

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042755**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.03.22**

**(51)** Int. Cl. **C12N 5/0783 (2010.01)**  
**A61K 35/17 (2015.01)**

**(21)** Номер заявки  
**201991060**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.01.26**

---

**(54) ИММУННЫЕ КЛЕТКИ С МОДИФИЦИРОВАННЫМ МЕТАБОЛИЗМОМ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** **1701332.7**

**(32)** **2017.01.26**

**(33)** **GB**

**(43)** **2019.12.30**

**(86)** **PCT/GB2018/050240**

**(87)** **WO 2018/138522 2018.08.02**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ТиСи БАЙОФАРМ ЛТД (GB)**

**(72)** Изобретатель:  
**Лондон Тимоти, Патакас Агапитос,  
Ханниган Адель, Косимо Эмилио,  
Койл Нэнси, Скотт Анджела, Лик  
Майкл (GB)**

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

**(56)** MAKO NAKAYA ET AL: "Inflammatory T Cell Responses Rely on Amino Acid Transporter ASCT2 Facilitation of Glutamine Uptake and mTORC1 Kinase Activation", IMMUNITY., vol. 40, no. 5, 1 May 2014 (2014-05-01), pages 692-705, XP055467796, US ISSN: 1074-7613, DOI:10.1016/j.immuni.2014.04.007 abstract page 693, right-hand column, last paragraph

ELINA TIMOSENKO ET AL: "Nutritional Stress Induced by Tryptophan-Degrading Enzymes Results in ATF4-Dependent Reprogramming of the Amino Acid Transporter Profile in Tumor Cells", CANCER RESEARCH, vol. 76, no. 21, 20 September 2016 (2016-09-20), pages 6193-6204, XP055467813, US ISSN: 0008-5472, DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-3502 abstract page 6193, right-hand column, last paragraph - page 6194, left-hand column, paragraph 1 page 6195; figure 1 page 6196; figure 2 page 6199, right-hand column, paragraph 4

WO-A1-2016165613

E. L. CARR ET AL: "Glutamine Uptake and Metabolism Are Coordinately Regulated by ERK/MAPK during T Lymphocyte Activation", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 185, no. 2, 16 June 2010 (2010-06-16), pages 1037-1044, XP055467866, US ISSN: 0022-1767, DOI:10.4049/jimmunol.0903586 abstract page 1040, right-hand column, paragraph 2 page 1042, left-hand column, paragraph 1

---

**(57)** Описана модифицированная Т-клетка, которая адаптирована для сверхэкспрессии SLC1A5, изоформы SLC1A5 или альтернативного переносчика триптофана или глутамина. Также описано применение таких модифицированных Т-клеток для лечения заболеваний, в частности злокачественного новообразования, способы отбора модифицированных Т-клеток, которые сверхэкспрессируют SLC1A5, а также нуклеиновые кислоты и векторы для получения таких модифицированных Т-клеток.

---

**042755 B1**

**042755 B1**

Настоящее изобретение относится к Т-клеткам, реализующим свою функцию и при этом адаптированным к микросреде с низким содержанием триптофана или обедненной по триптофану, в частности к среде, в которой происходит катаболизм триптофана, причем Т-клетки модифицированы так, что происходит экспрессия переносчиков аминокислот, в частности, переносчиков глутамина и/или триптофана, например, SLC1A5 и его изоформ. Настоящее изобретение также относится к способам получения таких Т-клеток и к их применению.

#### **Область техники, к которой относится изобретение**

Разрушение триптофана представляет собой стратегию, используемую большим числом опухолей для ускользания от иммунного надзора.

Индолеамин 2,3-диоксигеназа (IDO) и триптофан 2,3-диоксигеназа (TDO) являются скоростью лимитирующими ферментами кинуренинового пути, при котором незаменимая аминокислота триптофан превращается в кинуренин.

Условия с низким уровнем триптофана, как правило, <5 мкм, опосредованные активностью IDO, вызывают масштабную перестройку опухолевых клеток, метаболизма аминокислот, экспрессии генов и, кроме того, стимуляцию экспрессии генов, кодирующих переносчиков аминокислот, таких как SLC7A11, SLC1A4 и SLC1A5, в том числе варианты сплайсинга SLC1A5.

SLC1A5 является натрий-зависимым высокоаффинным переносчиком глутамина из семейства переносчиков растворенных вещества. Повышенная экспрессия SLC1A5 (и его вариантов сплайсинга) улучшает захват глутамина в опухолевые клетки. Кроме увеличения захвата глутамина, повышенная экспрессия SLC1A5 также улучшает транспорт триптофана за счет увеличения активности переносчика больших нейтральных аминокислот (LAT1). LAT1 является гетеродимерным мембранным транспортным белком, который преимущественно переносит аминокислоты с разветвленными цепями (валин, лейцин, изолейцин) и ароматические (триптофан, тирозин) аминокислоты. Функциональный переносчик LAT1 состоит из двух белков, кодируемых двумя различными генами:

белка тяжелой субъединицы 4F2hc/CD98, кодируемый геном SLC3A2, и

белка легкой субъединицы CD98, кодируемый геном SLC7A5.

Обладая способностью переключать транспорт облигатных аминокислот, активность LAT1 во многом зависит от замены внутриклеточного глутамина на аминокислоты с разветвленной цепью и ароматические аминокислоты при захвате.

Сообщалось о конститутивной экспрессии IDO и TDO в некоторых злокачественных опухолях человека, которая приводила к катаболизму триптофана в микросреде опухоли. Ограниченная доступность триптофана имеет глубокие иммунорегуляторные эффекты, приводящие к снижению пролиферации и уменьшению эффекторных функций Т-клеток. Злокачественные клетки защищены этой враждебной микросредой благодаря усиленной активности аминокислотных переносчиков, что дает злокачественным клеткам селективное преимущество по сравнению с другими клетками в опухоли.

