая реактивность Her2-нацеленных CAR-Т-клеток к низким уровням экспрессии Her2 в легком замедлила применение CAR-Т-клеток для лечения солидных опухолей в клинике. В клинике это может быть использовано для титрования терапии до соответствующего терапевтического индекса.

[303] Согласно некоторым вариантам реализации прогениторную истощенную Т-клетку, реактивную в отношении антигена патогена, идентифицированную и обогащенную способом, описанным в настоящем документе, размножают и вводят пациенту для лечения инфекции патогеном. Согласно некоторым вариантам реализации патоген представляет собой вирус, паразита или бактерию. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку вводят в виде фармацевтической композиции.

[304] Согласно одному варианту реализации аутоантиген-реактивную регуляторную Т-клетку, идентифицированную и обогащенную способом, описанным в настоящем документе, размножают и вводят пациенту для лечения аутоиммунного заболевания или нарушения. Согласно одному варианту реализации заболевание представляет собой полимиозит. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетку вводят в виде фармацевтической композиции.

[305] Согласно некоторым вариантам реализации лечение включает снижение тяжести по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения. Согласно некоторым вариантам реализации заболевание или нарушение представляет собой рак. Согласно некоторым вариантам реализации рак выбран из меланомной опухоли; опухоли молочной железы; и опухоли, выбранной из группы, состоящей из пилоцитарной астроцитомы; ОМЛ; ОЛЛ; опухоли щитовидной железы; почечной хромофобной опухоли; ХЛЛ; медуллобластомы; нейробластомы; глиомы низкой степени злокачественности; глиобластомы; опухоли предстательной железы; опухоли яичников; миеломы; опухоли поджелудочной железы; папиллярной опухоли почки; В-клеточной лимфомы; светлоклеточной опухоли почки; опухоли головы и шеи; опухоли печени; опухоли шейки матки; опухоли матки; опухоли мочевого пузыря; колоректальной опухоли; мелкоклеточной опухоли легких; опухоли пищевода; опухоли желудка; аденоопухоли легких; и плоскоклеточной опухоли легких. Согласно некоторым вариантам реализации введение осуществляют в виде фармацевтической композиции. Согласно некоторым вариантам реализации заболевание или нарушение представляет собой инфекцию.

[306] Согласно некоторым вариантам реализации клеточную композицию или фармацевтическую композицию оценивают на чистоту до введения. Согласно некоторым вариантам реализации проводят испытание клеточной композиции или фармацевтической композиции на стерильность. Согласно некоторым вариантам реализации клеточную композицию или фармацевтическую композицию подвергают скринингу для подтверждения ее соответствия субъекту-реципиенту.

[307] Согласно некоторым вариантам реализации субъект представляет собой млекопитающее. Согласно некоторым вариантам реализации субъект представляет собой человека.

[308] Согласно некоторым вариантам реализации популяция клеток является аллогенной для субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации популяция клеток является аутологичной для субъекта.

[309] Согласно некоторым вариантам реализации введение включает комбинированное введение с IL-2.

[310] Ингибиторы иммунных контрольных точек можно применять в комбинации с разными видами терапии на основе адоптивного переноса клеток (АСТ). Как полагают, успешные противоопухолевые иммунные ответы после блокады PD-1/PD-L1 требуют повторной активации и клональной пролиферации неоантиген-специфичных Т-клеток, присутствующих в микроокружении опухоли. Недостаточное образование неоантиген-специфичных Т-клеток, подавление эффекторной функции неоантиген-специфичных Т-клеток и нарушение образования Т-клеток памяти являются основными факторами, ответственными за неэффективность видов терапии ингибиторами контрольных точек.

[311] Согласно некоторым вариантам реализации введение включает комбинированное введение с соединением, идентифицированным с помощью способа скрининга соединений, которые стимулируют пролиферацию прогениторных истощенных Т-клеток, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации введение включает комбинированное введение с ингибитором рецептора запрограммированной гибели клетки 1 (PD-1) поверхности клетки или ингибитором лиганда запрограммированной гибели клетки 1 (PD-L1). Согласно некоторым вариантам реализации ингибитор PD1 или ингибитор PD-L1 содержит моноклональное антитело, которое специфично связывает (PD-1) или (PD-L1), соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации моноклональное антитело, которое специфично связывает PD-1, представляет собой пембролизумаб, ниволумаб или цемиплимаб. Согласно некоторым вариантам реализации моноклональное антитело, которое специфично связывает PD-L1, представляет собой атезолизумаб, авелумаб или дурвалумаб. Согласно некоторым вариантам реализации популяция клеток или фармацевтическая композиция предложена субъекту для применения в способе лечения.

[312] Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен набор, содержащий популяцию клеток или фармацевтическую композицию и инструкции по применению.

[313] Согласно некоторым вариантам реализации прогениторные истощенные Т-клетки, размноженные с помощью способов, описанных в настоящем документе, или других способов, известных в данной области техники, вводят пациенту в сочетании (например, до, одновременно или после) с любым числом соответствующих средств лечения, включая, но не ограничиваясь перечисленными, лечение агентами, такими как противовирусные агенты, химиотерапию, лучевую терапию, иммуносупрессивные агенты, такие как циклоспорин, бисульфид, бортезомиб, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антитела или другие иммуноабляционные агенты, такие как CAMPATH, антитела к CD3 или другие виды терапии антителами, цитоксин, фиударбин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофеноловую кислоту, стероиды, FR901228, цитокины и облучение. Эти

лекарственные средства ингибируют либо кальций-зависимую фосфатазу кальцинейрин (циклоспорин и FK506), протеасому (бортезомиб) либо ингибируют киназу p70S6, которая важна для индуцированной фактором роста передачи сигналов (рапамицин). (Liu et al, Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al, Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al, Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993; Isoniemi (выше)).

[314] Все публикации и патенты, упомянутые в настоящем документе, настоящим полностью включены посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патент был конкретно и по отдельности указан для включения посредством ссылки. В случае конфликта настоящая заявка, включая любые определения, приведенные в настоящем документе, будет иметь преимущественную силу. Однако упоминание любой ссылки, статьи, публикации, патента, публикации патента и заявки на патент, цитируемых в настоящем документе, не является и не должно восприниматься как признание или любая форма предположения о том, что они представляют собой действительный предшествующий уровень техники или являются частью общих знаний в любой стране мира.

[315] Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, предназначены только для целей упорядочения и не должны рассматриваться как ограничивающие описанный объект.

[316] Несмотря на то, что были проиллюстрированы и описаны иллюстративные варианты реализации настоящего изобретения, следует понимать, что в них могут быть внесены различные изменения, не отклоняясь от сущности и объема настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

[317] Настоящее изобретение далее описано со ссылкой на следующие примеры. Эти примеры приведены только в целях иллюстрации, и настоящее изобретение никоим образом не должно толковаться как ограниченное этими примерами, а скорее должно толковаться как охватывающее любые и все варианты, которые становятся очевидными на основании раскрытия, представленного в настоящем документе.

[318] Без дополнительного описания считается, что обычный специалист в данной области техники может, используя предыдущее описание и следующие иллюстративные примеры, получить и применить способы настоящего изобретения и применить на практике заявленные способы. Таким образом, следующие рабочие примеры конкретно раскрывают варианты реализации настоящего изобретения и не должны быть истолкованы как ограничивающие каким-либо образом остальную часть настоящего изобретения.

[319] Далее описаны материалы и методы, применяемые в этих экспериментах.

Пример 1: Разработка высокопроизводительного анализа для скрининга соединений, которые разобщают размножение Т-клеток и дифференцировку

Уровень техники

[320] Виды терапии на основе adoptивного переноса клеток имеют ограниченную эффективность в снижении установленного заболевания (например, опухолевой нагрузки или инфекции). Кратковременная устойчивость Т-клеток *in vivo* после переноса коррелирует с отсутствием устойчивых клинических ответов. Т-клетки (TCR-сконструированные и выделенные антиген-специфичные Т-клетки) необходимо размножать *in vitro* для получения большого числа клеток для инфузии пациенту (например, adoptивного переноса клеток). Предположительно, отсутствие устойчивых Т-клеток, наблюдаемое у субъектов, проходящих лечение с использованием переноса Т-клеток, обусловлено широкомасштабными режимами размножения, используемыми для получения достаточного числа Т-клеток, в которых Т-клетки побуждаются к терминальной дифференцировке и характеризуются ограниченной или отсутствующей способностью к репликации.

[321] Клетки Т_{рег} (Tim3⁺TCF-1⁺) обеспечивают пролиферативный взрыв и эффекторную функцию путем образования терминально истощенных Т-клеток (T_{tex}, Tim3⁺TCF-1⁻) после анти-PD-1/PD-L1 терапии. Оценка уровней выживаемости пациентов с помощью мета-анализа базы данных Атласа ракового генома (TCGA) подтверждает доказательства того, что сигнатуры *Tcf7/Pdcd1* в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (TIL) коррелируют с дифференциальными уровнями выживаемости у пациентов.

[322] Таким образом, данное исследование направлено на применение нового анализа для идентификации низкомолекулярных модуляторов, которые можно применять во время размножения *in vitro*, чтобы улучшить качество выделенных Т-клеток путем увеличения числа анти-PD-1-чувствительных CD8⁺ Т-клеток с менее дифференцированными фенотипами.

Методы

[323] Мышей OT-I-*Tcf7*GFP разводили путем скрещивания мышей B6(Cg)-*Tcf7*tm1Nhx/J (*Tcf7*GFP), экспрессирующих репортерный EGFP из эндогенного локуса *Tcf7*, с мышами OT-I TCR-Tg, у которых CD8⁺ Т-клетки имеют трансгенный TCR, который распознает OVA257-264, презентируемый молекулой ГКГС I. Наивные спленоциты OT-I-*Tcf7*GFP стимулировали *in vitro* пептидом OVA257-264 (500 нМ) и IL-2 (60 МЕ/мл) в присутствии или в отсутствие добавленного соединения в течение 3 дней при плотности 1 миллион/мл (100 мкл/лунку в 96-луночном планшете), затем размножали в культуральной среде,

содержащей 60 МЕ/мл IL-2, в течение 4 дней в присутствии добавленного соединения или без него. Число клеток регистрировали в день 3 и день 7. На день 7 клетки окрашивали антителами к CD8a (PerCP-Cy5.5) и к Tim3 (BV421) для проточной цитометрии или анализа на считывающем устройстве для планшетов.

Результаты

[324] Поскольку экспрессия TCF1 положительно коррелирует со стволовостью Т-клеток, чем больше сигнал EGFP, экспрессируемый Т-клеткой, тем менее дифференцирована Т-клетка. Кроме того, если соединение также способствует пролиферации Т-клеток, на лунку будет приходиться больше Т-клеток по сравнению с необработанным контролем. Следовательно, соединение, которое не только поддерживает экспрессию TCF-1, но и способствует росту Т-клеток, будет давать самую сильную интенсивность зеленой флуоресценции. Было обнаружено, что различные сахара увеличивают число Т-клеток, способных поддерживать экспрессию TCF-1. Было обнаружено, что конкретные сахара улучшают как пролиферацию, так и соотношение Tim3⁺TCF-1⁺ OT-1 клеток (Таблица 1), в то время как другие сахара увеличивают соотношение Tim3⁺TCF-1⁺, но ингибируют или не изменяют в значительной степени пролиферацию OT-1 клеток (Таблица 1). GlcA означает глюкуроновую кислоту.

Таблица 1 Сахара улучшают соотношение Tim3⁺TCF-1⁺ OT-1 клеток

День 7	Без добавок	GlcNAc (60 mM)	Neu5Ac (50 mM)	Фруктоза (80 mM)	Глюкоза (60 mM)	GlcA (60 mM)	Манноза (60 mM)	Сахароза (80 mM)	Лактоза (60 mM)	Трегалоза (80 mM)
		Повышение пролиферации			Нет изменений		Ингибирование пролиферации			
Кратность пролиферации, Нормировано к условию без добавок	1,00	1,45	1,43	1,09	0,97	0,97	0,30	0,86	0,63	0,84
Соотношение Tim3 ⁺ TCF-1 ⁺ от CD8 ⁺ Т-клеток (%)	2,6	28,8	59,6	43,9	12,0	65,3	8,4	41,2	25,6	35,4

Обсуждение

[325] Это исследование демонстрирует, что данный способ скрининга можно применять для оценки представляющих интерес соединений, которые стимулируют пролиферацию Т-клеток без потери стволовости.

Пример 2: Скрининг низкомолекулярных модуляторов, которые могут увеличивать число TCF-1⁺ клеток во время *in vitro* активации и размножения антиген-специфичных P14 CD8⁺ Т-клеток

Уровень техники

[326] Виды терапии на основе адоптивного переноса клеток имеют ограниченную эффективность в снижении установленного заболевания (например, опухолевой нагрузки

или инфекции). Кратковременная устойчивость Т-клеток *in vivo* после переноса коррелирует с отсутствием устойчивых клинических ответов. Т-клетки (TCR-сконструированные и выделенные антиген-специфичные Т-клетки) необходимо размножить *in vitro* для получения большого числа клеток для инфузии пациенту (например, адоптивного переноса клеток). Предположительно, отсутствие устойчивых Т-клеток, наблюдаемое у субъектов, проходящих лечение с использованием переноса Т-клеток, обусловлено широкомасштабными режимами размножения, используемыми для получения достаточного числа Т-клеток, в которых Т-клетки побуждаются к терминальной дифференцировке и характеризуются ограниченной или отсутствующей способностью к репликации.

[327] Клетки Т_{рег} (Tim3⁺TCF-1⁺) обеспечивают пролиферативный взрыв и эффекторную функцию путем образования терминально истощенных Т-клеток (T_{tex}, Tim3⁺TCF-1⁻) после анти-PD-1/PD-L1 терапии. Оценка уровней выживаемости пациентов с помощью мета-анализа базы данных Атласа ракового генома (TCGA) подтверждает доказательства того, что сигнатуры *Tcf7/Pdcd1* в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (TIL) коррелируют с дифференциальными уровнями выживаемости у пациентов.

[328] Таким образом, данное исследование направлено на применение нового анализа для идентификации низкомолекулярных модуляторов, которые можно применять во время размножения *in vitro*, чтобы улучшить качество выделенных Т-клеток путем увеличения числа анти-PD-1-чувствительных CD8⁺ Т-клеток с менее дифференцированными фенотипами.

Методы

[329] Использовали CD8⁺ Т-клетки от мышей P14 TCR-Tg с трансгенным Т-клеточным антигенным рецептором, специфичным в отношении антигена гликопротеина 33–41 (GP33–41) вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV). Спленоциты P14 стимулировали *in vitro* пептидом GP33 (1 мкМ) и IL-2 (60 МЕ/мл) в присутствии или в отсутствие добавленного соединения в течение 3 дней при плотности 1 миллион/мл (100 мкл/лунку в 96-луночной планшете), затем размножали в культуральной среде, содержащей 60 МЕ/мл IL-2, в течение 4 дней. Вторичную повторную стимуляцию проводили в течение 48 часов (со дня 6 по день 8) с использованием связанного с планшетом антитела к CD3 (1 мкг/мл), растворимого антитела к CD28 (1 мкг/мл) и 200 МЕ/мл IL-2 при плотности клеток 1 миллион/мл (100 мкл/лунку в 96-луночной планшете) и далее размножали в культуральной среде, содержащей 200 МЕ/мл IL-2, в течение 24 часов. Соединения поддерживали в одинаковой концентрации в течение всего курса обработки. Для обработанных клеток соединения добавляли на всех стадиях активации и

размножения. Число клеток регистрировали на день 3, день 6 и день 9. На день 6 клетки окрашивали антителом к CD8a (PE-Cy7), антителом к Tim3 (BV421) и антителом к TCF-1 (AF488) для анализа методом проточной цитометрии.

Результаты

[330] На день 6 для Т-клеток, обработанных фруктозой, сахарозой, лактозой и трегалозой, наблюдали приблизительно 1,4-1,6-кратное увеличение процента и общего числа вирус-специфичных Tim3⁺TCF-1⁺ CD8⁺ Т-клеток по сравнению с Т-клетками, культивированными без дополнительной добавки сахара, и Т-клетками, культивированными с глюкозой, соответственно (ФИГ. 1,В). Процент Tim3⁺TCF-1⁺ CD8⁺ Т увеличивался при увеличении концентраций сахара.

[331] На день 9 Т-клетки, обработанные фруктозой, сахарозой, трегалозой и лактозой, показали 7-14-кратное увеличение процента и общего числа вирус-специфичных Tim3⁺TCF-1⁺ CD8⁺ Т-клеток по сравнению с необработанными Т-клетками (ФИГ. 1,С).

[332] Добавление ряда сахаров, включая трегалозу, сахарозу, лактозу, глюкозу, галактозу и фруктозу, не ингибировало, а значительно усиливало пролиферацию клеток (в 1,1-2 раза). Это резко контрастировало с K⁺, известным метаболическим модулятором дифференцировки Т-клеток, который незначительно замедлял пролиферацию Т-клеток на 10-20% по сравнению с пролиферацией необработанных Т-клеток.

[333] Было обнаружено, что конкретные сахара улучшают как пролиферацию, так и соотношение Tim3⁺TCF-1⁺ OT-1 клеток (Таблица 2).

Таблица 2 Сахара, улучшающие как пролиферацию, так и соотношение Tim3⁺TCF-1⁺ клеток P14

		Без добавок	GlcNAc (60 mM)	Neu5Ac (50 mM)	Сахароза (80 mM)	Фруктоза (80 mM)	Лактоза (60 mM)	Трегалоза (80 mM)	Глюкоза (80 mM)	Галактоза (80 mM)
День 6	Кратность пролиферации, Нормировано к условию без добавок	1,00	2,47	2,29	1,80	2,10	1,87	1,42	1,41	1,59
	Соотношение Tim3 ⁺ TCF-1 ⁺ от CD8 ⁺ Т-клеток (%)	55,0	89,2	97,4	89,8	87,9	79,4	83,2	66,5	88,9
День 9	Кратность пролиферации, Нормировано к условию без добавок	1,00	1,44	1,40	2,85	2,94	1,76	1,47	2,33	1,87
	Соотношение Tim3 ⁺ TCF-1 ⁺ от CD8 ⁺ Т-клеток (%)	3,5	21,2	71,3	48,6	48,9	23,7	34,6	18,5	37,4

Обсуждение

[334] Это исследование демонстрирует, что данный способ скрининга можно применять для оценки представляющих интерес соединений, которые стимулируют пролиферацию Т-клеток без потери стволовости.

Пример 3: Обработанные сахаром вирус-специфичные CD8⁺ Т-клетки лучше размножались *in vivo*, чем необработанные Т-клетки

Уровень техники

[335] Было показано, что Tim3⁺TCF-1⁺ CD8⁺ Т-клетки дифференциально размножаются *in vitro* в различных условиях (показано в Примере 1 и Примере 2). В частности, клетки, обработанные сахарами (соединения, обнаруженные в Примере 1 и Примере 2), демонстрировали улучшенное размножение клеток (например, большее число Т-клеток с менее дифференцированными фенотипами) по сравнению с клетками, которые не были обработаны сахарами.

[336] Это исследование направлено на оценку размножения *in vivo* перенесенных Tim3⁺TCF-1⁺ CD8⁺ Т-клеток, первоначально размноженных *in vitro* с использованием сахаров.

Методы

[337] Наивные спленоциты P14 (Thy1.1^{+/+} или Thy1^{+/-}) стимулировали *in vitro* пептидом GP33 (1 мкМ) и IL-2 (60 МЕ/мл) в присутствии или в отсутствие добавленного соединения в течение 3 дней при плотности 1 миллион/мл (100 мкл/лунку в 96-луночном планшете), затем размножали в культуральной среде, содержащей 60 МЕ/мл IL-2, в течение 4 дней. Вторичную повторную стимуляцию проводили в течение 48 часов (со дня 6 по день 8) с использованием связанного с планшетом антитела к CD3 (1 мкг/мл), растворимого антитела к CD28 (1 мкг/мл) и 200 МЕ/мл IL-2 при плотности клеток 1 миллион/мл (100 мкл/лунку в 96-луночном планшете) и далее размножали в культуральной среде, содержащей 200 МЕ/мл IL-2, в течение 24 часов.

[338] Для оценок *in vivo* клеточную смесь (соотношение по числу 1:1) необработанных (Thy1.1^{+/+}) и обработанных сахарозой (Thy1.1^{+/-}) клеток или клеточную смесь (соотношение по числу 1:1) необработанных (Thy1.1^{+/-}) и обработанных сахарозой (Thy1.1^{+/+}) клеток переносили мышам C57BL/6J (Thy1.2^{+/+}) путем внутривенной инъекции в хвостовую вену, и мышей инфицировали LCMV-Cl13 (2,0×10⁶ КОЕ/мышь). Кровь брали и анализировали на день 7 после инфицирования.

[339] На день 9 клетки окрашивали антителом к CD8a (PE-Cy7), антителом к Tim3 (BV421) и антителом к TCF-1 (AF488) для анализа методом проточной цитометрии. Для размножения *in vivo* клеточную смесь (соотношение по числу 1:1) необработанных (Thy1.1^{+/-}) и обработанных сахарозой (Thy1.1^{+/+}) клеток (или обработанных лактозой/фруктозой клеток Thy1.1^{+/+}) переносили мышам C57BL/6J (Thy1.2^{+/+}) путем

внутривенной инъекции в хвостовую вену, и мышей инфицировали LCMV-Cl13 ($2,0 \times 10^6$ КОЕ/мышь). Клеточную смесь перед переносом, кровь (день 7), кровь (день 14) и селезенку (день 14) после инфицирования анализировали с помощью проточной цитометрии.

Результаты

[340] Через 7 дней после инфекции (dpi) наблюдали значительно более высокий процент и общее число размноженных вирус-специфичных (Thy1.1+/+) P14 CD8⁺ Т-клеток, которые предварительно обрабатывали сахарозой, чем необработанных Thy1.1+/- P14 клеток в крови (ФИГ. 2,А). Аналогичным образом, значительно более высокий процент и общее число размноженных вирус-специфичных P14 CD8⁺ Т-клеток (обработанных сахарозой, лактозой и фруктозой) было обнаружено в селезенке и печени на 14 dpi (ФИГ. 2,В).

Обсуждение

[341] Это исследование демонстрирует, что применение сахаров во время размножения *in vitro* прогениторных истощенных Т-клеток обеспечивает лучшее размножение Т-клеток *in vivo*.

Пример 4: Обработанные сахаром антиген-специфичные OT-1 CD8⁺ Т-клетки характеризуются значительно лучшими способностями подавлять рост опухоли *in vivo*, чем необработанные Т-клетки

Уровень техники

[342] Было показано, что приведение Tim3⁺TCF-1⁺ CD8⁺ Т-клеток в контакт с сахарами (соединения, обнаруженные в Примере 1 и Примере 2) повышает пролиферацию при поддержании экспрессии TCF-1 и сохранении стволовости. Т-клетки, размноженные *in vitro* с применением сахаров, характеризуются лучшим размножением *in vivo* после переноса субъекту (показано в Примере 3).

[343] Это исследование направлено на оценку того, повышает ли применение сахаров во время размножения *in vitro* эффективность видов терапии на основе адоптивного переноса Т-клеток.