Хотя было установлено, что катаболизм триптофана оказывает иммуносупрессивное действие на Т-клетки, механизм, благодаря которому катаболизм триптофана влияет на Т-клетки, плохо понятен.

В последние годы внимание было нацелено на IDO из-за ее иммуносупрессивных эффектов на Т-лимфоциты, связанных отчасти с истощением триптофана и отчасти с прямыми эффектами катаболитов триптофана.

Отмечалось, что TDO, фермент разрушающий триптофан, оказывает иммуносупрессивное действие.

Ингибиторы TDO и IDO предложены для усиления иммунного отторжения опухоли и улучшения эффективности иммунотерапии злокачественных опухолей.

#### **Краткое описание изобретения**

IDO является цитозольным ферментом, поэтому разрушение триптофана под действием IDO происходит внутри клетки. Однако, по мере того как триптофан проходит через плазматическую мембрану благодаря специфическим переносчикам, клетки начинают работать как слив для триптофана, что приводит к возникновению вокруг клеток опухоли микросреды с низким содержанием триптофана. Катаболизм триптофана, опосредованный индолеамин 2,3-диоксигеназой (IDO), является важным механизмом периферической иммунной толерантности, способствующим ускользанию опухоли от иммунного ответа из-за истощения триптофана в микросреде опухоли. Желательно получить Т-клетки, которые были бы способны нацеливаться на злокачественные клетки и которые были бы устойчивы к действию иммунорегуляторной микросреды опухоли, в которой происходит катаболизм триптофана.

Авторы настоящего изобретения создали способ, благодаря которому могут быть получены Т-клетки с резистентностью к пролиферативной блокаде после воздействия условий с низким содержанием триптофана, в частности, вызванных опухолью, экспрессирующей фермент(ы) IDO или TDO, и способ предусматривает получение Т-клеток, сверхэкспрессирующих SLC1A5, изоформу SLC1A5 или альтернативный переносчик триптофана или глутамина.

На основании компонентов Т-клеточных рецепторов (TCR) Т-клетки делят на две группы. Гетеродимерный TCR может содержать  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепь. TCR с  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями распознает чужеродные антигены посредством пептидов, презентируемых молекулами MHC на антиген-презентирующих клетках. Альтер-

нативно, гетеродимерный TCR может содержать  $\alpha$ - и  $\delta$ -цепь. TCR, содержащие  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепи, ( $\gamma\delta$  TCR) не зависят от МНС.

Для полной активации Т-клетки, которая приводит к эффективному уничтожению клеток-мишеней, требуется возникновение продуктивного сигнала 1 и сигнала 2. После получения сигнала 1 от TCR/CD3, возникает сигнал 2 от ко-стимулирующих молекул, например, CD28.

Подходящей Т-клеткой можно считать клетку, которая экспрессирует  $\alpha\beta$  TCR или  $\gamma\delta$  TCR. Соответственно, Т-клетка может быть гамма-дельта ( $\gamma\delta$ ) Т-клеткой, которая экспрессирует TCR с любой парой гамма-дельта TCR,  $V_{\gamma}$  1-9 и  $V_{\delta}$  1-8. Т-клетка с цепями  $\gamma\delta$  может иметь подтип  $V_{\gamma}9V_{\delta}2$ .

Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к Т-клетке, сверхэкспрессирующей SLC1A5, изоформу SLC1A5 или альтернативный переносчик триптофана или глутамина. Альтернативные переносчики могут включать в себя другие представители семейства переносчиков с высокой аффинностью к глутамату и нейтральным аминокислотам

(SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3,

SLC1A4, SLC1A5, SLC1A6, SLC1A7),

тяжелые субъединицы гетеродимерных переносчиков аминокислот (SLC3A1, SLC3A2), представители семейства натрий- и хлорид-зависимых натрий:нейромедиатор симпортеров

(SLC6A1, SLC6A2, SLC6A3,

SLC6A4, SLC6A5, SLC6A6, SLC6A7, SLC6A8, SLC6A9, SLC6A10,

SLC6A11, SLC6A12, SLC6A13, SLC6A14, SLC6A15, SLC6A16, SLC6A17,

SLC6A18, SLC6A19, SLC6A20)

или представители гликопротеин-связанного семейства переносчиков катионных аминокислот

(SLC7A1,

SLC7A2, SLC7A3, SLC7A4, SLC7A5, SLC7A6, SLC7A7, SLC7A8, SLC7A9,

SLC7A10, SLC7A11, SLC7A13, SLC7A14).

Как понятно специалисту в данной области, например, как описано в статье Timosenko et al., "Nutritional Stress induced by tryptophan-degrading enzymes results in ATF4-dependent reprogramming of the amino acid transporter profile in tumor cells", Cancer Res. 2016 76 (21): 6193-6204, известно, что SLC1A5 существует в форме полноразмерного переносчика (длинный SLC1A5 (SLC1A5-L)) и в форме укороченных вариантов сплайсинга, включая средний SLC1A5 (SLC1A5-M) и короткий SLC1A5 (SLC1A5-S).