Методы

[344] Наивные спленоциты от мышей OT-1 стимулировали *in vitro* OVA257-264 (500 нМ) и IL-2 (60 МЕ/мл) в присутствии или в отсутствие добавленного соединения в течение 3 дней при плотности 1 миллион/мл (100 мкл/лунку в 96-луночном планшете), а затем размножали в течение 4 дней. На день 7 экспрессию PD-1, Tim3 и TCF-1 оценивали с помощью проточной цитометрии путем окрашивания клеток антителом к CD8a (PerCP-Cy5.5), антителом к Tim3 (BV421) и антителом к TCF-1 (AF488). Для адоптивного

переноса 0,6 млн клеток B16-OVA (6×10^5) инокулировали подкожно за 3-5 дней до переноса мышам C57BL/6. В день адоптивного переноса мышей облучали рентгеновским излучением при 5 Гр, рандомизировали по размеру опухоли и вводили путем внутривенной инъекции 0,2-0,3 млн CD8⁺OT-1 Т-клеток (2×10^5), размноженных в различных условиях, с последующим введением 50000 МЕ IL-2 каждые 12 ч в течение четырех дней. В контрольной группе мышам вводили путем инъекции только бесклеточный носитель. Для оценки адоптивного переноса OT-1 CD8⁺ Т-клеток, активированных и размноженных путем приведения клеток в контакт с фруктозой, на день 9 после переноса мышам, которым перенесли Т-клетки, вводили антитело к PD-1 (100 мкг/мышь). Для оценки адоптивного переноса OT-1 CD8⁺ Т-клеток, активированных и размноженных путем приведения клеток в контакт с Neu5Ac, на день 14 и день 21 после переноса мышам, которым перенесли Т-клетки, вводили антитело к PD-1 (100 мкг/мышь). Рост опухоли контролировали каждые 3-4 дня путем измерения размера опухоли. Процент выживаемости также контролировали и регистрировали в течение 40 дней после лечения. Для оценки инфильтрирующих опухоль OT-1 Т-клеток 0,6 млн клеток B16-OVA (6×10^5) инокулировали подкожно за 3-5 дней до переноса мышам C57BL/6. В день адоптивного переноса мышей облучали рентгеновским излучением при 5 Гр, рандомизировали по размеру опухоли и вводили путем внутривенной инъекции 0,2-0,3 млн CD8⁺OT-1 Т-клеток (2×10^5), размноженных в различных условиях, с последующим введением 50000 МЕ IL-2 каждые 12 ч в течение четырех дней. Затем опухоли выделяли, и оценивали процент OT-1 Т-клеток от общего числа CD8⁺ Т-клеток и число OT-1 Т-клеток на грамм опухолевой ткани. Для оценки апоптоза наивные спленоциты OT-1 стимулировали OVA257-264 (500 нМ) без IL-2 в присутствии или в отсутствие сахаров в течение 5 дней с последующим использованием набора для детектирования апоптоза на основе аннексина V (Biolegend). Для оценки продукции IL-2 наивные спленоциты OT-1 стимулировали OVA257-264 (500 нМ) без IL-2 в присутствии или в отсутствие сахаров в течение 5 дней и измеряли. Для оценки других клеточных характеристик наивные спленоциты OT-1 стимулировали OVA257-264 (500 нМ) с IL-2 (60 МЕ/мл) в присутствии или в отсутствие сахаров в течение 7 или 8 дней. На день 7 или 8 клетки отбирали и анализировали путем оценки АФК, соотношения НАДФН/НАДФ⁺ и соотношения GSH/GSSG.

Результаты

[345] Т-клетки, обработанные как фруктозой, так и сахарозой, характеризовались 6-7-кратным увеличением процента и общего числа вирус-специфичных Tim3⁻TCF-1⁺ CD8⁺ Т-клеток по сравнению с необработанными Т-клетками. Добавление лактозы, глюкозы и

галактозы также увеличивало процент Tim3⁺TCF-1⁺ CD8⁺ Т-клеток, но на более низком уровне. В присутствии 80 мМ галактозы пролиферация Т-клеток значительно подавлена (ФИГ. 3,В).

[346] При адоптивном переносе обработанные лактозой и обработанные фруктозой Т-клетки характеризовались значительно лучшей способностью контролировать рост опухоли по сравнению с необработанными Т-клетками. Т-клетки, обработанные сахарами и перенесенные мышам, показали значительное уменьшение объема опухоли по сравнению с Т-клетками, которые не были обработаны сахаром (ФИГ. 3,Д). Т-клетки, обработанные сахаром, обладают повышенной жизнеспособностью и дифференциальными апоптотическими характеристиками по сравнению с Т-клетками, не обработанными сахаром (ФИГ. 3,Е).

[347] Аналогичным образом, Т-клетки, обработанные как GlcNAc, так и Neu5Ac, характеризовались повышенной жизнеспособностью и дифференциальными апоптотическими характеристиками по сравнению с Т-клетками, не обработанными сахаром (ФИГ. 4,В). Обработанные GlcNAc и обработанные Neu5Ac Т-клетки также характеризовались значительно более высокой продукцией IL-2 (ФИГ. 4,С). Кроме того, анализ АФК, соотношения НАДФН/НАДФ⁺ и соотношения GSH/GSSG выявил, что как обработанные GlcNAc клетки, так и обработанные Neu5Ac клетки имеют значительно меньше АФК (ФИГ. 4,Е), большее соотношение НАДФН/НАДФ⁺ (ФИГ. 4,Ф) и большее соотношение GSH/GSSG (ФИГ. 4,Г) по сравнению с Т-клетками, не обработанными сахаром.

[348] При адоптивном переносе Т-клетки, обработанные Neu5Ac, характеризуются значительно лучшей способностью контролировать рост опухоли по сравнению с необработанными Т-клетками на основании объема опухоли (ФИГ. 5,В) и выживаемостью (ФИГ. 5,С) после обработки при использовании вместе с обработкой антителом к PD-1. Кроме того, как обработанные GlcNAc Т-клетки, так и обработанные Neu5Ac Т-клетки и перенесенные мышам показали повышение числа OT-1 Т-клеток, инфильтрирующих опухоль (ФИГ. 5,Е и F).

Обсуждение

[349] Это исследование демонстрирует, что применение сахаров во время размножения *in vitro* повышает эффективность разных видов терапии на основе адоптивного переноса Т-клеток.

Пример 5: Обработанные сахаром OT-1 CD8⁺ Т-клетки характеризуются значительно дифференциально регулируемыми генами по сравнению с необработанными Т-клетками

Уровень техники

[350] Было показано, что приведение $\text{Tim3}^+\text{TCF-1}^+ \text{CD8}^+$ Т-клеток в контакт с сахарами (соединения, обнаруженные в Примере 1 и Примере 2) повышает пролиферацию при поддержании экспрессии TCF-1 и сохранении стволовости. Выяснение того, как воздействие конкретных соединений на Т-клетки влияет на общую экспрессию генов, может дать дополнительное представление о том, как функционируют отдельные соединения для разобщения пролиферации и дифференцировки во время размножения *in vitro*.

[351] Это исследование направлено на изучение и выявление транскриптомных различий в популяциях Т-клеток, обработанных низкомолекулярными модуляторами (идентифицированными в Примере 1 и Примере 2), которые разобщают пролиферацию и дифференцировку во время размножения *in vitro*.

Методы

[352] Наивные спленоциты OT-1 стимулировали *in vitro* пептидом OVA257-264 (500 нМ) и IL-2 (60 МЕ/мл) в присутствии или в отсутствие добавленного соединения (необработанные (U), GlcNAc (GN) и Neu5Ac (SA)) в течение 3 дней при плотности 1 миллион/мл (100 мкл/лунку в 96-луночной планшете), затем размножали в культуральной среде, содержащей 60 МЕ/мл IL-2, в течение 4 дней в присутствии добавленного соединения или без него. На день 7 удаляли мертвые клетки, собирали 80000 живых клеток для экстракции РНК и подвергали анализу последовательности общей РНК. Схема секвенирования РНК включала три образца для каждой обработки (необработанный, обработанный GlcNAc и обработанный Neu5Ac). Парный DEG-анализ выполняли с использованием DESeq2. Полный анализ экспрессии генов проводили с помощью графика PCA только для образца, двойного графика PCA и тепловой карты иерархической кластеризации главных генов по дисперсии между образцами.

Результаты

[353] PCA выявил, что образцы в группах обработки (необработанные, обработанные GlcNAc и обработанные Neu5Ac Т-клетки) характеризовались сходной кластеризацией дифференциальной экспрессии генов. Отдельные обработки имели ограниченную вариабельность между образцами, и каждая обработка приводила к уникальной и различимой дифференциальной экспрессии генов среди главных дифференциально регулируемых генов. Вторичный анализ PCA выявил, что как клетки, обработанные GlcNAc, так и клетки, обработанные Neu5Ac, имели определенную степень перекрытия, при этом дифференциально регулируемые гены были затронуты сходным образом по сравнению с необработанными клетками, это позволяет предположить, что воздействие

этих соединений модулирует экспрессию генов Т-клеток сходным образом. Различные соединения, которые идентифицированы как разобщающие пролиферацию и дифференцировку Т-клеток, характеризуются сходной экспрессией дифференциально регулируемых генов по сравнению с необработанными Т-клетками. Профиль экспрессии 100 главных дифференциально регулируемых генов показывает сходный профиль экспрессии при воздействии GlcNAc и Neu5Ac по сравнению с клетками, не подвергавшимися воздействию ни одного из соединений.

[354] Кроме того, эти гены, вероятно, играют роль в разобщении пролиферации и дифференцировки. Таким образом, модуляция одного или более из генов Cd24a, Igfbp7, Tcf7, Igfbp4, Adcy5, Nt5e, Hck, Lif, Apol9b, Gm4951, ligp1, Gzmk, Serpina3f, Nt5dc2, Maged1, Bmf, Cacnb3, Fut4, Egr1, Slc6a12, Fbxo2, Egr2, Fos, Plxnb2, Marcksl1, Ikzf2, Filip1l, Trerf1, Stard10, Pls1, Gm13546, Ccr7, Igha, Itgae, Hic1, Klrl1, Als2cl, Tanc2, Slco4a1, Piwil4, Slc25a23, Itga4, Ckb, Actn1, Sema7a, Gm24187, Mir6236, H4c12, Gzmc, Prf1, Csf1, Gzmd, Tspan32, Atp6v0a1, Map6, Lmna, Rxra, Gpr141, Gm20559, Adam8, Anxa1, Stc2, Fosl2, Akr1c13, Cdkn2a, Crmp1, Tnfrsf21, Kctd12, Ccr2, Samd9l, Sytl2, Ccr5, Tnfrsf9, Mme, Asns, Eomes, Oas3, Ly6a2, Ifi204, Ifit1, Cdh1, Ifit3, Isg15, Rtp4, Mx1, Oasl2, Rpl12, Rrp1, Rrp1b, Rrp12, Rrp15, mt.Rnr2, CT010467.2, Gm23935, Ct010467.1 и Lars2, как ожидается, повлияет на разобщение дифференцировки и пролиферации Т-клеток.

Обсуждение

[355] Это исследование демонстрирует, что применение сахаров, и вероятно, или других соединений (обнаруженных с применением способов скрининга, использованных в Примере 1 и Примере 2) во время размножения *in vitro* приводит к дифференциальной регуляции конкретных генов и путей по сравнению с необработанными клетками и является важным для разобщения дифференцировки и пролиферации.

Пример 6: Сахара увеличивают число TCF-1⁺ клеток во время *in vitro* размножения CD8⁺ TSA-реактивных CD8⁺ TIL

Уровень техники

[356] Взаимодействия между клетками необходимы для многочисленных биологических процессов, включая иммунные ответы. Для лучшего понимания этих биологических процессов исследователям требуется методика мониторинга динамики взаимодействий между клетками. На сегодняшний день существуют ограниченные способы мониторинга взаимодействия между клетками *in vitro* и *in vivo*. Как наиболее распространенный подход клеточной инженерии, генная инженерия ограничена техническими сложностями и проблемами безопасности, такими как устойчивость первичных клеток к вирусной трансдукции, гетерогенные уровни экспрессии и возможность эндогенного разрушения

генов. Инженерия клеточных поверхностей «извне» с использованием инструментов химии и биологии стала дополнительным и общеприменимым подходом для решения этих проблем.

[357] Это исследование направлено на оценку способа функционализации клеточной поверхности с помощью ферментов, редактирующих гликаны. Данная функционализированная ферментом клетка будет служить в качестве «детектора» для переноса зонда (например, биотина, меток, флуоресцентных молекул) к соседним клеткам способом, который зависит от взаимодействия. Данная методика предназначена для применения для идентификации Т-клеток, специфичных в отношении антигена. Кроме того, после идентификации Т-клеток, специфичных в отношении антигена, клетки подвергают размножению с применением сахаров (соединений, обнаруженных в Примере 1 и Примере 2) и оценивают эффективность при терапии на основе адоптивного переноса клеток.

Методы

[358] Чтобы проверить влияние сахаров во время размножения инфильтрирующих опухоль Т-клеток *in vitro*, опухоли механически диссоциировали с получением суспензии отдельных клеток, и TSA-реактивные CD8⁺ инфильтрирующие опухоль Т-клетки выделяли из опухолей MC38 или B16-OVA с помощью FusoID (ФИГ. 6,А) или окрашивали тетрамером H-2Kb-SIINFELK, соответственно, и затем размножали с использованием протокола быстрого размножения в присутствии аллогенных (BALB/cByJ) спленоцитов в качестве фидерных клеток (фидерная клетка:Т-клетка = 100:1) с 0,5 нг/мл антитела к CD3 и 1500 МЕ/мл IL-2. Сахара добавляли в начале или во время размножения TIL и поддерживали до конца размножения. На день 9 размножения оценивали фенотипы размноженных Т-клеток и использовали клетки для адоптивного переноса (ФИГ. 6,Е). Для адоптивного переноса 0,5 миллиона клеток (B16-OVA или MC38) инокулировали подкожно каждой мыши в день 0, инфицировали *Listeria monocytogenes*-OVA (LM-OVA) при 0,5 миллиона КОЕ/мышь на день 1 и анализ крови регистрировали на день 7.

Результаты

[359] Как и в случае P14 и OT-I CD8⁺ Т-клеток наблюдали увеличение популяции Tim3⁻ TCF-1⁺ в CD8⁺ TIL, размноженных с применением нескольких добавленных сахаров (ФИГ. 6,В), в MC38 TIL после размножения.

[360] В соответствии с увеличением экспрессии TCF-1 наблюдали значительное снижение KLRG1, Tim3 и PD-1, а также увеличение CD27, это указывает на то, что TIL, обработанные сахаром, сохраняли менее дифференцированный прогениторный

истощенный фенотип во время размножения (ФИГ. 6,C). Кроме того, после обработки сахарозой, GlcNAc и Neu5Ac наблюдали значительное увеличение окрашивания CLA (антиген лимфоцитов, ассоциированных с кожей) на поверхности клетки (ФИГ. 6,D). Поскольку CLA является рецептором хоуминга кожных лимфоцитов для лектина эндотелиальной клетки сосудов-молекулы адгезии лейкоцитов 1, повышенный уровень CLA может способствовать инфильтрации опухоли адоптивно перенесенными Т-клетками для повышения эффективности лечения опухоли. При использовании для адоптивного переноса OVA-специфичные TIL, выделенные из опухолей B16-OVA, размноженные в присутствии сахарозы, характеризовались более высокой активностью контроля опухоли (ФИГ. 6,F). Когда эти размноженные клетки переносили наивным мышам с последующей стимуляцией LM-OVA (ФИГ. 6,G), они показали лучшую пролиферацию по сравнению с Т-клетками, размноженными без дополнительно добавленных сахаров.

Обсуждение

[361] Это исследование демонстрирует, что отобранные соединения можно применять для улучшения адгезии, хоуминга и приживания адоптивно перенесенных клеток, которые были идентифицированы и обогащены путем мониторинга межклеточных взаимодействий с использованием метода FusoID. FusoID также можно применять для идентификации и обогащения антиген-специфичных цитотоксических или регуляторных Т-клеток из селезенки мыши, опухоли человека, дренирующей опухоль лимфатического узла и периферической крови. Дополнительные сахара можно применять во время размножения *in vitro* указанных специфичных регуляторных Т-клеток для повышения эффективности видов терапии на основе адоптивного переноса Т-клеток.

Пример 7: Скрининг низкомолекулярных модуляторов, которые могут увеличивать число TCF-1⁺ клеток во время размножения Т-клеток человека *in vitro*

Уровень техники

[362] Размножение прогениторных истощенных Т-клеток (Tim3⁺TCF-1⁺ CD8⁺) с применением сахаров (соединения, обнаруженные в Примере 1 и Примере 2) приводит к повышенному размножению *in vivo* у мышей (показано в Примере 3), что, следовательно, приводит к значительно лучшей способности к подавлению роста опухоли *in vivo* по сравнению с Т-клетками, не обработанными сахарами (показано в Примере 4).

[363] Чтобы оценить, имели ли эти сахара подобный эффект сохранения менее дифференцированного статуса Т-клеток у человека, это исследование направлено на оценку отобранных сахаров во время размножения Т-клеток периферической крови человека.

Методы

[364] МКПК человека выделяли из цельной крови с использованием центрифугирования в градиенте Ficoll. Моноциты удаляли с помощью адгезии. Неадгезивные клетки высевали при 1 миллион/мл с добавлением Dynabeads против CD3/CD28 человека в соотношении 1:1 и IL-2 при 300 МЕ/мл. Клетки стимулировали в течение 3 дней, и Dynabeads удаляли после стимуляции. Затем клетки размножали, поддерживая концентрацию от 0,5 до 2 миллионов/мл. Вторичная стимуляция может быть выполнена в период с 7 по 20 день. Соединения (сахара) добавляли либо в начале первоначальной стимуляции, либо в начале вторичной активации. Клетки в разные моменты времени окрашивали и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Результаты

[365] Оценка TCF-1⁺ популяции размноженных периферических CD8⁺ Т-клеток человека показала, что несколько сахаров были способны повышать экспрессию TCF-1 в Т-клетках человека во время первичной активации и размножения. Сахароза и трегалоза увеличивали популяцию TCF-1⁺ в размноженных CD8 периферической крови человека с 10% до 20~50%.

[366] Подробный анализ различных популяций в CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках выявил, что обработка сахаром изменяла компоненты общей популяции Т-клеток. Популяции наивных клеток (T_N, CCR7+CD45RA⁺) и клеток центральной памяти (T_{CM}, CCR7+CD45RA⁻) увеличивались в группах, обработанных сахаром, в то время как популяция терминально дифференцированных эффекторов (T_{EMRA}, CCR7-CD45RA⁺) уменьшалась. Величина этого эффекта зависит от исходного фенотипа Т-клеток донорских МКПК, и он наблюдался у некоторых, но не у всех доноров.

[367] Обнаружили, что сахара, добавленные во время вторичной активации Т-клеток человека или размножения выделенных Т-клеток человека, инфильтрирующих опухоль, уменьшают истощение и поддерживают экспрессию TCF-1. Анализ методом проточной цитометрии TCF-1 и CCR7 или Tim3 показал, что обработка Т-клеток сахарозой, фруктозой, NeuAc или GlcNAc может увеличить процент TCF-1⁺CCR7⁺ и TCF-1⁺Tim3⁻ CD8⁺ и CD4⁺ популяции в 1,5 ~ 2 раза по сравнению с необработанной группой.

Обсуждение

[368] Это исследование демонстрирует, что применение сахаров во время размножения Т-клеток человека *in vitro* приводит к сохранению менее дифференцированного статуса Т-клеток. В совокупности, в Примерах 1-7 представлены доказательства, подтверждающие, что способы скрининга, описанные в настоящем документе, можно применять для идентификации соединений, которые разобщают размножение и пролиферацию Т-клеток, и что эти соединения можно применять для размножения Т-клеток с поддержанием

стволовости для лечения с использованием разных видов адаптивной клеточной терапии. Кроме того, идентифицированные соединения можно также применять для размножения человеческих CAR- или TCR-экспрессирующих Т-клеток, инфильтрирующих опухоль Т-клеток или Т-клеток дренирующих лимфатических узлов для сохранения их прогениторного истощенного или менее дифференцированного фенотипа.

Пример 8: Скрининг низкомолекулярных модуляторов, которые могут увеличивать число TCF-1⁺ клеток во время размножения Т-клеток человека *in vitro*

[369] Мы также протестировали две малые молекулы (KCl и p38i), о которых сообщалось в статьях. (*Science* 2019, 363, (6434); *Cancer Cell* 2020, 37, (6), 818-833 e9). K⁺ увеличивал соотношение Tim3⁺TCF-1⁺ OT-1 клеток и незначительно ингибировал пролиферацию OT-1 клеток. p38i не вызывал изменений ни пролиферации, ни соотношения Tim3⁺TCF-1⁺ OT-1 клеток.

Таблица 3: Пролиферация и соотношение Tim3⁺TCF-1⁺ OT-1 клеток, обработанных K⁺ или p38iC

День7	Без обработки	K ⁺ (40 мМ)	p38i (500 нМ)
Кратность пролиферации, нормированная к условию без обработки	1,00	0,87	1,19
Соотношение Tim3 ⁺ TCF-1 ⁺ CD8 ⁺ Т-клеток (%)	9,5	80,7	10,0

Пример 9: Сахара повышают пролиферацию CAR-Т-клеток

[370] Истощение Т-клеток все чаще считают причиной дисфункции Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), это привело к предположению, что поддержание стволовости CAR Т-клеток может улучшить ответ *in vivo*. Например, у CAR Т-клеток, включающих дисialogанглиозид (GD2)-специфичный 14g2a scFv, сигнальные домены CD3ζ и CD28 (GD2-28z), развиваются выраженные признаки истощения, включая снижение размножения в культуре, повышенную экспрессию ингибирующих рецепторов во время культивирования *in vitro* до адаптивного переноса, в результате кластеризации рецепторов и тонической передачи сигналов, вызванных самовзаимодействием scFv антиген-независимым путем (см., например, Weber et al., *Science* 372(6537):eaba1786, 2021; и Long et al., *Nat. Med.* 21(6):581-90, 2015). В настоящей заявке авторы сконструировали HA-28z CAR Т-клетки (ФИГ. 7,А) и культивировали отсортированные CD8⁺ или CD4⁺ CAR Т-клетки с сахарами (N-ацетилглюкозамин,

GlcNAc 60 mM или N-ацетилнейраминовая кислота, Neu5Ac 50 mM) в течение 14 дней. Как CD8⁺ (ФИГ. 7,B), так и CD4⁺ (ФИГ. 7,C) CAR T-клетки, обработанные Neu5Ac, пролиферировали в 1,5-2 раза быстрее, чем клетки, размноженные без сахаров в обычной T-клеточной среде, и показали увеличение числа прогениторных истощенных T-клеток (Tim-3⁺TCF-1⁺), и сопутствующее снижение экспрессии ингибирующих рецепторов (например, PD-1, Tim-3) (ФИГ. 7,D-E).

Пример 10: Влияние малой молекулы на образование и размножение эффекторных T-клеток

[371] Как подробно описано ниже, авторы наблюдали, что низкомолекулярное соединение облегчает образование подобных прогениторным CD8⁺ T-клеток (Трех, Tim-3⁺, TCF-1⁺), без ущерба для роста клеток во время размножения *in vitro*. Структура и некоторые виды биологической активности этого соединения, ингибитора K-Ras(G12C) 12, известны в данной области техники. См., например, Ostrem et al., Nature 503:548-51, 2013. Авторы решили оценить, способен ли ингибитор K-Ras(G12C) 12 модулировать свойства T-клеток *in vitro*. Сначала авторы проанализировали фенотипы ОТ-I CD8⁺ T-клеток, которые экспрессируют трансгенный TCR, специфичный в отношении пептида SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), презентированного на ГКГС-I. Спленоциты ОТ-I выделяли у мышей, трансгенных по ОТ-I TCR, праймировали однократным введением 500 мкМ пептида SIINFEKL в день 0 для индукции активации, культивировали в среде, содержащей 60 МЕ/мл интерлейкина-2 (IL2) для индукции пролиферации, и обрабатывали ингибитором K-Ras(G12C) 12 с концентрацией 5 мкМ (Selleckchem, Хьюстон, Техас, США) или без него. В концентрации 5 мкМ ингибитор K-Ras(G12C) 12 не ухудшает размножение клеток.