Соответственно, Т-клетки могут экспрессировать SLC1A5, изоформу SLC1A5 или переносчик триптофана и глутамина, необязательно, где переносчик выбран из семейства переносчиков глутамата и нейтральных аминокислот

(SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3, SLC1A4, SLC1A5, SLC1A6, SLC1A7);

тяжелых субъединиц гетеродимерных переносчиков аминокислот (SLC3A1, SLC3A2);

представителя семейства натрий- и хлорид-зависимых натрий:нейромедиатор симпортеров

(SLC6A1, SLC6A2, SLC6A3,

SLC6A4, SLC6A5, SLC6A6, SLC6A7, SLC6A8, SLC6A9, SLC6A10,

SLC6A11, SLC6A12, SLC6A13, SLC6A14, SLC6A15, SLC6A16, SLC6A17,

SLC6A18, SLC6A19, SLC6A20)

или представителя связанного с гликопротеином семейства переносчиков катионных аминокислот

(SLC7A1, SLC7A2, SLC7A3, SLC7A4, SLC7A5, SLC7A6, SLC7A7, SLC7A8,

SLC7A9, SLC7A10, SLC7A11, SLC7A13, SLC7A14)

с уровнем экспрессии по меньшей мере в два, по меньшей мере в три, по меньшей мере в четыре, по меньшей мере в пять, по меньшей мере в шесть, по меньшей мере в семь, по меньшей мере в восемь, по меньшей мере в девять, по меньшей мере в десять, по меньшей мере в 20, по меньшей мере в 50, по меньшей мере в 100 раз превышающей уровень экспрессии, обычно отмечаемый у Т-клетки. Уровни экспрессии эндогенного SLC1A5 или альтернативных переносчиков триптофана или глутамина в немодифицированных Т-клетках могут быть определены с использованием таких методик как вестерн-блоттинг или проточная цитометрия и сравнены с уровнями в генетически модифицированных Т-клетках.

Соответственно, Т-клетки могут экспрессировать SLC1A5, изоформу SLC1A5 или переносчик триптофана и глутамина, необязательно, где переносчик выбран из семейства переносчиков глутамата и нейтральных аминокислот

(SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3, SLC1A4, SLC1A5, SLC1A6, SLC1A7);

тяжелых субъединиц гетеродимерных переносчиков аминокислот (SLC3A1, SLC3A2);

представителя семейства натрий- и хлорид-зависимых натрий:нейромедиатор симпортеров

(SLC6A1, SLC6A2, SLC6A3,  
SLC6A4, SLC6A5, SLC6A6, SLC6A7, SLC6A8, SLC6A9, SLC6A10,  
SLC6A11, SLC6A12, SLC6A13, SLC6A14, SLC6A15, SLC6A16, SLC6A17,  
SLC6A18, SLC6A19, SLC6A20)

или представителя связанного с гликопротеином семейства переносчиков катионных аминокислот  
(SLC7A1, SLC7A2, SLC7A3, SLC7A4, SLC7A5, SLC7A6, SLC7A7, SLC7A8,  
SLC7A9, SLC7A10, SLC7A11, SLC7A13, SLC7A14)

с уровнем экспрессии по меньшей мере в два, по меньшей мере в три, по меньшей мере в четыре, по меньшей мере в пять, по меньшей мере в шесть, по меньшей мере в семь, по меньшей мере в восемь, по меньшей мере в девять, по меньшей мере в десять, по меньшей мере в 20, по меньшей мере в 50, по меньшей мере в 100 раз превышающей уровень экспрессии, обычно отмечаемый у активированной Т-клетки.

Соответственно, Т-клетка может быть гамма-дельта Т-клеткой. В вариантах осуществления гамма-дельта Т-клетки могут быть активированы (то есть, они пролиферируют быстрее и секретируют цитокины). Т-клетка может быть альфа-бета Т-клеткой. Альфа-бета Т-клетка может быть активирована. Т-клетка может быть гамма-дельта или альфа-бета Т-клеткой, содержащей переносчик SLC1A5 или его изоформу и/или переносчик глутамин или триптофана вместе с химерным антигенным рецептором (CAR), способным связываться с опухолевым антигеном. Соответственно, CAR может быть CAR, дающим ответ только на сигнал 1, например, на домен CD3зета, или ответ на сигнал 1 и сигнал 2, например, на домен CD3зета и ко-стимулирующий домен, если внеклеточная часть CAR связывается с антигеном. Такие CAR могут быть использованы для применения вместе с альфа-бета Т-клетками. CAR может быть костимуляторным CAR и отвечать только на сигнал 2 при связывании с антигеном, как описано WO2016/166544. CAR, который отвечает только на сигнал 2, например, на ко-стимулирующий домен, может эффективно использоваться с гамма-дельта Т-клетками, когда сигнал 1 может быть вызван связыванием Т-клеточного рецептора (TCR) и гамма-дельта Т-клетки при распознавании антигена TCR.

Соответственно, Т-клетка может быть альфа-бета или гамма-дельта Т-клеткой, которая сверхэкспрессирует SLC1A5 или его изоформу и/или переносчик глутамин или триптофана вместе с химерным антигенным рецептором (CAR), который способен специфически связываться с антигеном заболевания.

Соответственно, Т-клетка может быть гамма-дельта ( $\gamma\delta$ ) Т-клеткой, которая экспрессирует TCR любой пары гамма-дельта TCR,  $V_{\gamma}$  1-9 и  $V_{\delta}$  1-8, и которая экспрессирует SLC1A5, или ее изоформу и/или переносчик глутамин и триптофана вместе с химерным антигенным рецептором (CAR), который способен специфически связываться с антигеном заболевания. Т-клетка  $\gamma\delta$  может иметь подтип  $V\gamma9V\delta2$ .

Гамма-дельта Т-клетки могут содержать переносчик глутамин и/или триптофана, такой как SLC1A5 и CAR. Подходящий CAR может быть классическим или не перестраиваемым CAR (CAR, который может давать сигнал 1 и сигнал 2). Классический CAR состоит из внеклеточного антиген-связывающего домена, шарнирной области, трансмембранного домена, одного или нескольких ко-стимулирующих доменов (дающих сигнал 2) и домена активации, вызывающего сигнал 1, например CD3зета. В вариантах осуществления CAR может быть ко-стимулирующим CAR, включающим только ко-стимулирующие домены, но не включающим домен активации, вызывающий сигнал 1 (так, чтобы при связывании с CAR происходит только ко-стимулирующий сигнал (сигнал 2) (то есть сигнал 1 не возникает при активации только ко-стимулирующего CAR)). В таких вариантах осуществления второй рецептор, присутствующий на Т-клетке, такой как Т-клеточный рецептор (TCR), может давать сигнал 1 для синергизма сигнала 1 и сигнала 2 в отношении активации Т-клетки.

SLC1A5 может быть сверхэкспрессирован самостоятельно или в сочетании с SLC7A5 и SLC3A2 с образованием переносчика LAT1, что дополнительно активирует поглощение триптофана Т-клеткой.

Соответственно, Т-клетка может экспрессировать SLC1A5 и/или переносчик глутамин или триптофана с уровнем экспрессии по меньшей мере в два, по меньшей мере в три, по меньшей мере в четыре, по меньшей мере в пять, по меньшей мере в шесть, по меньшей мере в семь, по меньшей мере в восемь, по меньшей мере в девять, по меньшей мере в десять, по меньшей мере в 20, по меньшей мере в 50, по меньшей мере в 100 раз превышающей уровень экспрессии, обычно отмечаемый у Т-клетки.

Соответственно, Т-клетка может экспрессировать SLC1A5 и/или переносчик глутамин или триптофана с уровнем экспрессии по меньшей мере в два, по меньшей мере в три, по меньшей мере в четыре, по меньшей мере в пять, по меньшей мере в шесть, по меньшей мере в семь, по меньшей мере в восемь, по меньшей мере в девять, по меньшей мере в десять, по меньшей мере в 20, по меньшей мере в 50, по меньшей мере в 100 раз превышающей уровень экспрессии, обычно отмечаемый у активированной Т-клетки. Сверхэкспрессия может быть вызвана любым методом, известным в данной области. Соответственно, сверхэкспрессия позволяет модифицированной Т-клетке эффективно функционировать в микро-среде с низким содержанием триптофана, например, в микро-среде с низким содержанием триптофана, как обнаружено вокруг некоторых опухолевых клеток.

Модифицированная  $\gamma\delta$  Т-клетка, адаптированная к работе в микросреде с низким содержанием триптофана, в которой происходит катаболизм триптофана, может содержать химерный антигенный рецептор, который содержит внеклеточный антигенный связывающий домен со специфичностью связывания с антигеном заболевания, трансмембранный домен, и

(i) по крайней мере одну ко-стимулирующую сигнальную область (способную давать сигнал 2, но не способную давать сигнал 1) и сигнальную область, не дающую сигнал 1, например, CD3дзета (для получения "ко-стимулирующего" или "настраиваемого" CAR), или

(ii) домен активации/сигнальный домен CD3дзета (способный давать сигнал 1), или

(iii) по крайней мере одну ко-стимулирующую сигнальную область и домен активации CD3 дзета (классический CAR, способный давать сигнал 1 и сигнал 2)/сигнальный домен.

Соответственно, если последовательность нуклеиновой кислоты CAR содержит домен CD3дзета, то CAR считается "классическим" или "не настраиваемым". В вариантах осуществления, когда CAR содержит только ко-стимулирующие домены, его можно рассматривать как "ко-стимулирующий" или "TCR-настраиваемый" CAR.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, "классический" или "ко-стимулирующий", может содержать одноцепочечный фрагмент на основе переменных областей (scFv), распознающий связанный с заболеванием антиген или опухолевый антиген, или белок, или углевод, или липид, или низкомолекулярную молекулу.

Антигенсвязывающий домен CAR может принимать множество форм, в том числе (но не ограничиваясь этим), форму одноцепочечного фрагмента на основе переменных областей (scFv), полученного из антитела, наночастицы, последовательности фактора роста, синтетической последовательности на основе растворимого фактора, последовательности на основе фактора, который связывается с рецептором есто-домена или внеклеточным доменом рецептора на поверхности клетки, который затем конъюгирует с трансмембранным и ко-стимулирующим доменами, как описано выше.

Соответственно, антигеном заболевания может быть вирусный антиген.

Антиген заболевания может быть мишенью на поверхности клетки или антигеном опухоли, инфицированной клетки, бактериально инфицированной клетки, клетки, инфицированной грибом или простейшим, или может быть активным или инактивированным вирусным фрагментом, пептидом, белком, антигенным сегментом или тому подобное такого вируса. Мишень на поверхности клетки может включать опухоль-специфический антиген и/или опухоль-связанный антиген.

Соответственно, внеклеточный антиген-связывающий домен может распознавать и связаться с опухолеспецифическим антигеном или антигеном заболевания, который присутствует только на опухолевых клетках/клетках заболевания, и не связывается с любыми другими клетками и/или антигенами заболевания, которые присутствуют на некоторых клетках заболевания, а также на некоторых здоровых клетках. Такие антигены заболевания могут включать, но не ограничиваться ими, CD19, EGFR, EGFRvIII, ErbB2, GM3, GD2, GD3, CD20, CD22, CD30, CD37, CD38, CD70, CD75, CD79b, CD33, CD138, gp100, NY-ESO-1, MICA, MICB, MART1, AFP, ROR1, ROR2, PSMA, PSCA, мутированный Ras, p53, B-Raf, c-met, VEGF, карбоангидразу IX, WT1, эмбриональный опухолевый антиген, CA-125, MUC-1, MUC-3, антиген эпителиальной опухоли и антиген по типу MAGE, включая MAGEA1, MAGEA3, MAGEA4, MAGEA12, MAGEC2, BAGE, GAGE, XAGE1B, CTAG2, CTAG1, SSSX2 или LAGE1 или вирусные антигены или их комбинации, или посттрансляционно модифицированные белки, которые могут включать, но не ограничиваются ими, карбамилированные и цитрунированные белки.

Антиген на поверхности клетки может быть иммунным лигандом контрольной точки, например, PD-L1 или PD-L2.

Трансмембранный домен CAR может содержать один или несколько трансмембранных доменов CD3 или CD4, или CD8, или CD28, или их части.