[372] Истощение CD8⁺ T-клеток характеризовалось положительной регуляцией ингибирующих рецепторов PD-1 и Tim-3, в то время как фенотипы, подобные прогениторным, характеризовались положительной регуляцией транскрипционного фактора TCF-1 и отрицательной регуляцией Tim-3. На 5 день 23,8% необработанных CD8⁺ ОТ-I T-клеток были терминально истощены (PD-1⁺, Tim-3⁺), и 38,6% характеризовались фенотипом, подобным прогениторному (Tim-3⁺, TCF-1⁺). Напротив, на день 5 анализа примерно 0,46% CD8⁺ ОТ-I T-клеток, обработанных ингибитором K-Ras(G12C) 12, были терминально истощены (PD-1⁺, Tim-3⁺), и 91,6% продемонстрировали фенотип, подобный прогениторному (Tim-3⁺, TCF-1⁺).

[373] Кроме того, авторы наблюдали, что ингибитор K-Ras(G12C) 12 предотвращает образование терминально истощенных (PD-1⁺, Tim-3⁺) антиген-специфичных CD8⁺ инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) и облегчает продуцирование подобных

прогениторным (Трех, Tim-3⁻, TCF-1⁺) антиген-специфичных CD8⁺ TIL во время размножения *in vitro*. В частности, чтобы выяснить способность ингибитора K-Ras(G12C) 12 модулировать свойства инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) *in vitro*, авторы использовали модель рака толстой кишки MC38 на мышах. Мышам C57BL/6J (B6) инокулировали клетки MC38. Опухоли выращивали в течение 14 дней, а затем собирали. Выделяли антиген-специфичные (H-2K^b-рестриктивные MuLV p15E₆₀₄₋₆₁₁-специфичные, в дальнейшем тетрамер M8⁺) CD8⁺ TIL. Тетрамер M8⁺ CD8⁺ TIL подвергали быстрому размножению. На день 1 быстрого размножения к TIL добавляли облученные спленоциты BALB/c в соотношении 1:100 и инкубировали с 1500 МЕ/мл IL2 для пролиферации, 0,5 мг/мл антитела к CD3 (мыши) для активации и с ингибитором K-Ras(G12C) 12 (5мкМ) или без него.

[374] Кроме того, тетрамер M8⁺ CD8⁺ TIL, обработанные ингибитором K-Ras(G12C) 12 (5 мкМ), характеризуются меньшим размножением клеток ($0,397 \times 10^6$ TIL) по сравнению с необработанным контролем ($1,18 \times 10^6$ TIL) (ФИГ. 8,А). Однако ингибитор K-Ras(G12C) 12 (5 мкМ) эффективно предотвращал образование терминально истощенных (PD-1⁺ Tim-3⁺) тетрамер M8⁺ CD8⁺ TIL посредством быстрого размножения. На день 8 после быстрого размножения 79,4% необработанных CD8⁺ клеток демонстрировали терминально истощенный фенотип, в то время как только 29,2% CD8⁺ клеток, обработанных ингибитором K-Ras(G12C) 12 (5 мкМ), демонстрировали терминально истощенный фенотип (ФИГ. 8,В). Кроме того, ингибитор K-Ras(G12C) 12 (5мкМ) поддерживает и значительно положительно регулирует подобные прогениторным (Tim-3⁻, TCF-1⁺) тетрамер M8⁺ CD8⁺ TIL посредством быстрого размножения. После размножения 0,076% необработанных CD8⁺ клеток демонстрировали фенотип, подобный прогениторному, в то время как 12,8% CD8⁺ клеток, обработанных ингибитором K-Ras(G12C) 12 (5 мкМ), демонстрировали фенотип, подобный прогениторному (ФИГ. 8,С).

[375] Дальнейшие исследования показывают, что ингибитор K-Ras(G12C) 12 облегчает образование подобных прогениторным (TCF-1⁺ Tim-3⁻) CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) человека без ухудшения роста клеток во время размножения *in vitro*. МКПК охватывают гетерогенную популяцию клеток с частотами клеток, которые варьируются у разных индивидуумов. Кроме того, фенотипические соотношения подтипов МКПК (т.е., наивные по сравнению с Т-клетками памяти, экспрессия TCF-1 и т. д.) значительно различаются между индивидуумами и связаны с множеством факторов окружающей среды. Это подчеркивает важность сравнения активности ингибитора K-Ras(G12C) 12 у нескольких различных доноров. В

частности, авторы сравнили размножение клеток и фенотипическую модуляцию у двух разных доноров; в дальнейшем «донор 3» и «донор 4».

[376] Донорские клетки чМКПК совместно культивировали в соотношении 1:1 с облученной (50 Гр) смесью чМКПК от пяти различных доноров (далее «фидерные клетки»). Облучение останавливает деление клеток, однако эти фидерные клетки сохраняют способность обеспечивать внеклеточную секрецию, чтобы помочь донорским клеткам пролиферировать. Передача сигналов с участием цитокинов и несовпадение HLA обеспечивает надежную активацию донорских чМКПК. Донорские чМКПК активировали дважды с использованием облученной смеси фидерных клеток, сначала в день 0, а затем аналогичным образом на день 6 (ФИГ. 9,А). Начиная со дня 0, донорские чМКПК непрерывно культивировали с 300 МЕ/мл IL2 и с ингибитором K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ) или без него (ФИГ. 9,А). Обработанные ингибитором K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ) чМКПК от обоих доноров не испытывают статистически значимого ухудшения среднего показателя размножения клеток (ФИГ. 9,В).

[377] На день 13 иммунофенотипический анализ показал, что 3,52% необработанных CD8⁺ чМКПК донора 3 и 5,01% необработанных CD8⁺ чМКПК донора 4 были терминально истощены (PD-1⁺, Tim-3⁺), соответственно. Напротив, 2,6% CD8⁺ чМКПК донора 3, обработанных ингибитором K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ), и 3,27% CD8⁺ чМКПК донора 4, обработанных ингибитором K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ), были терминально истощены (PD-1⁺, Tim-3⁺), соответственно (ФИГ. 9,С). Ингибитор K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ) также положительно регулировал фенотипы, подобные прогениторным (Tim-3⁻, TCF-1⁺), CD8⁺ чМКПК как донора 3, так и донора 4. На день 13 15,9% необработанных CD8⁺ чМКПК донора 3 демонстрировали характеристики фенотипа, подобного прогениторному, в то время как 51,5% обработанных K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ) CD8⁺ чМКПК донора 3 демонстрировали фенотип, подобный прогениторному. Кроме того, 6,78% необработанных CD8⁺ чМКПК донора 4 показали фенотип, подобный прогениторному, в то время как 39,7% CD8⁺ чМКПК донора 4, обработанных ингибитором K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ), показали фенотип, подобный прогениторному (ФИГ. 9,Д).

[378] Кроме того, обработка ингибитором K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ) давала менее дифференцированные подобные стволовым CD8⁺ Т-клетки памяти (T_{SCM}, CCR7⁺, CD45RA⁺) и отрицательно регулировала CD8⁺ терминально дифференцированные клетки эффекторной памяти, повторно экспрессирующие CD45RA (T_{EMRA}, CCR7⁻, CD45RA⁺), в CD8⁺ чМКПК как донора 3, так и донора 4 (ФИГ. 9,Е).

[379] Также было обнаружено, что, помимо CD8⁺ Т-клеток, ингибитор K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ) обладает подобными модулирующими свойствами *in vitro* в отношении CD4⁺ чМКПК от обоих доноров. На день 13 15,7% необработанных CD4⁺ чМКПК донора 3 и 14,7% необработанных CD4⁺ чМКПК донора 4 были терминально истощены (PD-1⁺, Tim-3⁺), соответственно. В чМКПК, обработанных ингибитором K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ), 0,83% CD4⁺ чМКПК донора 3 и 7,9% CD4⁺ чМКПК донора 4 были терминально истощены на день 13, соответственно. Аналогично результатам, представленным ранее с CD8⁺ чМКПК от обоих доноров, ингибитор K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ) облегчал образование фенотипов, подобных прогениторному (Tim-3⁻, TCF-1⁺), в CD4⁺ чМКПК как донора 3, так и донора 4. На день 13 33,3% необработанных CD4⁺ чМКПК донора 3 и 53,3% необработанных CD4⁺ чМКПК донора 4 продемонстрировали фенотип, подобный прогениторному, соответственно. В отличие от этого, 78,4% CD4⁺ чМКПК донора 3, обработанных ингибитором K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ), и 78,7% CD4⁺ чМКПК донора 4, обработанных ингибитором K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ), характеризовались фенотипом, подобным прогениторному. Наконец, ингибитор K-Ras(G12C) 12 (2 мкМ) положительно регулировал менее дифференцированные подобные стволовым CD4⁺ Т-клетки памяти (T_{SCM}, CCR7⁺, CD45RA⁺) и отрицательно регулировал терминально дифференцированные клетки эффекторной памяти, повторно экспрессирующие CD45RA (T_{EMRA}, CCR7⁻, CD45RA⁺), в CD4⁺ чМКПК донора 3 или высокодифференцированные CD4⁺ Т-клетки эффекторной памяти (T_{EM}, CCR7⁻, CD45RA⁻) в CD4⁺ чМКПК донора 4.

[380] Поскольку здоровые Т-клетки не экспрессируют K-Ras(G12C), вполне вероятно, что ингибитор K-Ras(G12C) 12 индуцирует фенотипическую модуляцию в популяциях Т-клеток посредством нецелевого связывания. Чтобы подтвердить это, авторы использовали ранее описанную культуральную модель ОТ-I для тестирования двух высокоспецифичных ингибиторов K-Ras (G12C) – соторасиба и MRTX849 – в различных концентрациях в сравнении с 5 мкМ ингибитора K-Ras(G12C) 12. Результаты свидетельствуют о том, что, хотя ингибитор K-Ras(G12C) 12 эффективно стимулировал образование подобных прогениторным Т-клеток, высокоспецифичные ингибиторы мутанта K-Ras (G12C) не проявляли активности в модуляции CD8⁺ ОТ-I TCR-трансгенных Т-клеток во время размножения *in vitro*. В частности, было обнаружено, что на день 5 анализа среднего показателя размножения клеток высокоспецифичные ингибиторы мутанта K-Ras не показали положительного эффекта в увеличении пролиферации клеток примерно с тем же результатом, что и в необработанном контроле при всех протестированных концентрациях. Кроме того, высокоспецифичные ингибиторы мутанта K-Ras не были эффективны в отрицательной регуляции терминально истощенных (PD-1⁺, Tim-3⁺) CD8⁺

OT-I T-клеток или положительной регуляции подобных прогениторным (Tim-3⁺, TCF-1⁺) CD8⁺ OT-I T-клеток. Результаты этого исследования дополнительно подтвердили, что ингибитор K-Ras(G12C) 12 модулирует свойства T-клеток посредством нецелевого связывания.

Пример 11: Ингибитор EZH2, таземетостат, стимулирует размножение и противоопухолевую активность T-клеток, подобных прогениторным

[381] Введение:

[382] Виды иммунотерапии рака на основе адаптивной клеточной терапии (ACT) индуцировали значительные клинические ответы у пациентов с метастатическим раком. Однако долговременные ответы ограничены подгруппой индивидуумов. Кроме того, редко сообщается о воспроизводимой эффективности против солидных опухолей (pmid: 25319501, pmid: 31501612). Происходящее истощение T-клеток и функциональное повреждение клеток, используемых для ACT, представляют собой два основных препятствия, которые ограничивают успешное применение ACT для лечения солидных опухолей. Во время хронических инфекций и рака постоянное воздействие антигена приводит к истощению T-клеток, проявление которого включает прогрессирующую и иерархическую потерю эффекторных функций, устойчивую положительную регуляцию и совместную экспрессию нескольких ингибирующих рецепторов, измененную экспрессию и использование ключевых факторов транскрипции, метаболические нарушения и неспособность перейти в состояние покоя и приобрести антиген-независимую гомеостатическую чувствительность T-клеток памяти. Аналогичным образом, во время режимов размножения *in vitro*, используемых для выращивания небольшой доли реактивных T-клеток в больших количествах для инфузии пациенту, T-клетки часто доводятся до истощения. Следовательно, потенциал репликации после переноса очень ограничен или отсутствует.

[383] Недавние исследования выявили, что существуют две различные популяции истощенных T-клеток: прогениторные истощенные T-клетки, которые обладают свойствами, подобными свойствам стволовых клеток, и дают начало терминально истощенным CD8⁺ T-клеткам (Tex-term), которые обладают цитотоксическими функциями. Прогениторные истощенные TIL могут отвечать на терапию антителом к PD-1, а терминально истощенные TIL не могут. Активация и дифференцировка T-клеток сопровождаются эпигенетическими изменениями, которые включают или выключают гены и определяют, какие белки транскрибируются. Такие изменения, в свою очередь, играют ключевую роль в определении судьбы и функции T-клеток. Метилирование ДНК и

посттрансляционные модификации гистонов представляют собой два основных эпигенетических механизма (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31813765/>).

[384] Предыдущие исследования с использованием моделей острой вирусной инфекции показали, что дефицит *Ezh2* приводил к нарушению программы CD8 эффекторов без периодического образования клеток памяти. Анализ мишеней *Ezh2*, экспрессия которого снижалась во время дифференцировки эффекторных клеток, но не во время дифференцировки клеток памяти, выявил, что многие гены кодируют продукты, которые были связаны с дифференцировкой клеток памяти, но не с дифференцировкой эффекторных клеток (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28218746/>). Эти мишени *Ezh2* включали гены, кодирующие факторы транскрипции, связанные с памятью, такие как *Tcf7* и *Eomes*; молекулы, которые опосредуют передачу сигналов TGF, такие как *Smad2*, продукт которого связан с CD8⁺, молекулы, которые контролируют выживание и хоуминг Т-клеток, такие как *Klf2*; а также *Oral*, который кодирует регулятор слияния митохондрий, играющий решающую роль в дифференцировке CD8⁺ Т-лимфоцитов памяти. Хотя роль EZH2 в установлении эпигенетического состояния истощенных Т-клеток еще предстоит исследовать, многие гены, высоко экспрессируемые в прогениторных истощенных Т-клетках, перекрываются с вышеупомянутыми мишенями EZH2, которые связаны с дифференцировкой клеток памяти, но не с дифференцировкой эффекторных клеток. Кроме того, многие гены, связанные с обратимым состоянием истощения, также связаны с пролиферацией (в частности, TCF-1, MYC, NF-κB и гены, обеспечивающие гликолиз). Эти наблюдения свидетельствуют о том, что временное ингибирование EZH2 на ранней стадии дифференцировки Т-клеток в направлении истощения может способствовать образованию прогениторных истощенных Т-клеток с «стволоподобными» свойствами, которые весьма желательны для иммунотерапии рака в условиях блокады иммунной контрольной точки и АСТ.

[385] Как подробно описано ниже, авторы обнаружили, что культивирование CD8 Т-клеток *in vitro* с Taz ингибировало образование H3K27Me3 и продуцировало Т-клетки со свойствами, подобными таковым прогениторных клеток/клеток памяти, без ущерба для пролиферации клеток. Обработка Т-клеток Taz ограничивает ингибирование EZH2 размножением *in vitro*, что позволяет избежать любой долгосрочной функциональной потери EZH2 после адоптивного переноса. При адоптивном переносе, в отсутствие Taz, активность EZH2 будет восстановлена, что позволит перенесенным Т-клеткам дифференцироваться в клетки с функциями, подобными таковым эффекторов, для лучшего контроля опухоли.

[386] Результаты:

[387] *Временное ингибирование EZH2 с помощью Taz стимулирует подобные прогениторным признаки Т-клеток без ущерба для размножения клеток:* Чтобы определить, может ли временное ингибирование EZH2 с помощью Taz стимулировать про-признаки памяти или подобные прогениторным признаки Т-клеток, авторы разработали аналитическую платформу для анализа фенотипов размноженных *in vitro* ОТ-I CD8 Т-клеток, которые экспрессируют трансгенный TCR, специфичный в отношении пептида SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) куриного овальбумина, презентируемого на ГКГС-I. В этом анализе ОТ-I спленоциты праймировали высокими концентрациями пептида OVA₂₅₇₋₂₆₄ (500 нМ), что привело к выраженному истощению Т-клеток ко дню 7, что подтверждается положительной регуляцией PD-1 и Tim-3. В этот момент времени 58,9% ОТ-I Т-клеток были терминально истощены (Tim3⁺TCF-1⁻), и 8,47% характеризовались истощенным прогениторным фенотипом (Tim3⁻TCF-1⁺) (ФИГ. 10,А-В). Сначала авторы оценивали влияние Taz на пролиферацию Т-клеток путем добавления Taz в различные моменты времени после активации Т-клеток. Когда Taz добавляли в культуру в день 0 вместе с пептидом OVA₂₅₇₋₂₆₄, было обнаружено, что все клетки погибли. Напротив, добавление Taz на день 3 и поддержание его в одинаковой концентрации во время культивирования *in vitro* не приводило к ингибированию размножения клеток (ФИГ. 10,С). Приблизительно через 24 часа после добавления Taz детектировали заметную отрицательную регуляцию H3K27Me3. И к 48 часам образование H3K27Me3 было почти полностью подавлено (ФИГ. 10,Д). На день 7 размножения Т-клеток обнаружили, что Т-клетки, обработанные Taz (3-7), имеют 2,5-3,5-кратное увеличение числа истощенных прогениторных клеток на 27,7% (Tim3⁻TCF-1⁻) (ФИГ. 10,А-В).

[388] *Временное ингибирование EZH2 улучшает пролиферацию *in vivo* и вторичный иммунный ответ перенесенных Т-клеток:* Чтобы определить долговременные функциональные эффекты Taz на функцию Т-клеток после переноса *in vivo*, авторы оценивали гомеостаз *in vivo* и вторичный иммунный ответ ОТ-I Т-клеток, культивированных с Taz. Клетки ОТ-II культивировали с Taz в течение 4 дней после активации. На день 7 после удаления Taz из Т-клеток авторы перенесли эквивалентное число обработанных Taz и необработанных клеток ОТ-I (CD45.2^{+/+}) мышам C57BL/6 с врожденной меткой (CD45.1^{+/+} или CD45.1^{+/-}) (ФИГ. 11,А). Чтобы оценить гомеостаз ОТ-I клеток, этих мышей инфицировали LM-OVA (10⁴ КОЕ/мышь) на день 30 после адоптивного переноса клеток. После инфекции LM-OVA ОТ-I CD8 Т-клетки, обработанные Taz во время размножения *in vitro*, показали более сильный ответ, о чем свидетельствует большее число ОТ-I клеток, обнаруженных в крови (ФИГ. 11,В-С) и селезенке (ФИГ. 11,Д). Следовательно, временное ингибирование EZH2 *in vitro* ОТ-I

клеток может обеспечить лучший гомеостаз и вторичный иммунный ответ при первичной инфекции LM-OVA *in vivo*.

[389] *Временное ингибирование EZH2 повышает противоопухолевую эффективность перенесенных Т-клеток в модели АСТ на мышах:* Чтобы определить способности Т-клеток, обработанных Taz, для лечения солидных опухолей *in vivo*, авторы вводили путем внутривенной инфузии необработанные и ОТ-I Т-клетки, которые были размножены с Taz, мышам C57BL/6, несущим установленные опухоли B16-OVA (ФИГ. 12,А), с последующим введением антитела к PD-1 на день 14 и день 21. В контрольных группах мышам вводили только ФСБ. Хотя лечение ОТ-I (размноженными без Taz) или лечение антителом к PD-1 и ОТ-I (размноженными без Taz) показало лишь умеренный контроль опухоли, лечение ОТ-I (размноженными с Taz) значительно замедлило рост опухоли, при этом медианный размер опухоли составлял только 1/8 от размера опухоли, обработанной ОТ-I (размноженными без Taz) (день лечения 20) (ФИГ. 12,В). Еще лучший контроль опухоли был достигнут при использовании комбинации антитела к PD-1 и ОТ-I (размноженных с Taz) (ФИГ. 12,В). Более того, в то время как ни одна мышь в любой контрольной группе не выжила до 24 дня, >80% мышей, получавших ОТ-I (размноженные с Taz), были еще живы ко дню 30 (ФИГ. 12,С). Эти результаты показали, что по сравнению с необработанными ОТ-I клетками клетки, размноженные с Taz, обладают заметно более высокой активностью контроля роста опухоли *in vivo*. Эти клетки, предварительно обработанные Taz, состоят из более высокой доли прогениторных истощенных CD8⁺ Т-клеток, подобных стволовым клеткам, эффекторные функции которых успешно высвобождаются при блокаде PD-1.

[390] *Временное ингибирование EZH2 увеличивает число подобных прогениторным клеток в МКПК человека и CAR-T-клетках:* Для оценки временного ингибирования EZH2 на Т-клетках человека авторы активировали мононуклеарные клетки периферической крови человека (чМКПК) смесью облученных (50 Гр) чМКПК от других пяти доноров, не совпадающих по HLA (ФИГ. 13,А). После активации в течение 3 дней клетки чМКПК размножали в течение 3 дней с Taz (1 мкМ). Taz также поддерживали в той же концентрации для второй активации и размножения до дня 13 после 1^й активации (ФИГ. 13,А). На день 13 по сравнению с чМКПК, размноженными в обычной Т-клеточной среде, чМКПК, культивированные с Taz, показали большее число клеток с фенотипом, подобным прогениторному (ФИГ. 13,В и Е), признаки, подобные таковым стволовых клеток памяти и клеток эффекторной памяти (ФИГ. 13,С и F) без ухудшения пролиферации (ФИГ. 13,Д и G) как для донора А, так и для донора В. Эти Taz-

обработанные чМКПК также характеризовались более высокой продукцией цитокинов после активации (ФИГ. 13,Е и Н).

[391] Недавнее исследование, проведенное Mackall и его коллегами, показало, что временный отдых может восстановить функциональность истощенных CAR-T-клеток (ссылка: *Science*, **2021**, 372 (6537), 49, DOI: 10.1126/science.aba1786). Чтобы изучить, может ли временное ингибирование EZH2 во время размножения CAR-T-клеток путем обработки клеток Taz приводить к сходным результатам, авторы трансдуцировали донорские МКПК нацеленным на тонически сигнальный GD2 CAR (H28), который, как известно, подвергается антиген-независимой тонической передаче сигналов CAR в результате спонтанной кластеризации рецепторов, и культивировали отсортированную CAR-T-клетку в присутствии Taz в течение 14 дней (ФИГ. 14,А).

[392] HA28 CAR-T-клетки проявляют чрезвычайно стойкую тоническую передачу сигналов и приобретают функциональные, транскриптомные и эпигенетические признаки истощения ко дню 5 после сортировки (день 11 после активации). На день 14 после размножения по сравнению с CAR-T-клетками, культивированными в нормальной среде, клетки, культивированные в присутствии Taz, характеризовались снижением экспрессии ингибирующего рецептора (ФИГ. 14,С-Е) и сопутствующим повышением экспрессии TCF-1 (ФИГ. 14,В).