В ко-стимулирующей сигнальной области CAR может содержать, например, один или несколько внутриклеточных доменов, дающих сигнал 2, из CD28, CD137 (4-1BB), ICOS, CD27, OX40, LFA1, PD-1, CD150, CD154, CD244, NKG2D, DNAX-активированного белка (DAP)-10, DAP-12, LIGHT, Fc-рецептор у-цепи, у-цепи обычного IL-2, рецептора IL-12.

Согласно второму аспекту изобретения, заявлен способ лечения злокачественного новообразования, соответственно, злокачественного новообразования у млекопитающего, предпочтительно, у человека, включающий введение эффективного количества Т-клетки первого аспекта изобретения.

Согласно третьему аспекту изобретения, заявлена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая SLC1A5, изоформу SLC1A5 или переносчик триптофана или глутамина, функционально связанный с контрольными последовательностями, адаптированными для экспрессии Т-клетки, трансформированной нуклеиновой кислотой, переносчика кодированного триптофана или глутамина, например SLC1A5.

Последовательность нуклеиновой кислоты для экспрессии SLC1A5, изоформы SLC1A5 или переносчика триптофана или глутамина может содержать следующие элементы;

промотор, например, но им не ограничиваясь, CMV, EF1 $\alpha$ , MSCV, PGK, CAG, IRES или UBC по-

следовательность нуклеиновой кислоты SLC1A5, изоформы SLC1A5 или переносчика триптофана или глутамина, соответственно, включающую N-концевую последовательность Козака;

последовательность РНК сплайсера/полиаденилирования, например, но не ограничиваясь ими, BGH или SV40.

В вариантах осуществления, если Т-клетка содержит CAR, то последовательность SLC1A5, изоформы SLC1A5 или переносчика триптофана или глутамина могут быть функционально связаны с отдельным промотором, а не с промотором CAR, с получением двух независимых мРНК. Соответственно, экспрессия CAR и переносчика, кодируемого последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей переносчик, может быть осуществлена путем транскрипции под контролем общего двунаправленного промотора с получением двух независимых мРНК. В качестве альтернативы, экспрессия CAR и последовательности переносчика может быть осуществлена путем транскрипции под контролем одного промотора и встраивания внутреннего сайта связывания рибосомы (IRES) между двумя кодирующими последовательностями с получением одной мРНК, способной транслировать два белка. Соответственно, последовательность CAR и переносчика могут быть разделены саморасщепляемой последовательностью T2A, давая одиночную мРНК под контролем общего промотора, транслируемую в один полипептид, который будет котрансляционно расщеплен с получением двух белков.

Согласно четвертому аспекту настоящего изобретения, заявлен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту третьего аспекта изобретения.

Можно использовать любой вектор, подходящий для введения нуклеиновой кислоты, которая может осуществлять сверхэкспрессию последовательности нуклеиновой кислоты SLC1A5, изоформы SLC1A5 или переносчика триптофана или глутамина. Скелет вектора может содержать точку начала репликации бактериального происхождения, например, pBR322, и селективируемый маркер резистентности к антибиотику, например, но ими не ограничиваясь, ген бета-лактамазы, обеспечивающий резистентность к антибиотику ампициллину, чтобы обеспечить достаточное количество плазмидной ДНК в бактериальном хозяине. Необязательно, вектор может содержать бактериальные и фаговые сайты присоединения (attB и attP) интегразы, такие как phiC31, в комбинации с сайтами распознавания эндонуклеазы, такими как I-SceI, чтобы обеспечить получение миниколоний, лишенных бактериального скелета. Вектор также может содержать последовательность, которая кодирует SLC1A5 или ее изоформу, или, альтернативно, переносчик триптофана или глутамина, связанный с подходящей промоторной последовательностью, для экспрессии в интересующей клетке-мишени, наиболее предпочтительно, в Т-клетке. Необязательно, вектор может содержать ген резистентности к антибиотику для положительной селекции в клетках млекопитающих, а также может содержать репортерный ген для идентификации экспрессии, например, но не ограничиваясь им, зеленый белок флуоресценции (GFP). Экспрессия дополнительного репортерного и/или гена селекции может быть под контролем отдельных промоторов, двунаправленного промотора или осуществляться с помощью IRES или само-расщепляющейся последовательности T2A.

Согласно пятому аспекту настоящего изобретения, заявлена Т-клетка-хозяин, трансформированная нуклеиновой кислотой третьего аспекта или вектором четвертого аспекта настоящего изобретения.

Способ генетической модификации Т-клетки для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей SLC1A5 или альтернативный переносчик триптофана или глутамина, может включать любую методику, известную специалистам в этой области.

Подходящие способы включают, но не ограничиваются ими, вирусную трансдукцию вирусами, например, лентивирусами/ретровирусами/аденовирусами, клеточную трансфекцию нуклеиновых кислот путем электропорации, нуклеофекции, липидными реагентами для трансфекции, наночастицами, хлоридом кальция на основе методов трансфекции или транспозонами на основе бактерий, ДНК-транспозонами и ретротранспозонами, методики TALENS или системы CRISPR/Cas9.

Соответственно, генетическая информация, вводимая для модификации Т-клетки, может иметь форму ДНК (кДНК, плазмиды, линейной, эписомальной, микророльцевой), РНК или *in vitro* экстракорпорально транскрибируемой (IVT) РНК. Кроме генетической информации, кодирующей переносчик(и) и/или последовательности CAR, генетическая информация также может кодировать белки/ферменты/последовательности, необходимые для интеграции генетической информации в геном хозяина.

Если для трансдукции используют лентивирусы/ретровирусы/аденовирусы, то для усиления этого процесса можно использовать введение химических реагентов, как понятно специалистам в данной области. К этим агентам относятся, например, но ими не ограничиваясь, гексадиметрин бромид (полибрен), фибронектин, рекомбинантный фибронектин человека (например, RetroNectin-Takare Clonthech), DEAE-декстран и усилитель вирусной трансдукции TransPlus (ALSTEM Cell Advancements).