Пример 12: Сахара поддерживают признаки прогениторных истощенных клеток и превращают терминально истощенные TIL из опухоли B16-OVA обратно в прогениторные истощенные Т-клетки

[393] Чтобы изучить, на какую основную популяцию Т клеток оказывают влияние сахара, раковые клетки B16-OVA (7×10^5 клеток) подкожно инокулировали в левый или правый бок мышей *TCF7^{GFP}*, экспрессирующих флуоресцентный репортер EGFP из эндогенного локуса *Tcf7*, что позволяет отслеживать экспрессию TCF-1 в живых клетках.

[394] Две популяции клеток, *Tim-3⁻TCF-GFP⁺* (прогениторные истощенные) и *Tim-3⁺TCF-GFP⁻* (терминально истощенные), из TIL, выделенных из опухолей B16-OVA, инокулированных мышам *Tcf7^{GFP}*, сортировали и размножали *in vitro* в соответствии с протоколом быстрого размножения в течение 7 дней (ФИГ. 15,А). Для отсортированных *Tim-3⁻TCF-GFP⁺* TIL, по сравнению с нормальным условием культивирования без сахаров, среда, дополненная как GlcNac, так и Neu5Ac, может поддерживать большее число *Tim-3⁻TCF/GFP⁺* клеток с признаками прогениторных истощенных клеток, включая более высокое соотношение популяции клеток *Tim-3⁻TCF-GFP⁺* и более низкую экспрессию ингибирующих рецепторов (ФИГ. 15,В). Важно отметить, что Neu5Ac может

частично превращать фенотип отсортированных $\text{Tim-3}^+\text{TCF-GFP}^-$ обратно в $\text{Tim-3}^-\text{TCF-GFP}^+$ (ФИГ. 15,С).

Пример 13: Конечные продукты биосинтеза пурина и пиримидина помогают поддерживать фенотип прогениторных истощенных Т-клеток

[395] Мы обнаружили, что обработка CD8^+ Т-клеток *N*-ацетилнейраминовой кислотой положительно регулировала конечные продукты биосинтеза пурина и пиримидина и определенные промежуточные продукты в этих двух путях. Поэтому авторы проверили, имеют ли пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды сходные эффекты с *N*-ацетилнейраминовой кислотой в облегчении поддержания менее дифференцированных фенотипов Т-клеток во время размножения. Спленоциты ОТ-I культивировали с 500 нМ пептида SIINFEKL ($\text{OVA}_{257-264}$) в течение трех дней при начальной плотности клеток $1 \times 10^6/\text{мл}$ для активации и размножения популяции CD8^+ Т-клеток. Различные концентрации продуктов или промежуточных продуктов в путях синтеза пурина или пиримидина *de novo* добавляли на день 3. Исследуемые соединения включают, например, гуанозин, дезоксигуанозин, аденозин, дезоксиаденозин, инозин, ксантозин, оротидин, уридин, цитидин, дезоксицитидин, тимидин, дезокситимидин, 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотид (AICAR), оротат и дигидрооротат. Фенотип размноженных Т-клеток анализировали на день 5. Как и ожидалось, эти пуриновые или пиримидиновые нуклеотиды были способны увеличивать популяцию прогениторных истощенных $\text{Tim3}^-\text{TCF1}^+$ клеток от 20% до более 50% при концентрациях от 50 до 250 мкМ. Добавление этих пуриновых или пиримидиновых нуклеотидов вместе с *N*-ацетилнейраминовой кислотой на день 3 дополнительно увеличивало долю $\text{Tim3}^-\text{TCF1}^+$ Т-клеток в 1,5-2 раза при анализе на день 5 без значительного влияния на пролиферацию клеток. Наконец, G6PDi-1, ингибитор глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Ghergurovich et al., Nat Chem Biol. 2020 Jul; 16(7): 731–739) показал сходные эффекты посредством модуляции пентозофосфатного пути. Добавление G6PDi-1 на день 3 культивирования ОТ-I увеличивает долю $\text{Tim3}^-\text{TCF1}^+$ Т-клеток в 1,5 раза при анализе на день 5 без значительного влияния на пролиферацию клеток.

Формула изобретения

1. Способ размножения активированных Т-клеток с получением Т-клеток с повышенной устойчивостью *in vivo* после адоптивного переноса, включающий приведение популяции клеток, содержащей активированные Т-клетки, в контакт с эффективным количеством соединения, которое разобщает размножение Т-клеток и дифференцировку, что обеспечивает размножение указанных активированных Т-клеток с получением Т-клеток с повышенной устойчивостью *in vivo* после адоптивного переноса.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные активированные Т-клетки представляют собой стволовые Т-клетки памяти (Tscm), Т-клетки центральной памяти (Tcm), Т-клетки эффекторной памяти, эффекторные Т-клетки, прогениторные истощенные Т-клетки (Трех) или терминально истощенные Т-клетки (Ttex).
3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные полученные Т-клетки менее дифференцированы по сравнению с активированными Т-клетками, не обработанными указанным соединением.
4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное соединение представляет собой сахар или производное сахара.
5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что указанный сахар представляет собой трегалозу, сахарозу, лактозу, фруктозу или нейраминовую кислоту.
6. Способ по п. 4, отличающийся тем, что указанное производное сахара представляет собой *N*-ацетилглюкозамин (GlcNAc) или *N*-ацетилнейраминовую кислоту (Neu5Ac).
7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное соединение представляет собой ингибитор энхансера гомолога-2 белка Zeste (EZH2).
8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что указанный ингибитор представляет собой таземетостат.
9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное соединение представляет собой низкомолекулярный ингибитор мутанта KRAS (G12C).
10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанный ингибитор представляет собой ингибитор KRAS (G12C) 12.
11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное соединение представляет собой промежуточный или конечный продукт биосинтеза пурина и пиримидина.
12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанное соединение представляет собой гуанозин, дезоксигуанозин, аденозин, дезоксиаденозин, инозин, ксантозин, оротидин, уридин, цитидин, дезоксцитидин, тимидин, дезокситимидин, 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотид (AICAR), оротат или дигидрооротат.

13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная Т-клетка представляет собой инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL) или генетически сконструированную Т-клетку.
14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что указанный TIL представляет собой CD8⁺ Т-клетку или CD4⁺ Т-клетку.
15. Способ по п. 13, отличающийся тем, что указанная генетически сконструированная Т-клетка представляет собой TCR-модифицированную Т-клетку или CAR-Т-клетку.
16. Способ превращения TCF-1-отрицательной Т-клетки в частично TCF-1-положительную, включающий приведение популяции TCF-1-отрицательных Т-клеток в контакт с эффективным количеством соединения, которое разобщает размножение Т-клеток и дифференцировку, что обеспечивает превращение указанной TCF-1-отрицательной Т-клетки в частично TCF-1-положительную.
17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что указанное соединение представляет собой *N*-ацетилнейраминовую кислоту (Neu5Ac) или *N*-ацетилглюкозамин (GlcNAc).
18. Набор для размножения *in vitro* активированной Т-клетки для адоптивной клеточной терапии, содержащий (1) эффективное количество соединения, которое разобщает размножение Т-клеток и дифференцировку, и (2) инструкцию по совместному культивированию указанного соединения с популяцией клеток, содержащей указанную активированную Т-клетку.
19. Набор по п. 18, отличающийся тем, что указанная активированная Т-клетка представляет собой стволовую Т-клетку памяти (Tscm), Т-клетку центральной памяти (Tcm), Т-клетку эффекторной памяти, эффекторную Т-клетку, прогениторную истощенную Т-клетку (Трех) или терминально истощенную Т-клетку (Ttex).
20. Набор по п. 18, отличающийся тем, что указанная популяция клеток содержит инфильтрирующие опухоль Т-клетки или генетически сконструированные Т-клетки.
21. Набор по п. 20, отличающийся тем, что указанные инфильтрирующие опухоль Т-клетки содержат подобные прогениторным CD8⁺ Т-клетки и терминально истощенные CD8⁺ Т-клетки.
22. Набор по п. 20, отличающийся тем, что указанные сконструированные Т-клетки представляют собой TCR-модифицированные Т-клетки или CAR-Т-клетки.
23. Набор по п. 18, отличающийся тем, что указанное соединение представляет собой сахар или производное сахара.
24. Набор по п. 23, отличающийся тем, что указанный сахар представляет собой трегалозу, сахарозу, лактозу, глюкозу, галактозу, фруктозу или нейраминовую кислоту.

25. Набор по п. 23, отличающийся тем, что указанное производное сахара представляет собой *N*-ацетилглюкозамин (GlcNAc) или *N*-ацетилнейраминовую кислоту (Neu5Ac).
26. Набор по п. 18, отличающийся тем, что указанное соединение представляет собой ингибитор энхансера гомолога-2 белка Zeste (EZH2).
27. Набор по п. 26, отличающийся тем, что указанный ингибитор представляет собой таземетостат.
28. Набор по п. 18, отличающийся тем, что указанное соединение представляет собой низкомолекулярный ингибитор мутанта KRAS (G12C).
29. Набор по п. 28, отличающийся тем, что указанный ингибитор представляет собой ингибитор KRAS (G12C) 12.
30. Способ скрининга соединений, которые стимулируют пролиферацию активированных Т-клеток и/или поддерживают размноженные Т-клетки в менее дифференцированном состоянии, включающий:
- (а) обеспечение Т-клеток из ткани, содержащей Т-клетки, от субъекта;
 - (b) культивирование активированных Т-клеток из ткани, содержащей Т-клетки, в присутствии соединения; поддержание указанного культивирования в течение периода времени, достаточного для обеспечения пролиферации Т-клеток, причем Т-клетки из ткани, содержащей Т-клетки, подверглись стимуляции активирующим агентом, при этом стимуляция происходит до культивирования или одновременно с ним; и
 - (с) измерение: (i) количества Т-клеток, экспрессирующих TCF-1; и/или (ii) уровня экспрессии TCF-1, при этом увеличение как (i), так и (ii) по сравнению с Т-клетками после размножения, не обработанными указанным соединением, свидетельствует о том, что указанное соединение стимулирует пролиферацию прогениторных истощенных Т-клеток и поддерживает размноженные Т-клетки в менее дифференцированном состоянии, и при этом увеличение (ii), но не (i) по сравнению с Т-клетками после размножения, не обработанными указанным соединением, свидетельствует о том, что указанное соединение стимулирует поддержание размноженных Т-клеток в менее дифференцированном состоянии.
31. Способ по п. 30, дополнительно включающий повторную стимуляцию и размножение указанных Т-клеток в культуре после (с), и поддержание указанного культивирования в течение периода времени, достаточного для обеспечения размножения Т-клеток, отличающийся тем, что Т-клетки оценивают путем измерения: (i) количества Т-клеток, экспрессирующих TCF-1; и/или (ii) уровня экспрессии TCF-1, при этом увеличение как (i), так и (ii) по сравнению с Т-клетками после размножения, не обработанными указанным соединением, свидетельствует о том, что указанное

соединение обеспечивает стимуляцию пролиферации прогениторных истощенных Т-клеток и поддержание размноженных Т-клеток в менее дифференцированном состоянии, и при этом увеличение (ii), но не (i) по сравнению с Т-клетками после размножения, не обработанными указанным соединением, свидетельствует о том, что указанное соединение стимулирует поддержание размноженных Т-клеток в менее дифференцированном состоянии.

32. Способ скрининга соединений, которые стимулируют пролиферацию прогениторных истощенных Т-клеток, включающий:

(a) обеспечение спленоцитов от трансгенного субъекта, содержащего полинуклеотид, кодирующий меченый ген *Tcf7*, и полинуклеотид, кодирующий Т-клеточный рецептор, специфичный в отношении пептидного антигена в комплексе с молекулой главного комплекса гистосовместимости (ГКГС);

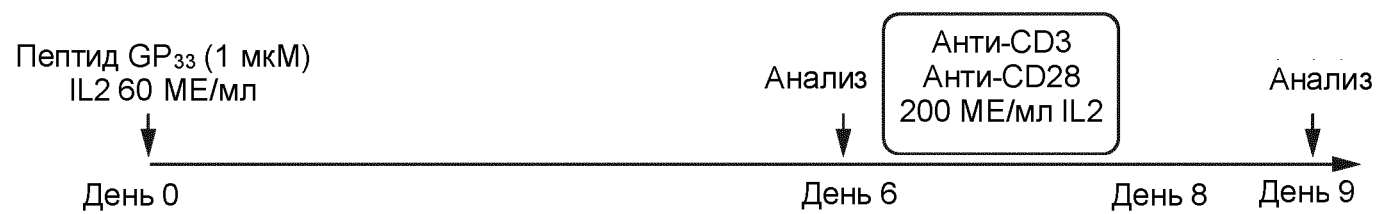
(b) культивирование активированных $CD8^+$ Т-клеток из указанных спленоцитов в присутствии соединения; поддержание указанного культивирования в течение периода времени, достаточного для обеспечения пролиферации Т-клеток, причем Т-клетки из указанных спленоцитов подверглись стимуляции активирующим агентом, при этом стимуляция происходит до культивирования или одновременно с ним;

(c) измерение:

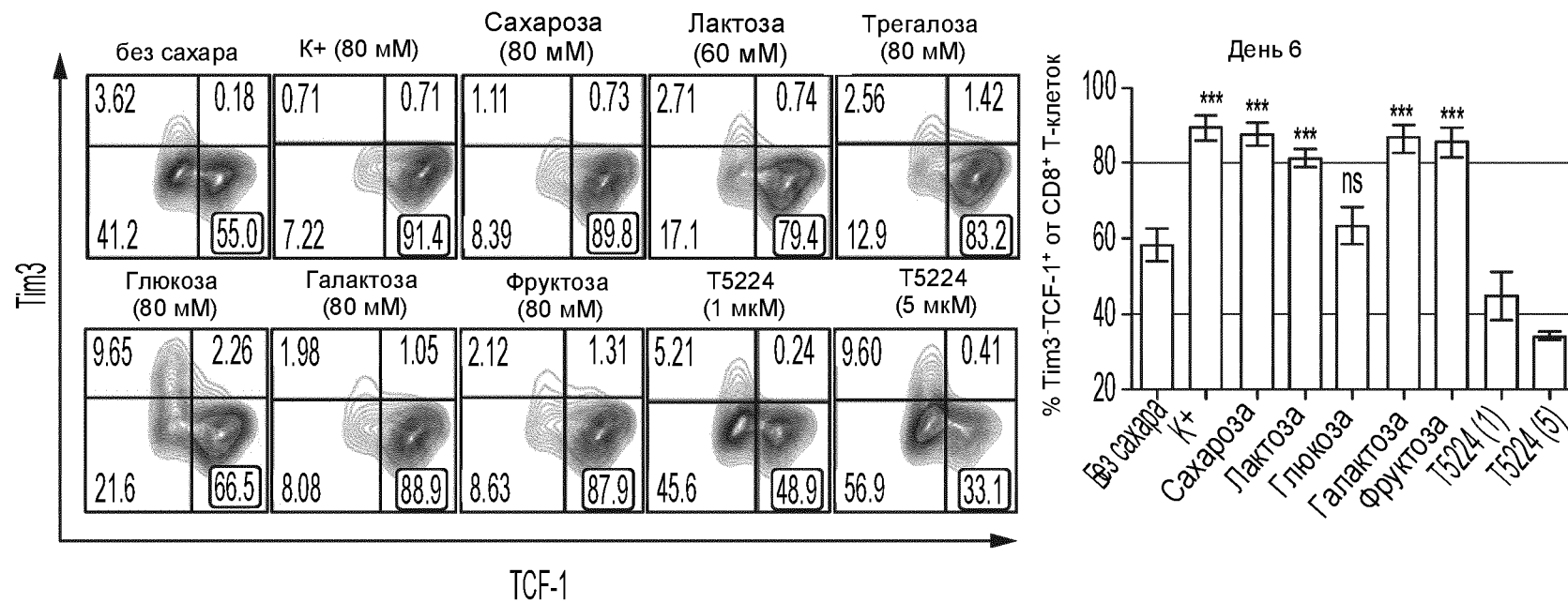
(i) количества меченых $Tcf7^+$ Т-клеток; и/или

(ii) уровня экспрессии TCF-1,

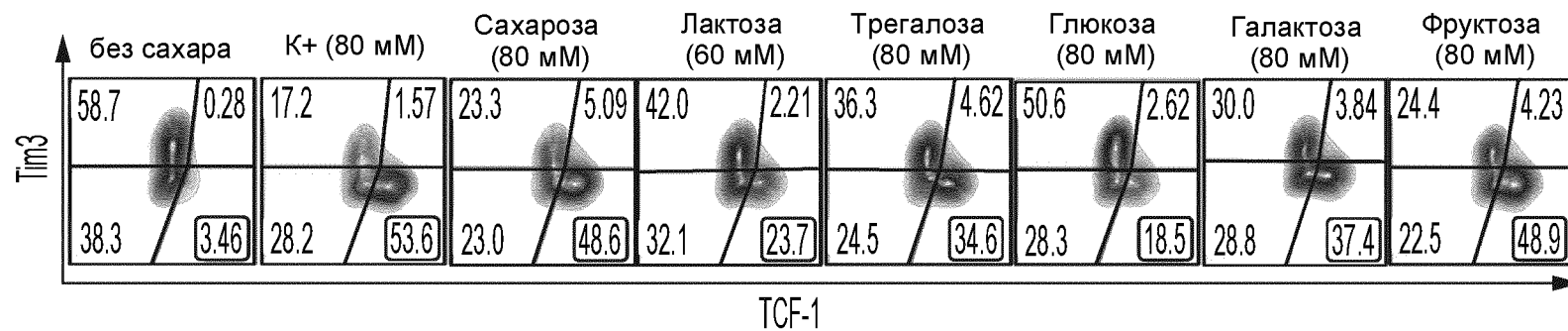
причем увеличение (i) и (ii) по сравнению со спленоцитами, не обработанными указанным соединением, свидетельствует о том, что указанное соединение стимулирует пролиферацию прогениторных истощенных Т-клеток.