Соответственно, введение нуклеиновых кислот, кодирующих переносчик и/или CAR, может осуществляться в Т-клетки, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), мононуклеарные клетки пуповинной крови (CBMC) или размноженные Т-клетки тканей в любой момент времени в течение процесса культивирования.

Согласно шестому аспекту настоящего изобретения, заявлен способ культивирования Т-клеток, так, чтобы они экспресировали нуклеиновую кислоту третьего аспекта или вектор четвертого аспекта, спо-

собные экспрессировать переносчик. Необязательно, в одном из вариантов осуществления способ культивирования клетка-хозяина дополнительно включает восстановление Т-клетки из среды для культивирования клеток.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения, заявлен способ доставки Т-клетки по настоящему изобретению в опухолевую клетку, экспрессирующую SLC1A5, изоформу SLC1A5 или переносчик глутамин или триптофана, причем микросреда вокруг опухолевой клетки истощена по триптофану. Соответственно в вариантах осуществления истощение по триптофану может приводить по крайней мере к однократному, по крайней мере к двукратному, по крайней мере к трехкратному и по крайней мере к четырехкратному, по крайней мере к пятикратному уменьшению триптофана, по сравнению с обычной клеточной микросредой, окружающей клетку в животном-хозяине. Для оценки истощения по триптофану, можно контролировать экспрессию подходящего переносчика, например, с помощью проточной цитометрии, вестерн блоттинга, иммуноцитохимии, кПЦР или тому подобного и с помощью их комбинаций.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения, заявлена композиция, содержащая Т-клетку по настоящему изобретению, вместе с терапевтическим средством, в частности, с противораковым средством.

Соответственно, терапевтическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из атомов радионуклеотида, бора, гадолиния или урана, иммуномодулятора, иммуноконъюгата, цитокина, гормона, агониста гормона, фермента, ингибитора фермента, фотоактивного терапевтического средства, цитотоксического лекарственного средства, токсина, ингибитора ангиогенеза, ингибитора контрольной точки иммунного ответа, терапевтического антитела, конъюгата "антитело-лекарственное средство" (ADC) или их комбинации.

Терапевтическое средство может содержать иммуноконъюгат/ADC, содержащий цитотоксическое лекарственное средство. Подходящим цитотоксическим средством может быть лекарственное средство, пролекарство, фермент или токсин.

В вариантах осуществления способ лечения злокачественного новообразования у индивида, соответственно, млекопитающего, в частности человека, может включать лечение индивида терапевтически эффективным количеством Т-клетки по настоящему изобретению. В вариантах осуществления Т-клетка может находиться в терапевтически эффективном составе Т-клеток в дозе  $1 \times 10^4$  клеток на кг массы тела, более  $5 \times 10^8$  клеток на кг массы тела индивида на дозу.

В вариантах осуществления способ может включать многократное введение терапевтически эффективного состава Т-клеток.

В вариантах осуществления злокачественное новообразование, на которое направлено лечение, может быть выбрано (но этим не ограничивается) из рака почек, мозга, яичников, шейки матки, легких, мочевого пузыря, пищевода, колоректального рака, рака кожи, меланомы, лейкоза, миеломы, лимфомы, рака кости, гепатоцеллюлярного рака, рака эндометрия, поджелудочной железы, матки, головы и шеи, слюнной железы, груди, простаты или толстой кишки.

Как используется в настоящем документе, термина SLC1A5 может относиться к переносчику нейтральной аминокислоты, предпочтительно, аминокислоты с цвиттер-ионами. Соответственно, переносчик может связывать нейтральную аминокислоту в качестве субстрата, включая глутамин, аспарагин и аминокислоту с разветвленной цепью, и ароматические аминокислоты. Переносчик также может связывать метилированные, анионные и/или катионные аминокислоты.

SLC1A5 также может называться ASCT2 или ATBO и может работать как натрий-зависимый переносчик аминокислот.

В вариантах осуществления, SLC1A5 может представлять собой R16, AAAT, NZA1, RDRC, ASCT-T и N7BS1. SLC1A5 также может быть обозначен как 5-ый член 1-ого семейства растворимых носителей, 5-ый член 1-ого семейства растворимых носителей (переносчики нейтральных аминокислот), натрий-зависимый переносчик нейтральных аминокислот 2-ого типа, RD114/рецептор ретровируса типа D обезьян, рецептор вируса M7 бабуина, ATB(0), ASCT2, M7V1, RDRC, переносчик нейтральных аминокислот B(0), переносчик нейтральных аминокислот B, рецептор вируса RD114, M7VS1, AAAT, ATBO, R16 и RDR.

Последовательность нуклеиновой кислоты SLC1A5 человека доступна на веб-сайтах NIHNCBI с номером доступа BC000062. В вариантах осуществления аминокислотная последовательность может быть под номером доступа AAN00062.1.

Вариант SLC1A5 может быть по крайней мере на 80%, по крайней мере на 85%, по крайней мере на 90%, по крайней мере на 95%, по крайней мере на 96%, по крайней мере на 97%, по крайней мере на 98%, по крайней мере на 99% или на 100% идентичен последовательности AAN00062.1. Понятно, что такой вариант должен кодировать белок, который может действовать в качестве переносчика, в частности, для усиления захвата триптофана в модифицированную Т-клетку. Как указано, SLC1A5 существует в усеченных изоформах. Соответственно, заявлены варианты, которые представляют собой фрагменты SLC1A5, которые могут соответствующим образом кодировать белок, который может действовать в ка-

честве переносчика. Скрининг функциональной активности может быть использован для определения подходящих белков с делециями на N-конце или C-конце, кодируемых такими вариантами фрагментов SLC1A5.