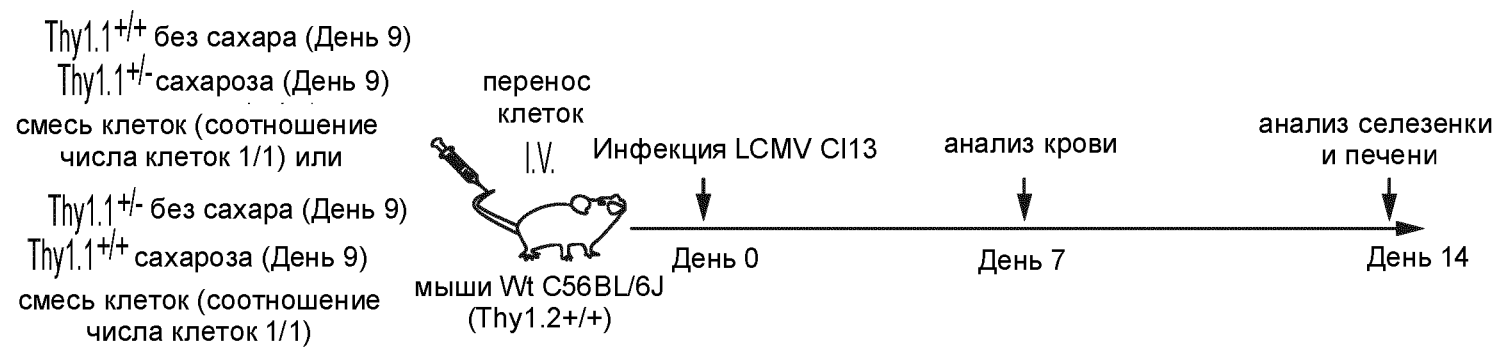
ФИГ. 1А



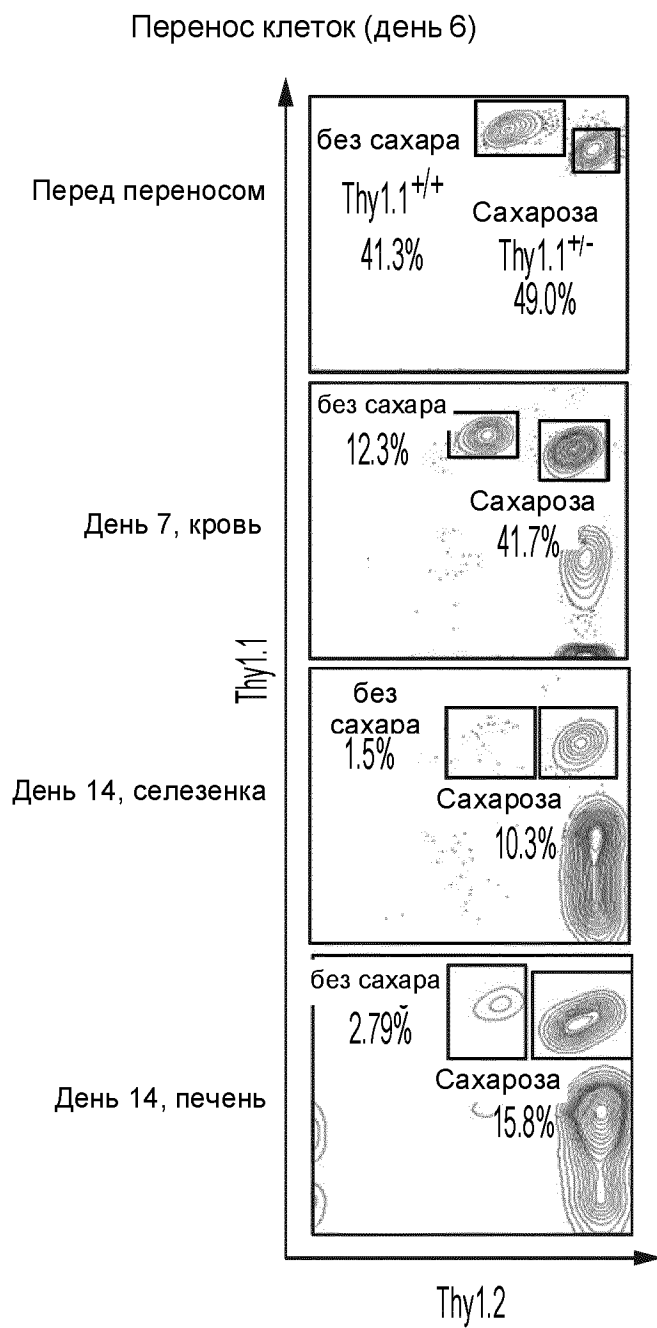
ФИГ. 1В



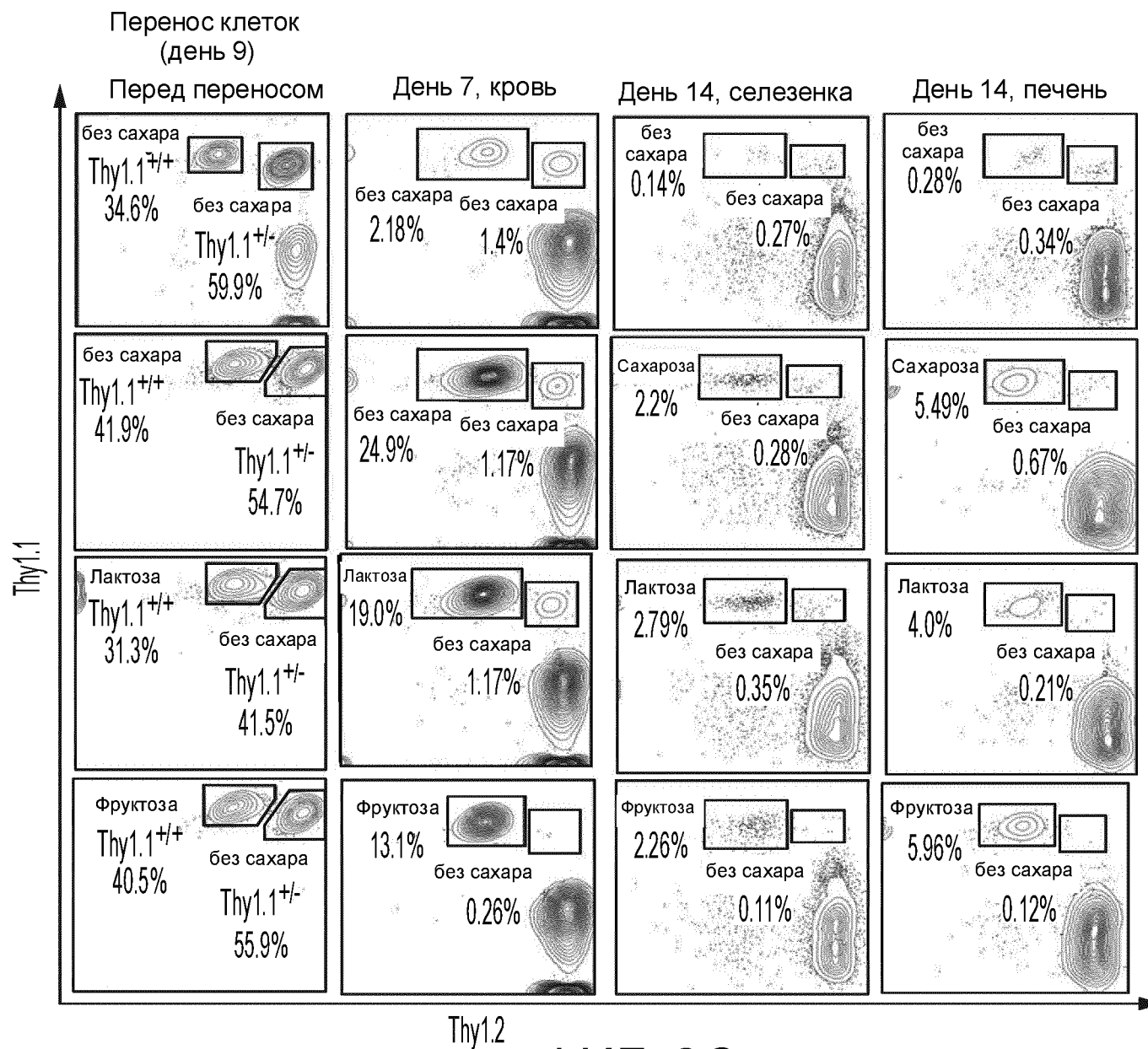
ФИГ. 1С



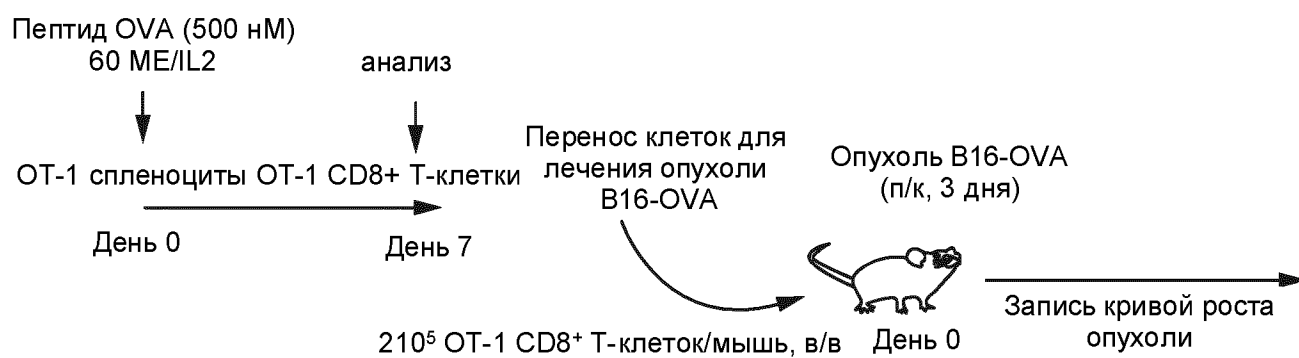
ФИГ. 2А



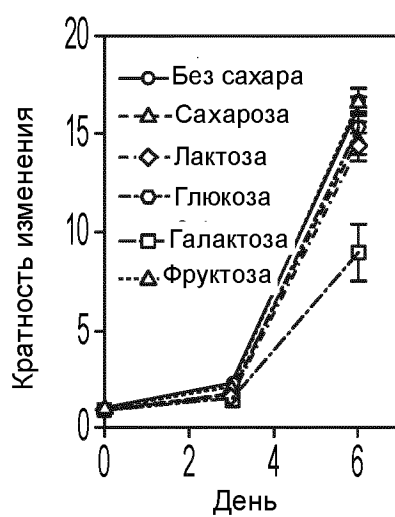
ФИГ. 2В



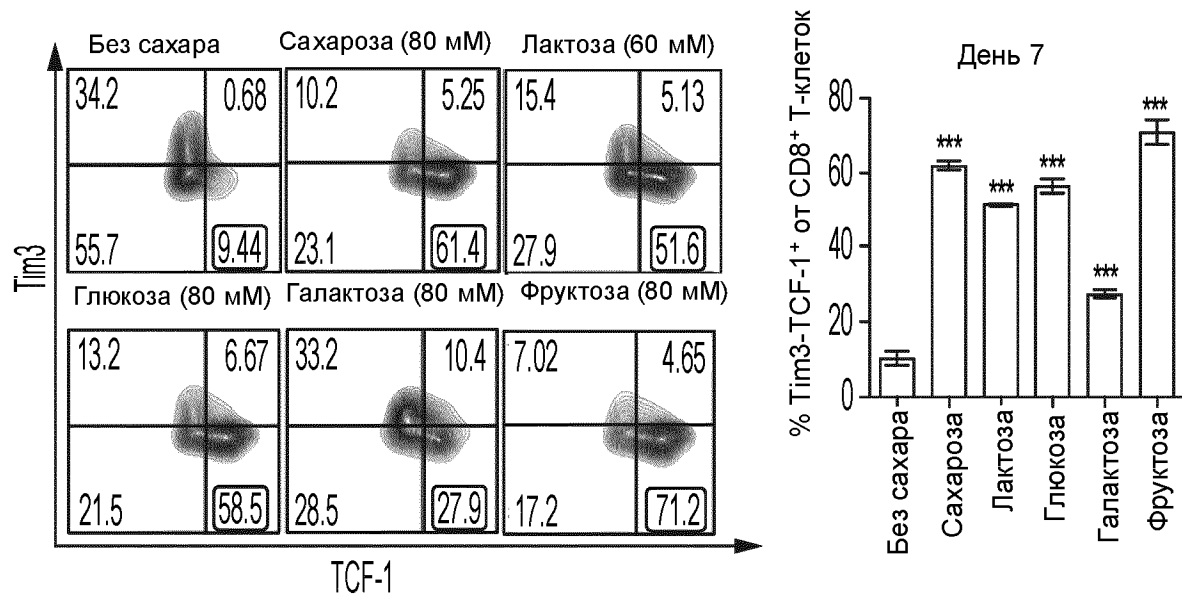
ФИГ. 2С



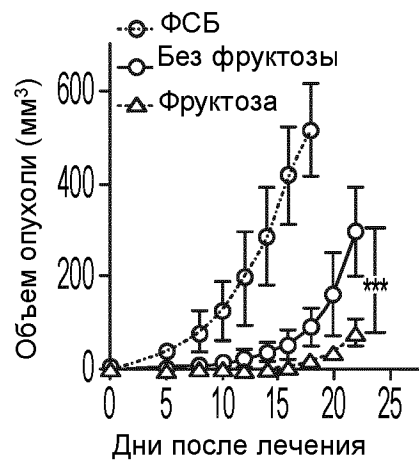
ФИГ. 3А



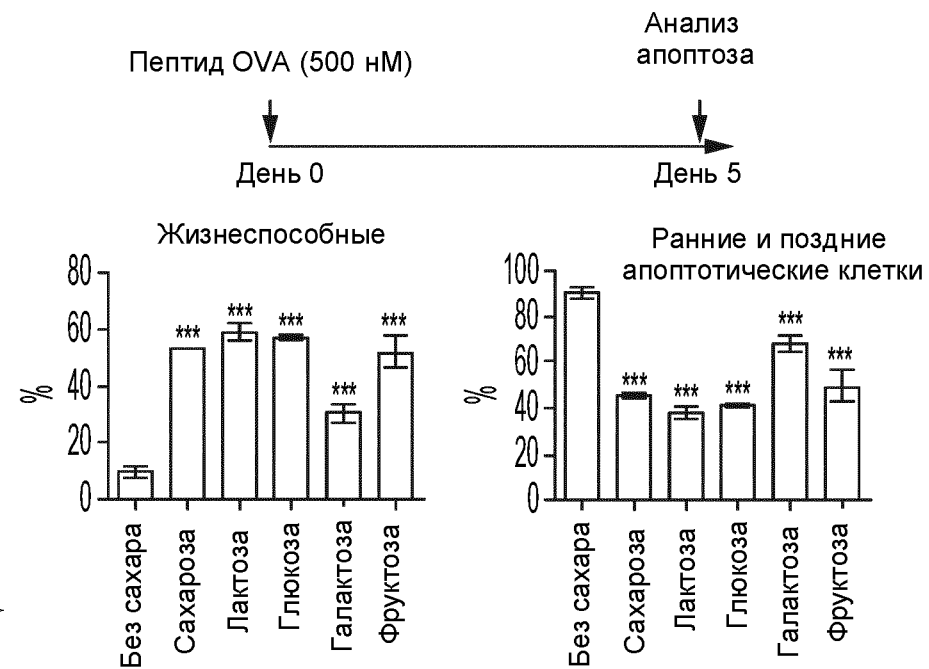
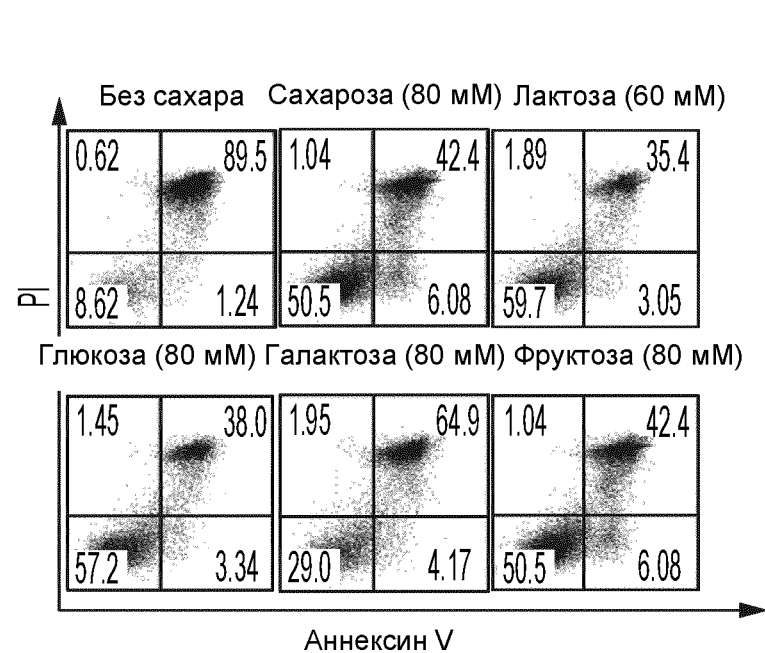
ФИГ. 3В



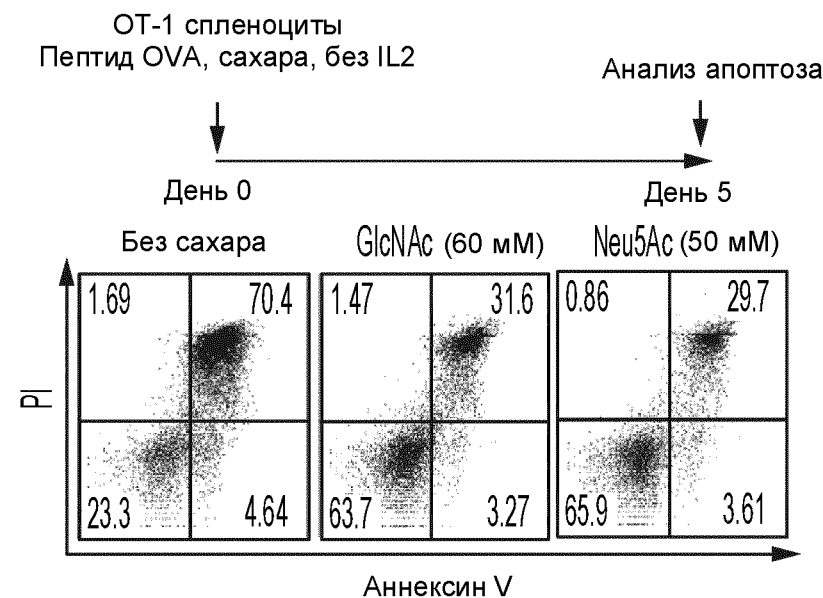
ФИГ. 3С



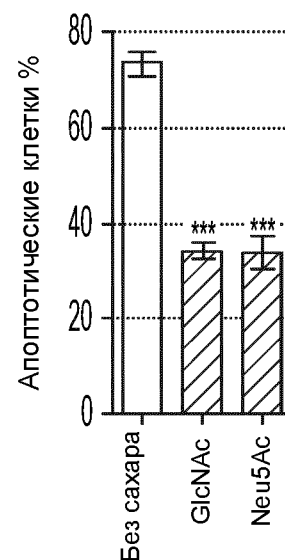
ФИГ. 3D



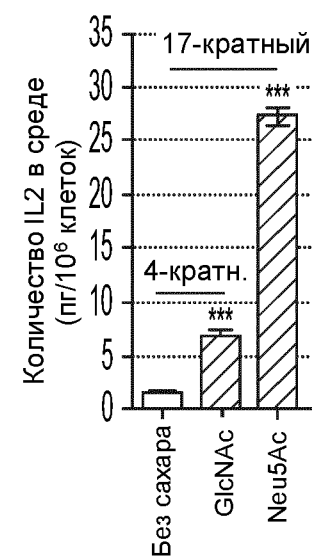
ФИГ. 3Е



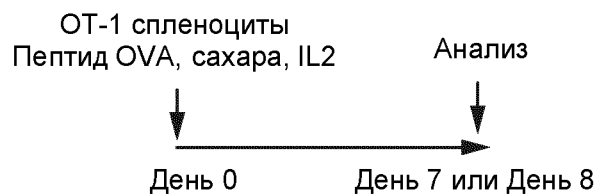
ФИГ. 4А



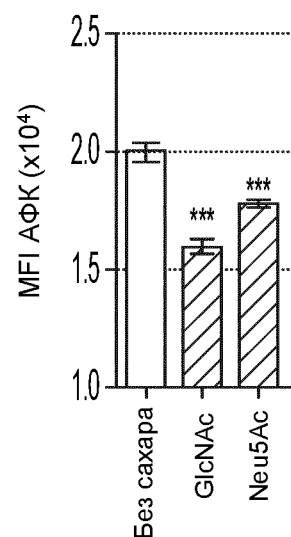
ФИГ. 4В



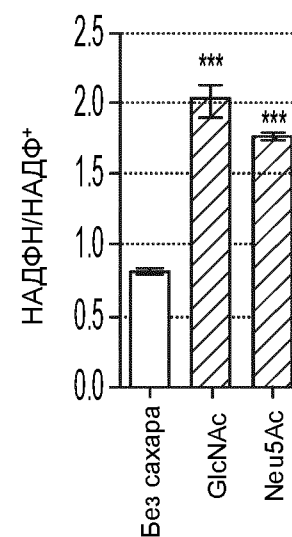
ФИГ. 4С



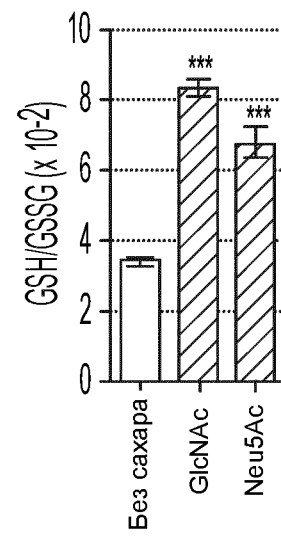
ФИГ. 4D



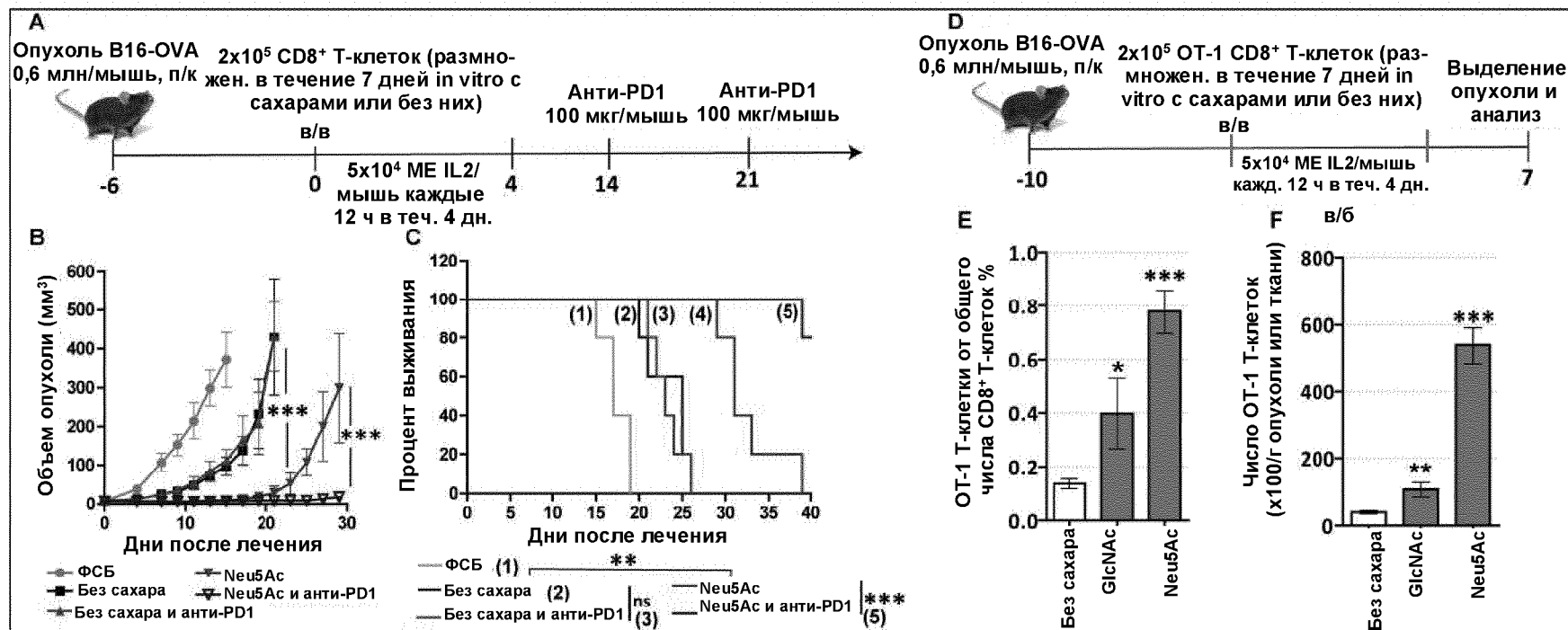
ФИГ. 4Е



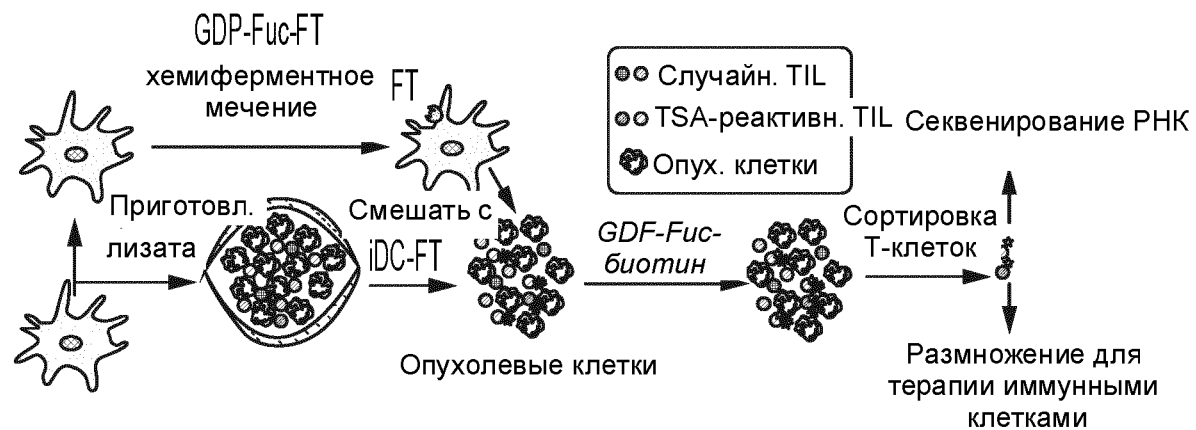
ФИГ. 4F



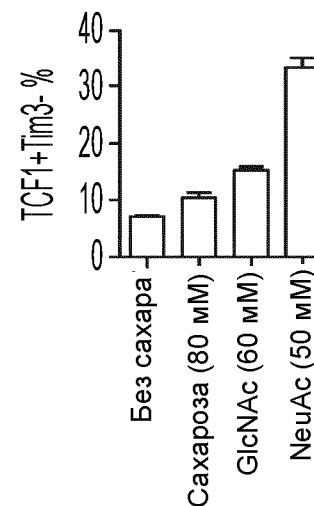
ФИГ. 4G



ФИГ. 5



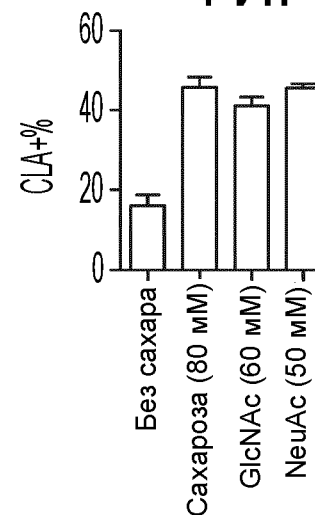
ФИГ. 6А



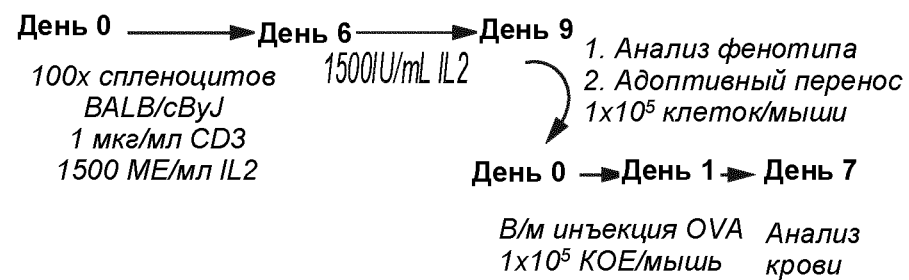
ФИГ. 6В



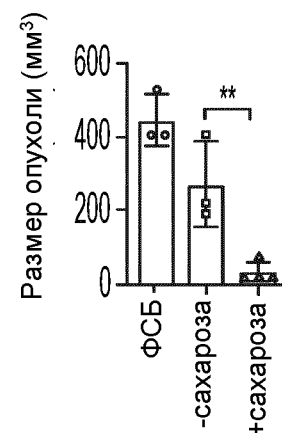
ФИГ. 6С



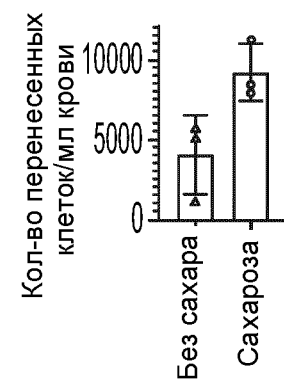
ФИГ. 6D



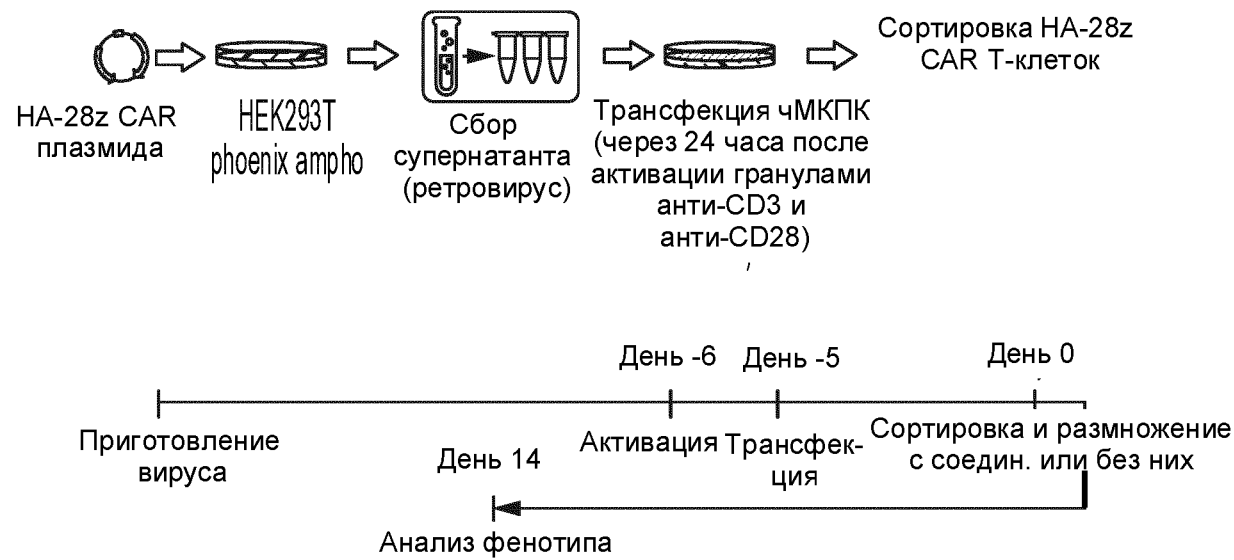
ФИГ. 6Е



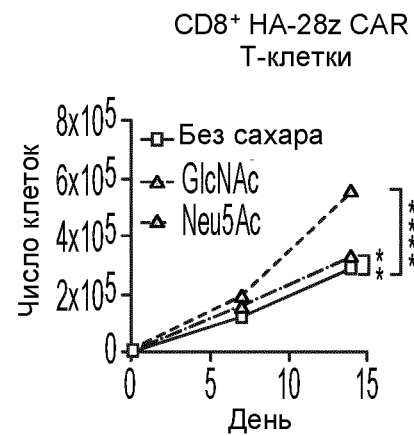
ФИГ. 6F



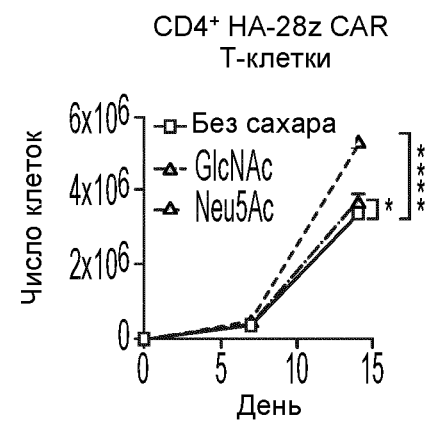
ФИГ. 6G



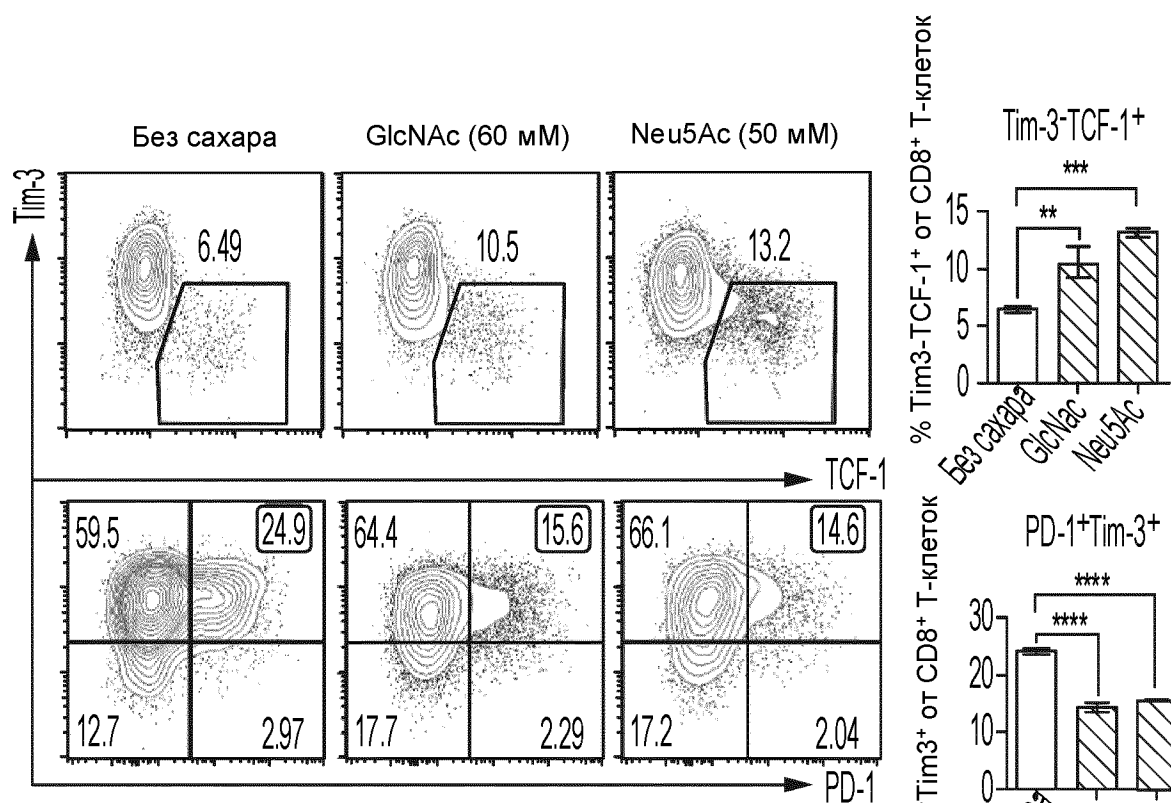
ФИГ. 7А



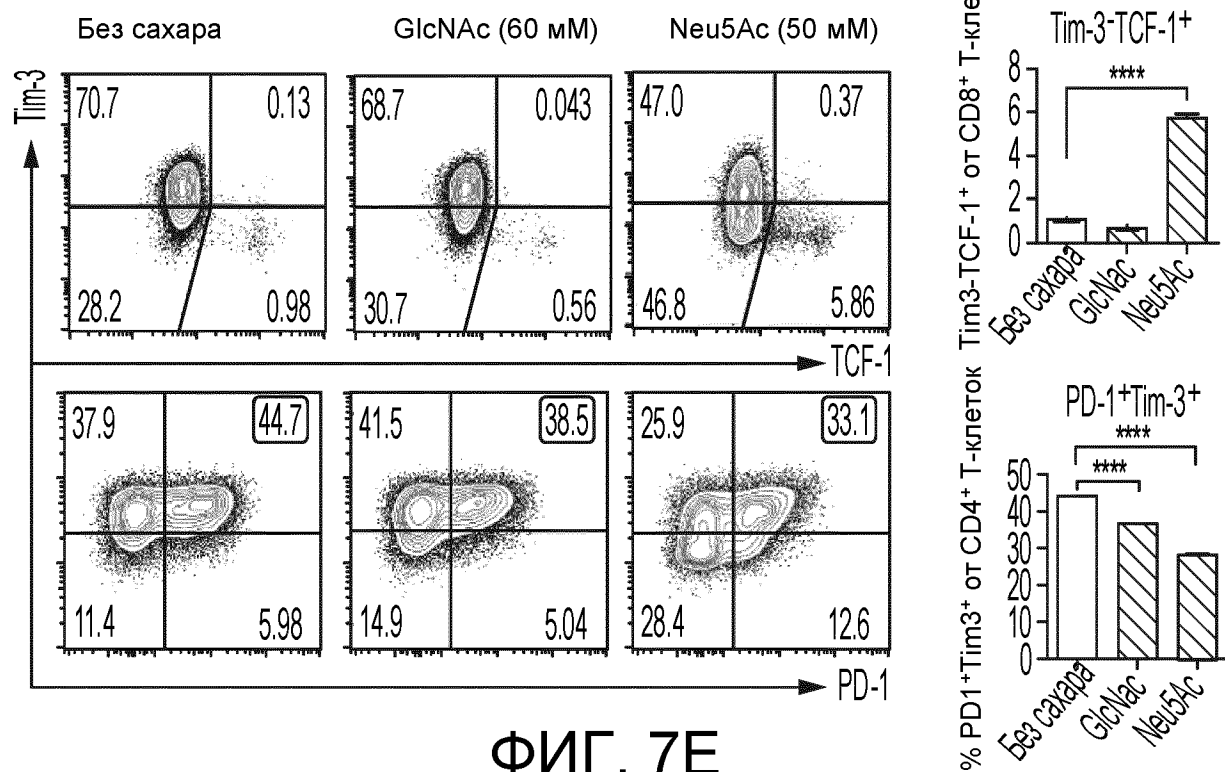
ФИГ. 7В



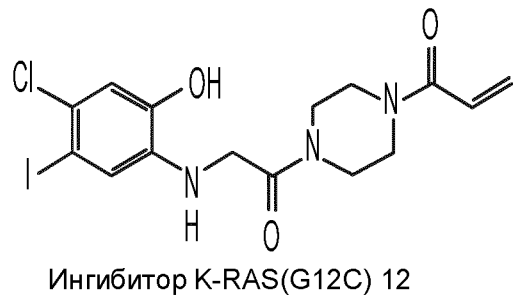
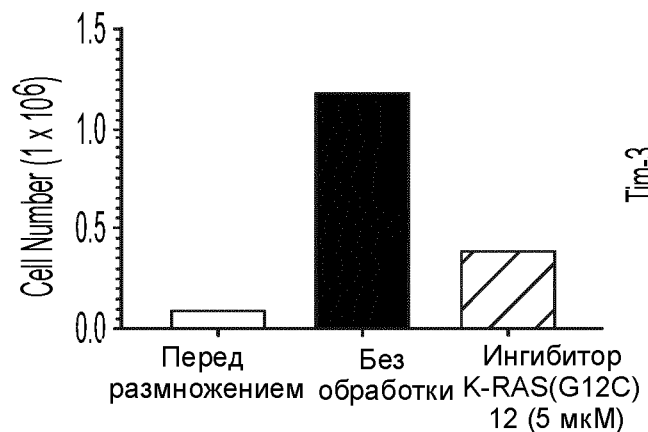
ФИГ. 7С



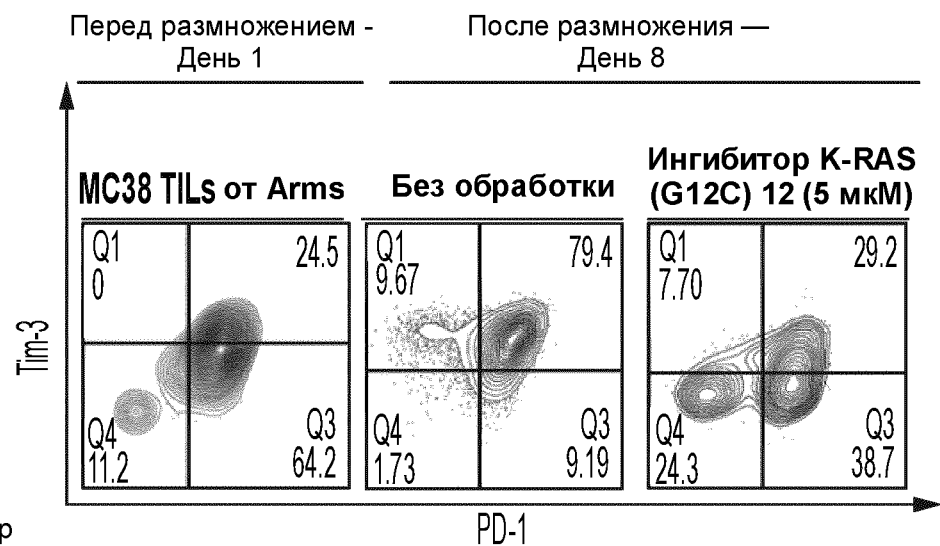
ФИГ. 7D



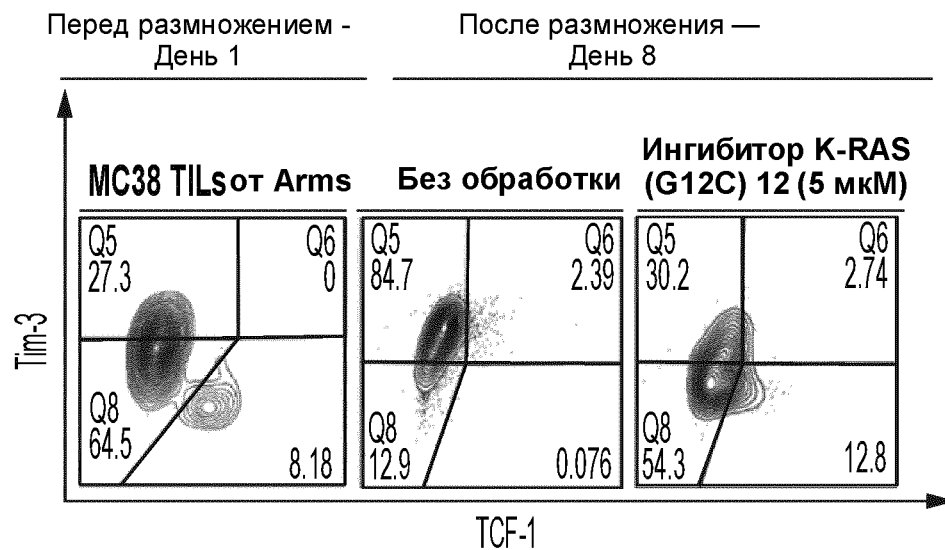
ФИГ. 7E



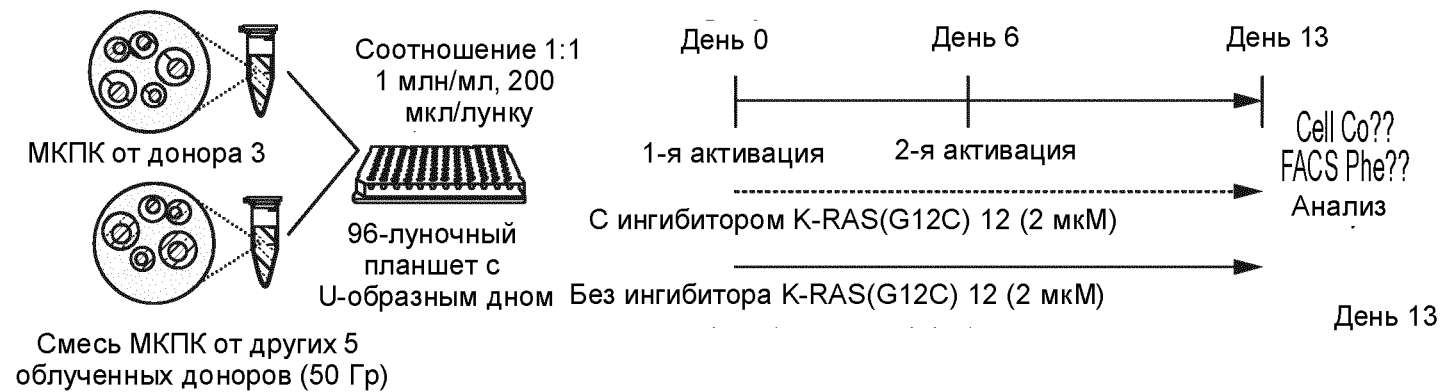
ФИГ. 8А



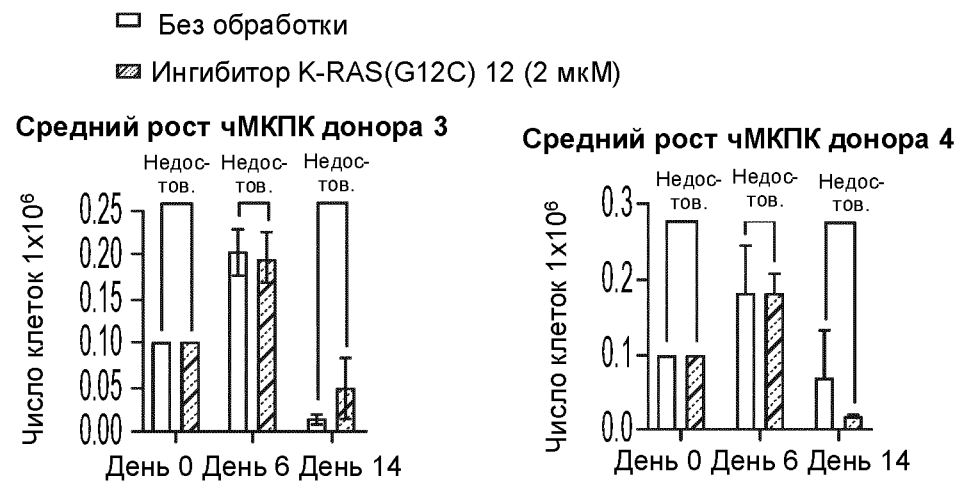
ФИГ. 8В



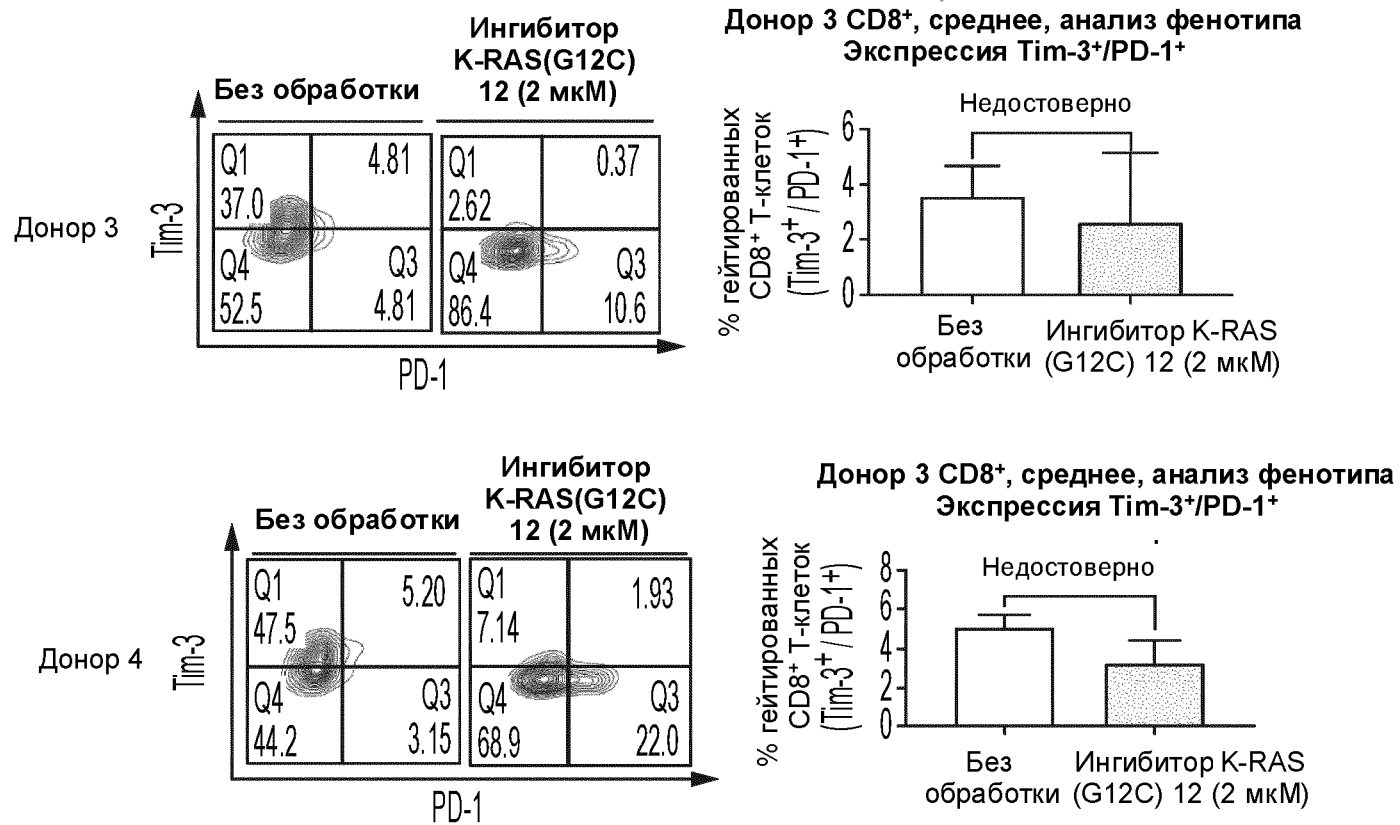
ФИГ. 8С



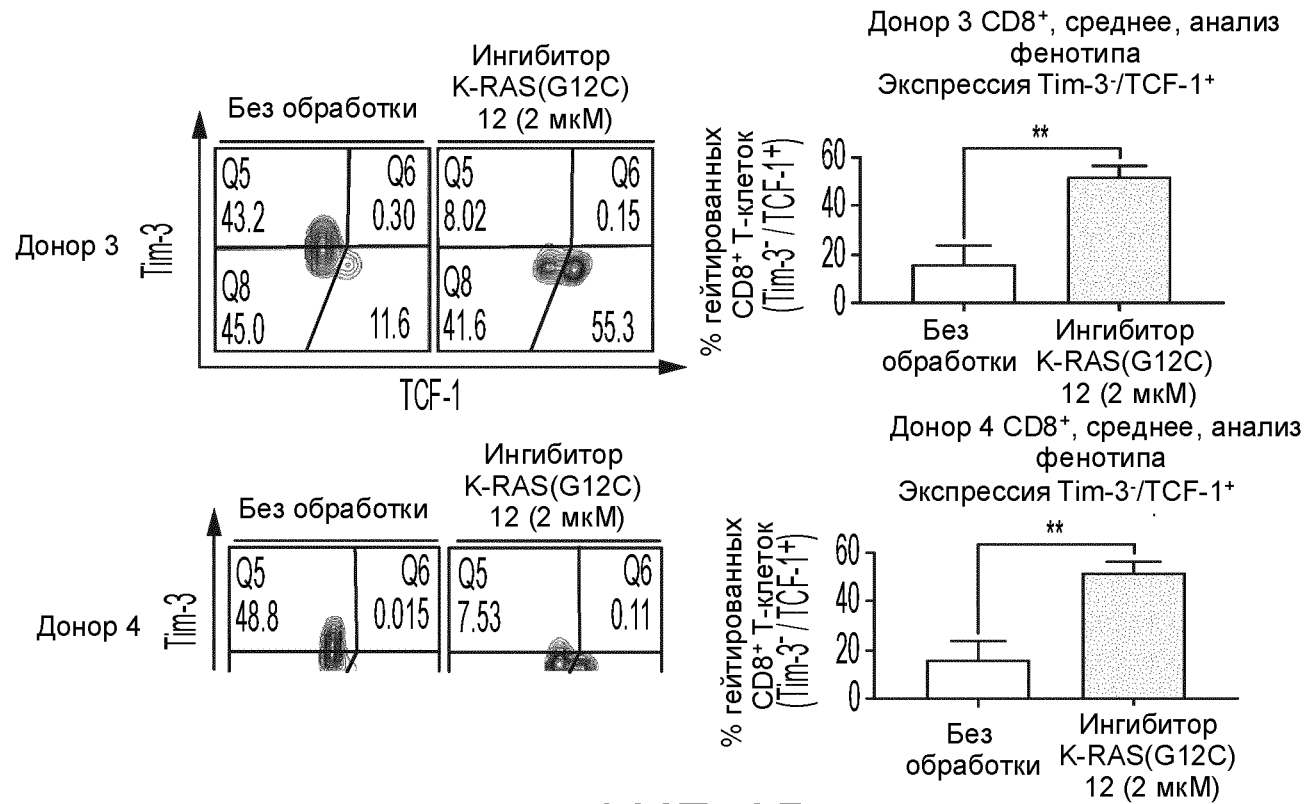
ФИГ. 9А



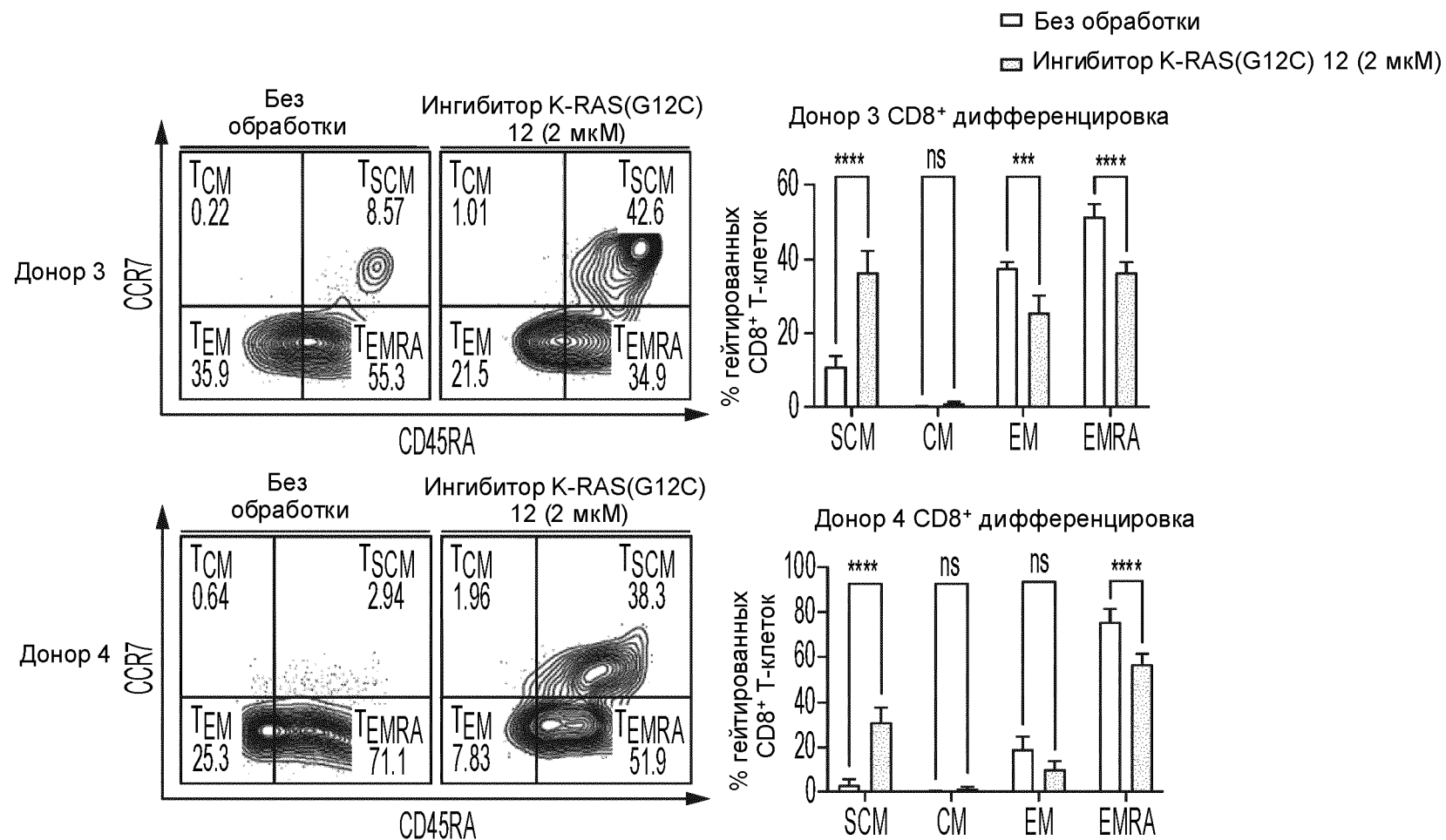
ФИГ. 9В



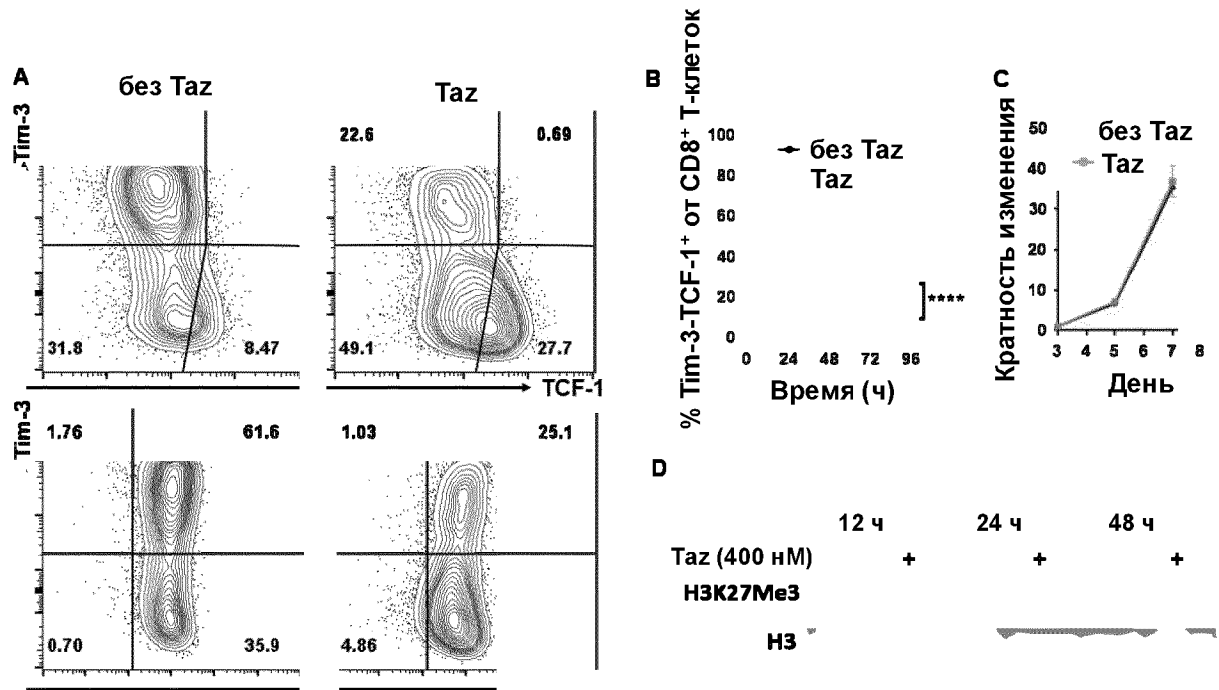
ФИГ. 9С



ФИГ. 9D

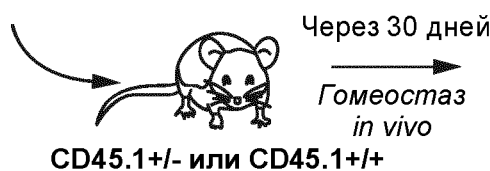


ФИГ. 9Е



ФИГ. 10

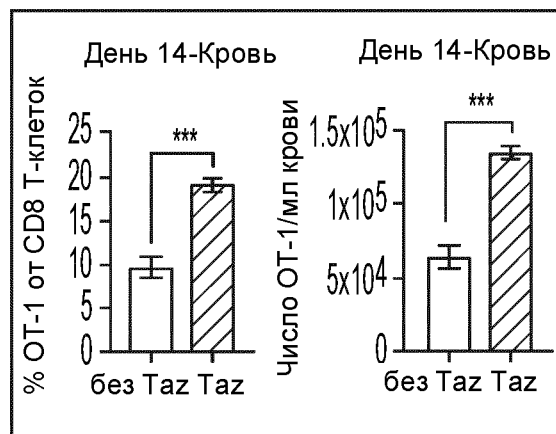
OT-1 (CD45.2^{+/+}) с Taz или без него (день 3-7)
 Культура *in vitro* в течение 7 дней
 10000 клеток, в/в



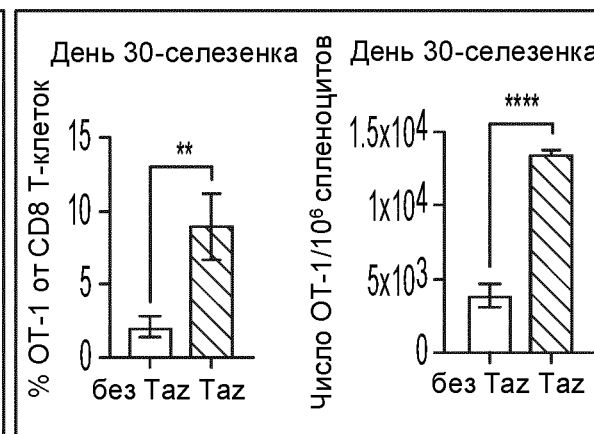
ФИГ. 11А



ФИГ. 11В



ФИГ. 11С

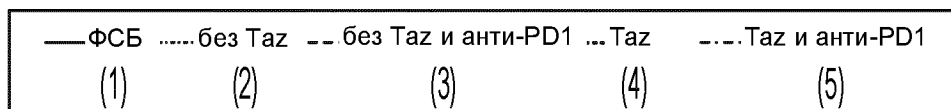


ФИГ. 11D



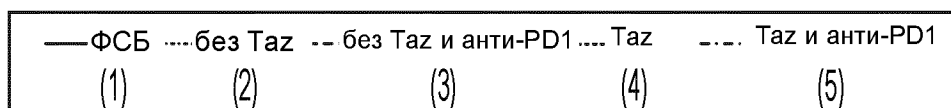
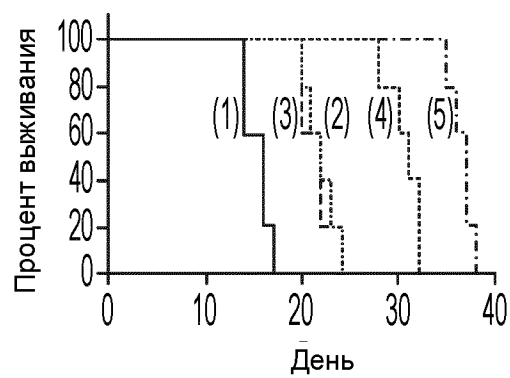
ФИГ. 12А

Кривая роста опухоли

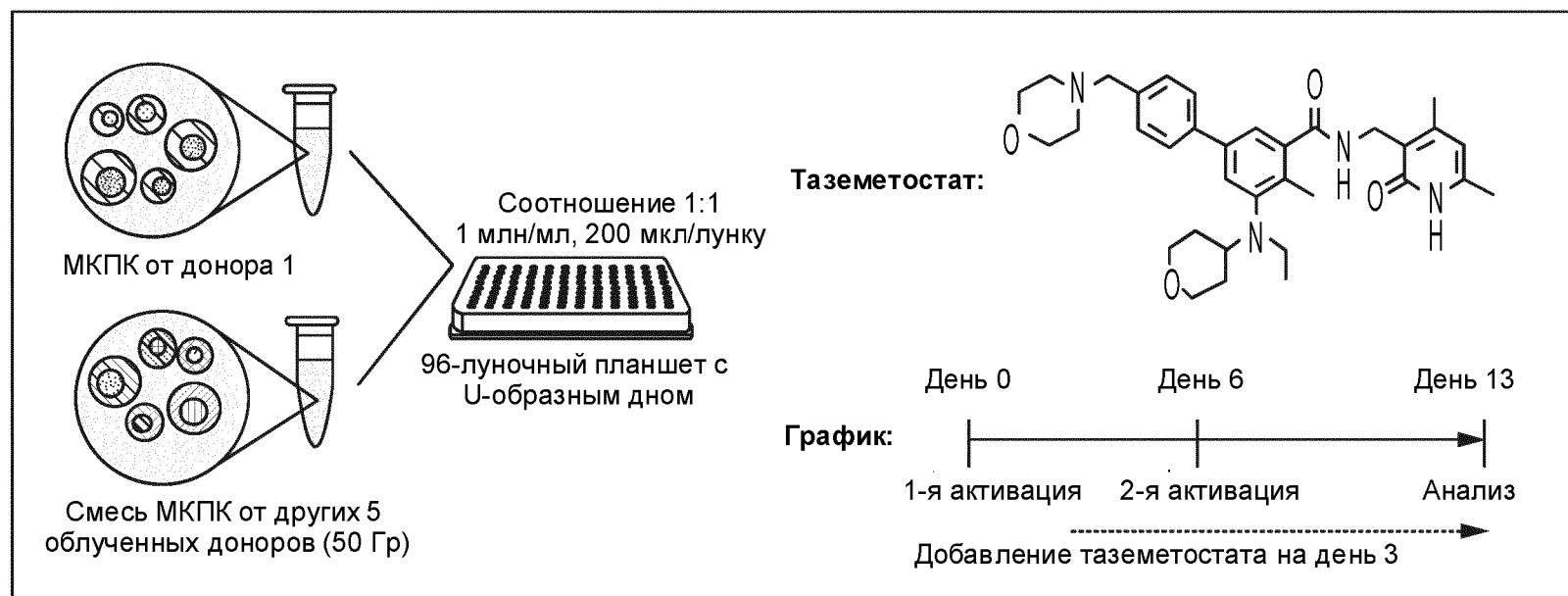


ФИГ. 12В

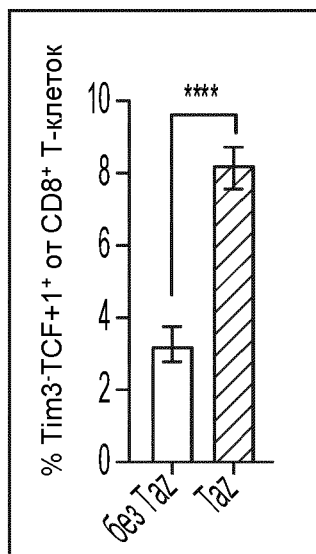
Кривая выживания



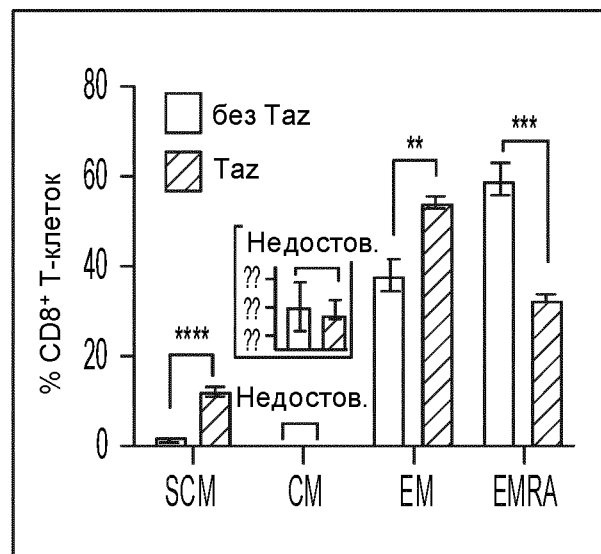
ФИГ. 12С



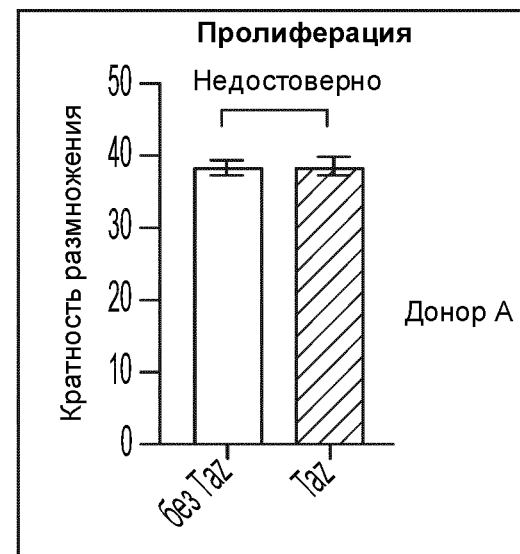
ФИГ. 13А



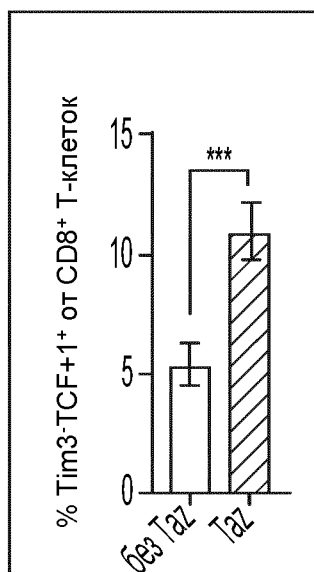
ФИГ. 13В



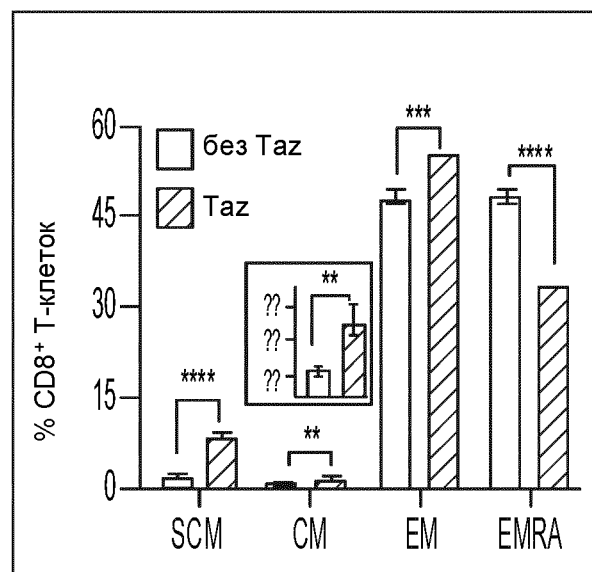
ФИГ. 13С



ФИГ. 13D



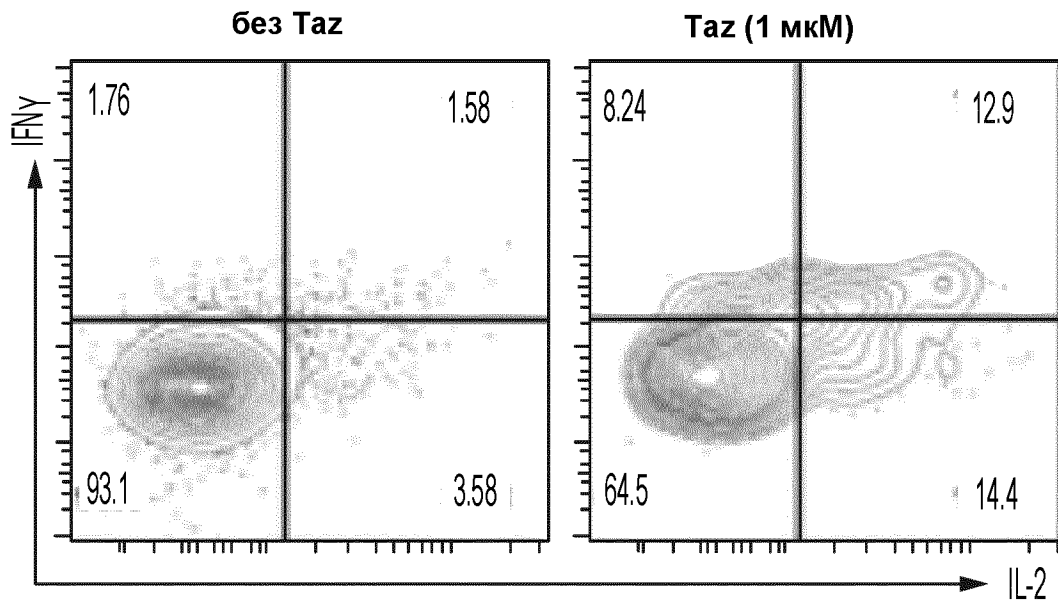
ФИГ. 13Е



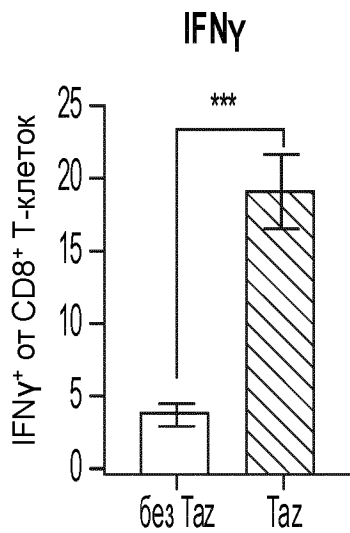
ФИГ. 13F



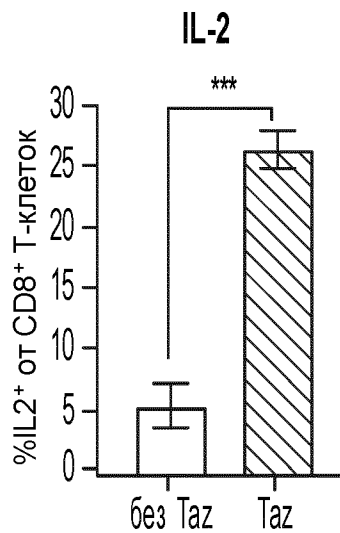
ФИГ. 13G



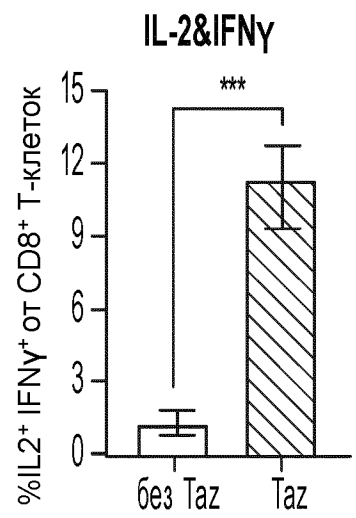
ФИГ. 13И



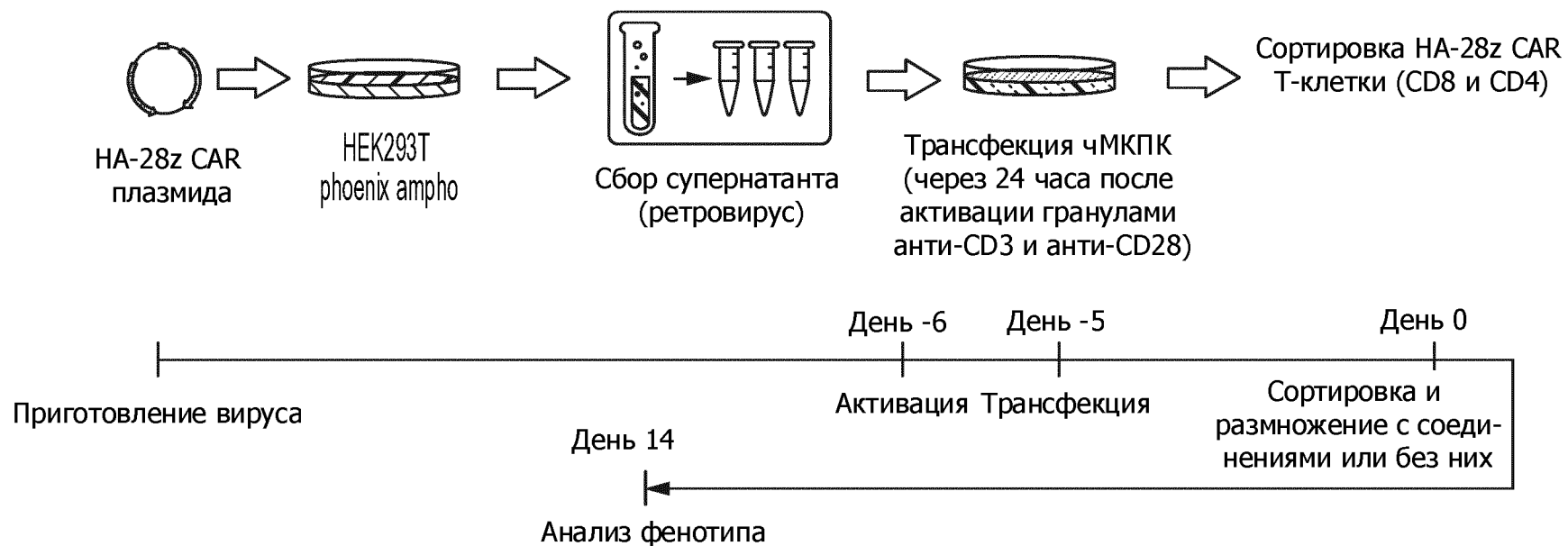
ФИГ. 13И



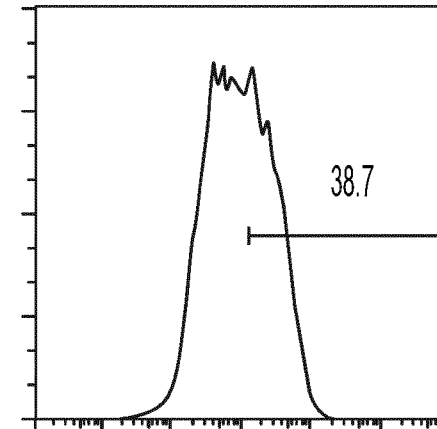
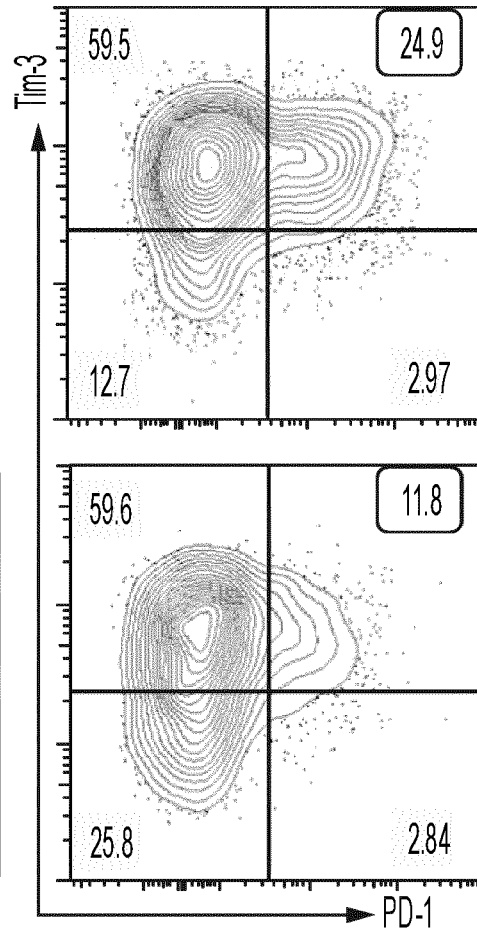
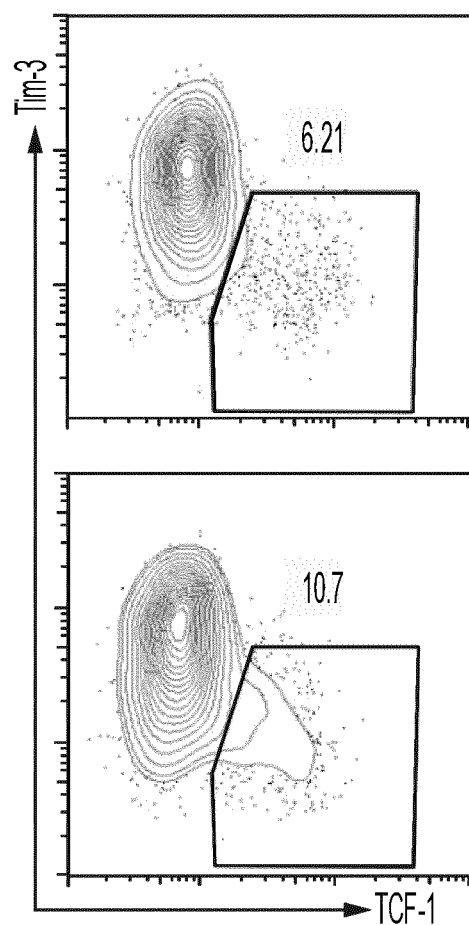
ФИГ. 13Ж



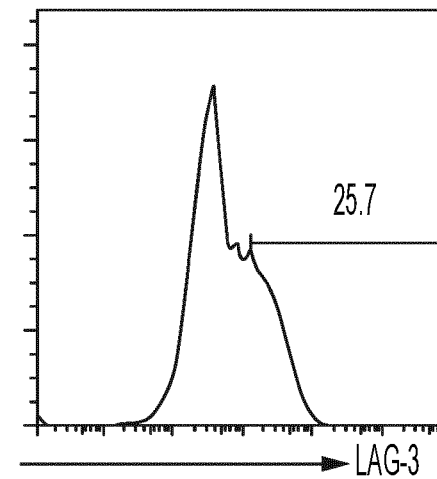
ФИГ. 13К



ФИГ. 14А

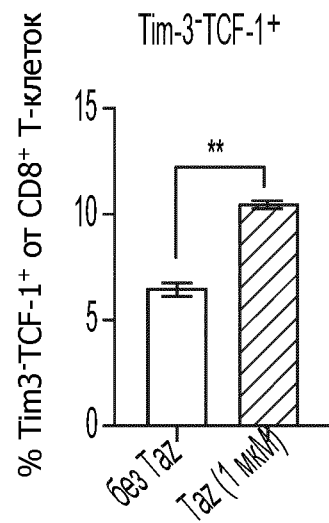


без Taz

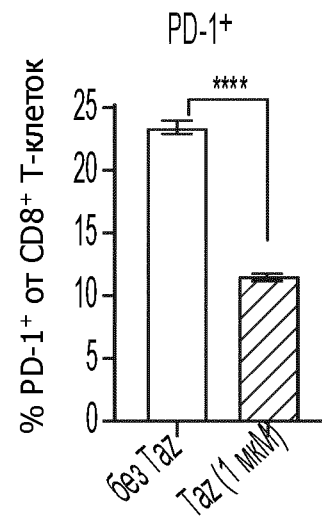


Taz (1 мМ)

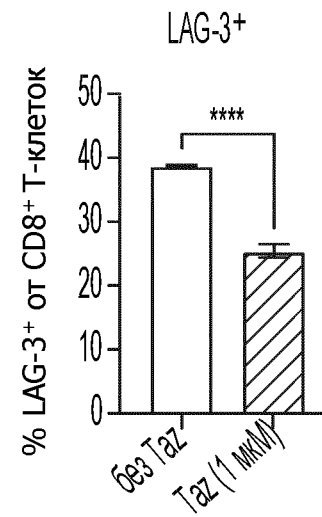
ФИГ. 14В



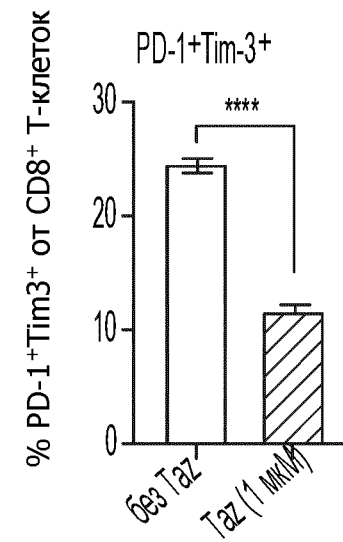
ФИГ. 14C



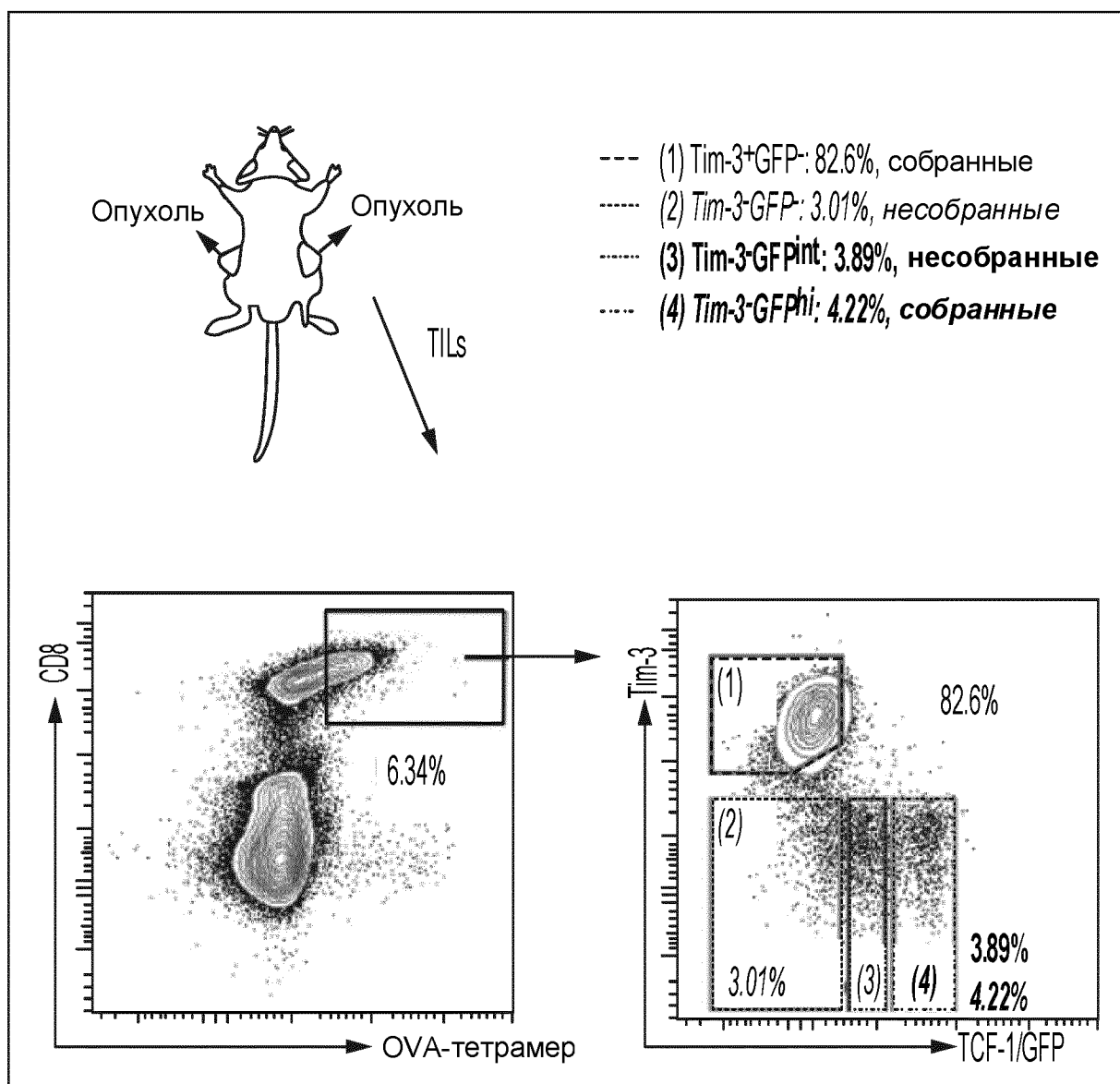
ФИГ. 14D



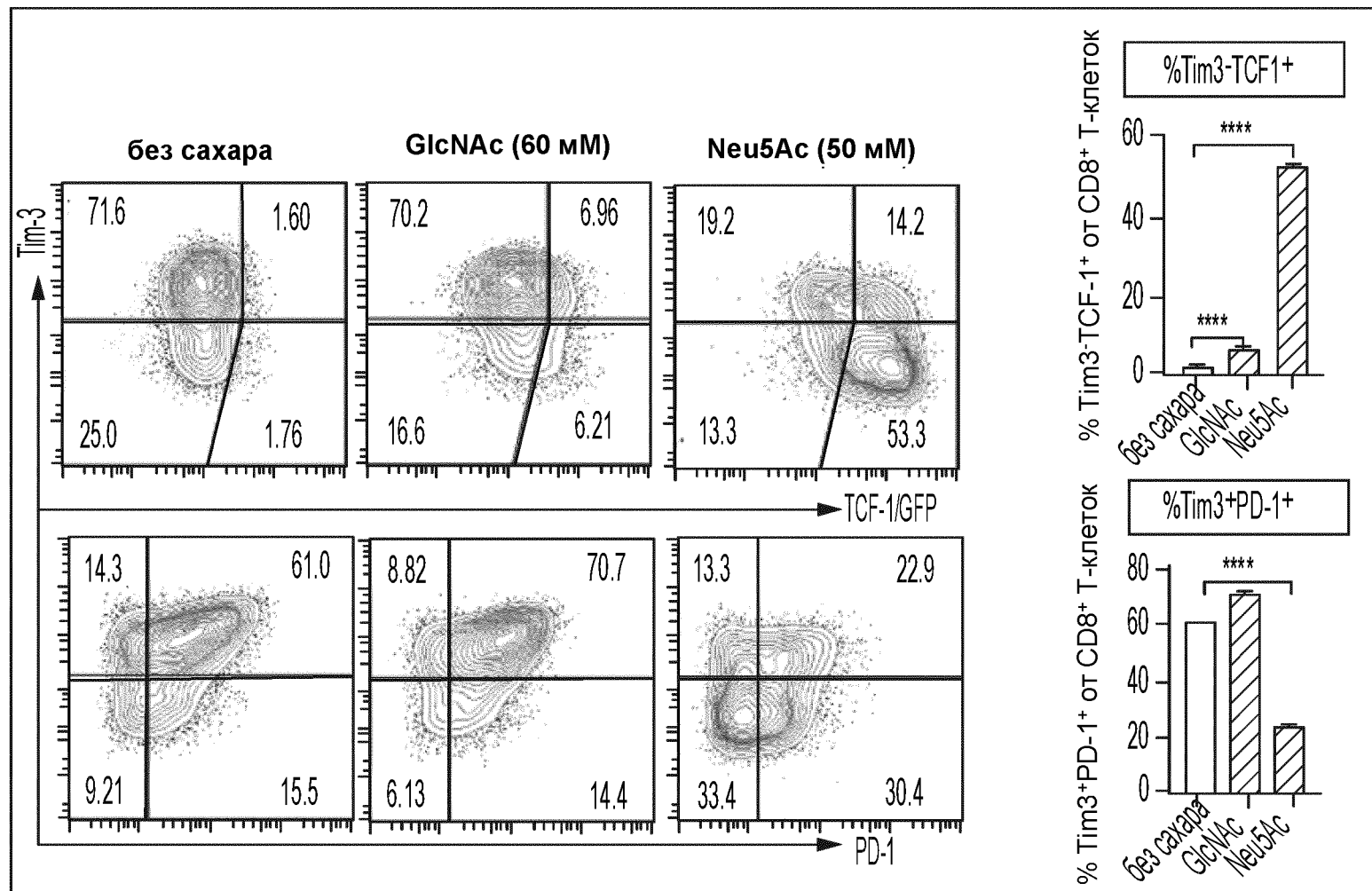
ФИГ. 14E



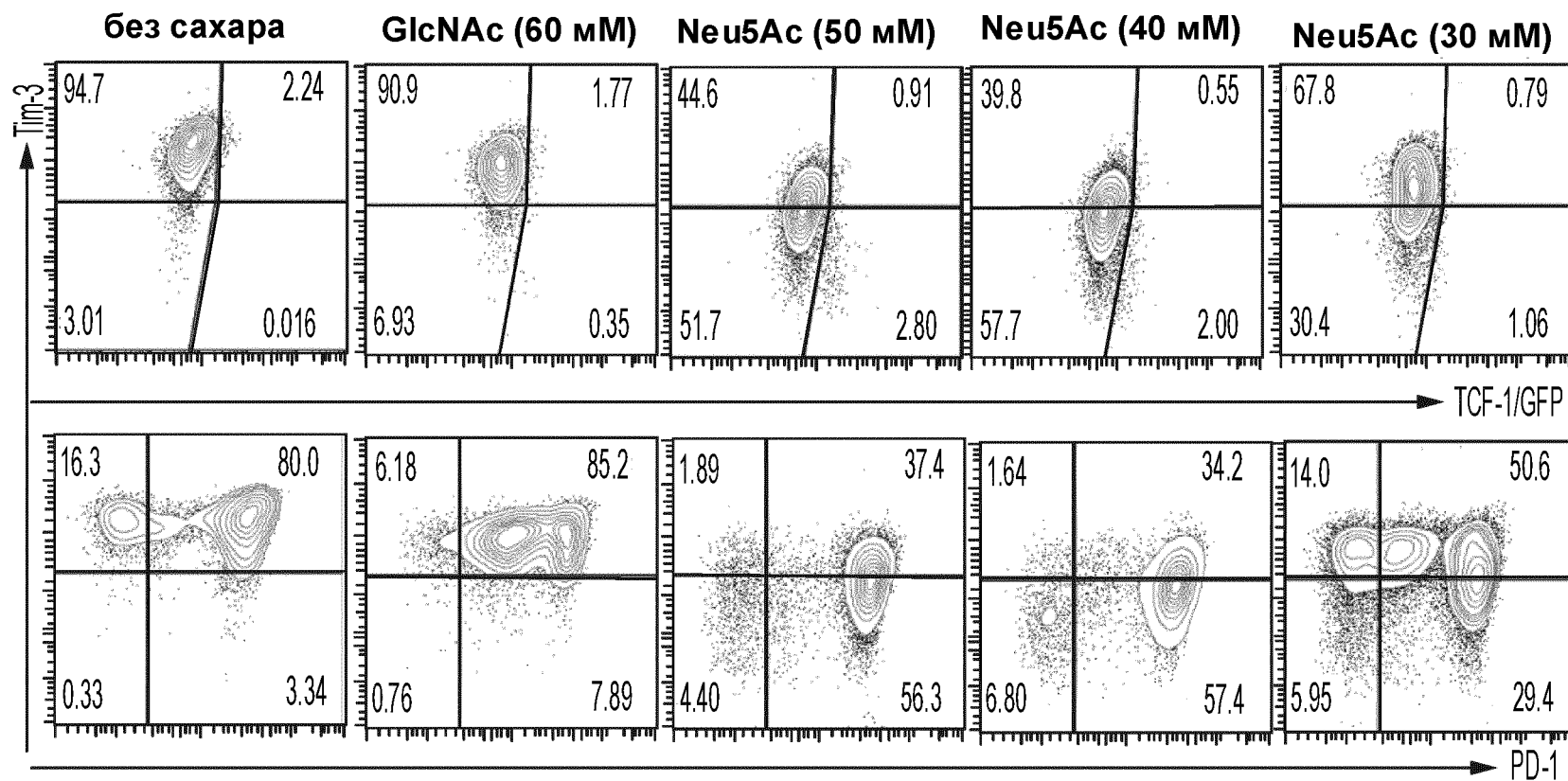
ФИГ. 14F



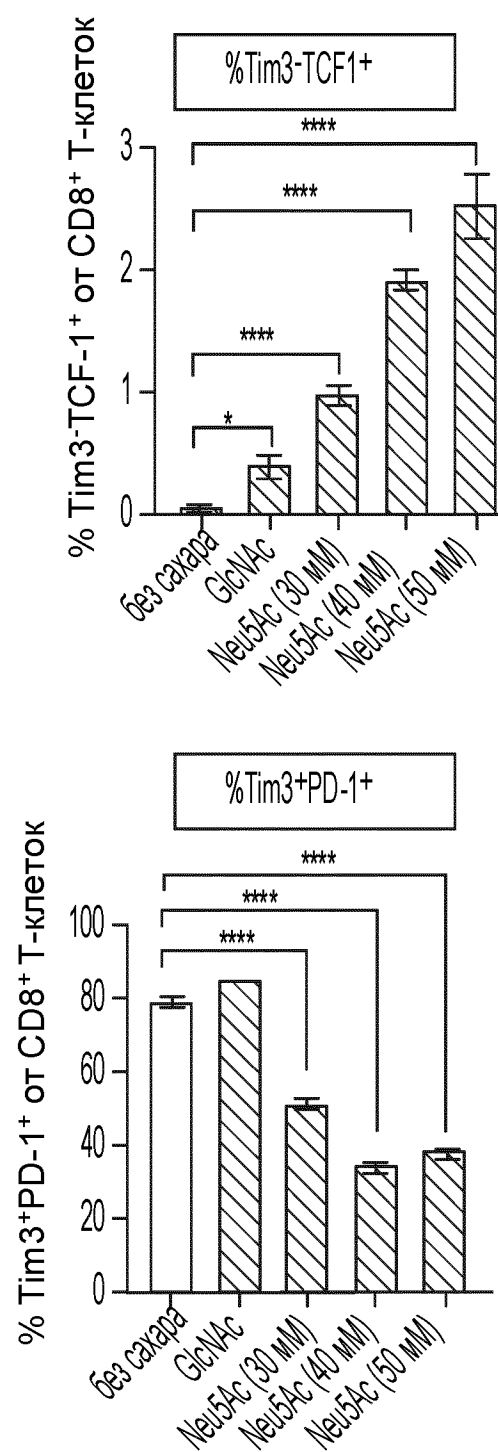
ФИГ. 15А



ФИГ. 15В



ФИГ. 15С-1



ФИГ. 15С-2