Соответствующий вариант гена SLC1A5 человека может быть получен с помощью гомолога другого животного, например мыши или крысы, или тому подобного. Соответственно, такие гомологи могут иметь гомологию по последовательности, составляющую не менее 80%, не менее 85%, не менее 90%, не менее 95%, не менее 96%, не менее 97%, не менее 98% или не менее 99%.

Гомология определяется как процент остатков в аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновых кислот, которые идентичны у варианта и SLC1A5, как описано в настоящем документе, после выравнивания последовательностей и введения пропусков, при необходимости, для получения максимального процента гомологии.

Методы и компьютерные программы для выравнивания и поиска гомологии и идентичности последовательностей хорошо известны в данной области.

Как используется в настоящем документе, вариант SLC1A5 может включать модификации в аминокислотных последовательностях SLC1A5, где варианты получают путем введения соответствующих нуклеотидных изменений в нуклеиновой кислоте, кодирующей переносчик SLC1A5. Модификации могут включать в себя делеции, инсерции, замены или тому подобное. Соответственно, могут быть сделаны аминокислотные изменения, и эти аминокислотные изменения включают делеции, инсерции и/или замены, или изменения, которые предусматривают изменения пост-трансляционных процессов модификации переносчика SLC1A5, например, модификации числа и/или положений сайтов гликозилирования.

Соответственно, для определения места для подходящих аминокислотных замен можно использовать способы, такие как скрининг на аланиновые мутации. Такой скрининг можно использовать в сочетании с функциональным скринингом на определение места, где замены, делеции и инсерции обеспечат соответствующую функциональную активность вариантов полипептидов.

Варианты полипептидов могут также включать модификации на C- или N-конце полипептида. Как известно в данной области, могут быть сделаны подходящие замены нуклеиновых кислот, кодирующих аминокислоты, или замены аминокислот, приводящие к консервативным заменам, при этом консервативными заменами являются замены на сходные аминокислоты, на основании общих свойств боковых цепей, например, гидрофобные, нейтральные, гидрофильные, кислые, основные, расположение цепи или ароматические остатки.

Соответственно, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей переносчика, могут быть получены различными способами, известными в данной области. Эти способы могут включать, но ими не ограничиваются, получение с помощью сайт-направленного мутагенеза, мутагенеза с помощью ПЦР, касетного мутагенеза или тому подобного.

В вариантах осуществления, "терапевтически эффективный" означает количество Т-клеток, эффективное для лечения заболевания или расстройства у млекопитающего, в частности, злокачественного новообразования. "Терапевтически эффективным" количеством в контексте Т-клеток и злокачественного новообразования может быть количество Т-клеток, необходимое для уменьшения числа злокачественных клеток, например, уменьшения размера опухоли, ингибирования или замедления деления злокачественных клеток или остановки инфильтрации злокачественных клеток в периферические органы, ингибирования, замедления или остановки метастазирования опухоли, ингибирования, замедления или остановки роста злокачественного новообразования и/или ингибирования, замедления или исчезновения одного или нескольких симптомов, связанных со злокачественным новообразованием.

Соответственно, введение терапевтически эффективного количества Т-клеток может препятствовать росту и/или уничтожать существующих злокачественные клетки. Для терапии рака терапевтически эффективное количество может, например, быть измерено путем оценки времени до прогрессирования заболевания и/или путем определения скорости реакции на лечение. Соответственно, кроме введения Т-клеток могут быть применены другие противораковые способы лечения.

Термин "злокачественное новообразование", как используется в настоящем документе, относится к физиологическому состоянию млекопитающих, в частности людей, характеризующемуся нерегулируемым ростом клеток.

В вариантах осуществления, клетки могут включать в себя доброкачественные, предраковые, злокачественные, метастатические, неметастатические клетки. Примеры злокачественного новообразования включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Соответственно, злокачественные новообразования могут включать плоскоклеточный рак, рак легких, в том числе мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого, злокачественное новообразование брюшной полости, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка, в том числе рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак прямой кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнных желез, рак почек, рак простаты, рак влага-



лица, рак щитовидной железы, гепатокарциному, карциному заднего прохода, рак полового члена, а также рак головы и шеи.

Соответственно, ответ опухоли может быть оценена по изменению в морфологии опухоли, например, по распространенности опухоли, размеру опухоли и тому подобное, или с помощью МРТ-сканирования, рентгеновского сканирования, КТ-сканирования, костной визуализации или биопсии.

В настоящем документе, выделенной молекулой нуклеиновой кислоты может быть молекула нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена по крайней мере от одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана с природным источником нуклеиновой кислоты. Выделенные нуклеиновые кислоты могут также включать нуклеиновые кислоты, которые находятся в другой форме или в другом окружении, чем в природе.

Выделенная нуклеиновая кислота также включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетке, которая обычно экспрессирует нуклеиновую кислоту, но которая находится в другом месте в клетке, например, в другом хромосомном расположении.

Контрольные последовательности, используемые в настоящем документе, относятся к последовательностям ДНК, экспрессирующим функционально связанную кодирующую последовательность в организме хозяина. Соответственно, контрольные последовательности подходят для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в Т-клетке.

Нуклеиновая кислота, которая функционально связана, как используется в настоящем документе, является нуклеиновой кислотой, которая находится в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК секреторной лидерной последовательности функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессирована в виде пробелка, который обеспечивает секрецию полипептида. Промотор или энхансер функционально связаны с кодирующей последовательностью, если они влияют на транскрипцию кодирующей последовательности.

Другой аспект настоящего изобретения может включать химиотерапевтическое средство, цитотоксическое средство, цитокин, ингибитор роста, антигормональное средство, антиангиогенное средство и Т-клетку по настоящему изобретению, образуя композицию, в которой компоненты композиции доставляются одновременно, последовательно или раздельно в комбинации с количеством, эффективными для заявленной цели.

В вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению может быть введена после проведения тестирования индивида или опухолевой клетки, взятой у индивида, на определение наличия вокруг опухолевой клетки микросреды обедненной по триптофану.

Соответственно, заявлен способ лечения опухолей, экспрессирующих IDO или TDO, включающий стадии получения Т-клетки или композиции по настоящему изобретению индивиду с опухолевыми клетками, экспрессирующими повышенный уровень IDO или TDO, необязательно, способ может включать в себя стадию обнаружения наличия повышенной экспрессии IDO или TDO в опухолевой клетке.

В соответствии с еще одним аспектом заявлен способ экспрессии химерного рецептора антигена, например, химерного антигенного рецептора, выбранного из "классического" или "ко-стимулирующего CAR", одновременно с переносчиком глутамин и/или триптофана, включающий стадии введения генетической информации, кодирующей подходящий CAR со специфичностью связывания с антигеном-мишенью или антигеном заболевания, и переносчик глутамин и/или триптофана, содержащейся в независимых векторах/конструкциях или в одной и той же конструкции. Последовательность SLC1A5, изоформа SLC1A5 или переносчик триптофана или глутамин могут находиться под контролем промотора CAR с получением двух независимых мРНК. Экспрессия последовательности CAR и переносчика может быть осуществлена путем транскрипции с общего двунаправленного промотора с получением двух независимых мРНК. Экспрессия последовательности CAR и переносчика может быть осуществлена путем транскрипции с одного промотора и встраивания IRES между двумя кодирующими последовательностями с получением одной мРНК, способной транслировать два белка. Последовательность CAR и переносчика могут быть разделены само-расщепляемой последовательностью T2A, давая одну мРНК под контролем общего промотора, транслируемую один полипептид, который будет котрансляционно расщеплен с получением двух белков.

Соответственно, заявлена Т-клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор и переносчик глутамин и/или триптофана.

Соответственно, заявлен способ селекции Т-клетки, которая способна к пролиферации в условиях с низким содержанием триптофана и/или глутамин. Способ селекции может включать стадии выращивания Т-клеток, сверхэкспрессирующих SLC1A5 (или, альтернативно, сверхэкспрессирующих переносчик), в культуральной среде для роста, которая содержит субоптимальные уровни L-триптофана, например, L-триптофан в концентрации менее 5 мкМ. Клетки, экспрессирующие соответствующий переносчик, также могут быть обогащены путем деления клеток в культуральной среде для роста, содержащей субоптимальные уровни L-глутамин, например, L-глутамин в концентрации менее 3 мкМ. Также можно использовать культуральную среду для роста, которая содержит субоптимальные уровни L-триптофана и L-глутамин. Альтернативно, клетки, экспрессирующие переносчик, могут быть обогащены путем деления клеток в культуральной среде для роста, которая содержит ингибитор SLC1A5, такой как O-бензил-

L-серин, для имитации условий с низким содержанием триптофана. Такие условия для роста обеспечивают методику, с помощью которой Т-клетки, экспрессирующие генетически введенный переносчик, могут делиться и быть отобраны среди других популяций в клеточной культуре, тем самым проводя селекцию с пролиферацией немодифицированных Т-клеток.

В вариантах осуществления Т-клетка, сверхэкспрессирующая химерный рецептор антигена и переносчик глутамин или триптофана, может быть отобрана путем культивирования клеток в среде с низкой концентрацией триптофана и/или с низким содержанием глутамин, или в присутствии ингибитора SLC1A5, такого как О-бензил-L-серин.

В вариантах осуществления для селекции Т-клеток, которые способны пролиферировать в условиях низкого содержания триптофана и/или глутамин можно использовать антитело со специфичностью связывания к переносчику глутамин и/или триптофана. Соответственно, антитело может быть выбрано из анти-SLC1A5, анти-SLC7A5, анти-LAT1 или анти-SLC3A2.

В вариантах осуществления антитело, направленное против переносчика, сверхэкспрессированного на модифицированных Т-клетках, которые вводятся индивиду в терапевтических целях, может быть введено индивиду отдельно, безопасным механизмом, при котором можно нейтрализовать введенные модифицированные Т-клетки в случае неблагоприятной реакции на лечение. Такие антитела могут спровоцировать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) для нейтрализации модифицированных Т-клеток. Такие терапевтические антитела могут включать, но не ограничиваются ими, анти-SLC1A5, анти-SLC7A5, анти-LAT1 или анти-SLC3A2.

Любой документ, ссылка, патентная заявка или патент, цитированные в настоящем документе, непосредственно включены в настоящий документ в полном объеме путем ссылки, что означает, что его следует рассматривать как часть этого документа. Тот факт, что документ, ссылка, патентная заявка или патент, цитированные в настоящем документе, не повторяются в настоящем тексте, объясняется лишь соображениями краткости.

Ссылка на цитируемый материал или информацию, содержащуюся в тексте, не должна пониматься как признание того, что этот материал или информация являются частью уровня техники или известны из уровня техники.

Единственное число относятся к одному или нескольким (например, по крайней мере к одному) грамматическим элементам.

"Приблизительно" обычно означает приемлемую степень погрешности для измеряемой величины с учетом характера или точности измерений.

В описании, если контекст не требует иного, под терминами "содержит" или "включает", или такие их варианты, как "содержащий" или "включающий", "содержат" или "включают", подразумевают включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел.

Предпочтительные признаки и варианты осуществления каждого аспекта изобретения являются *mutatis mutandis* для каждого другого аспекта, если контекст не требует иного.

Варианты осуществления настоящего изобретения далее описаны в качестве примера со ссылкой на прилагаемые фигуры.

Фиг. 1 иллюстрирует заявленную конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению, в которой ген SLC1A5 экспрессируется под контролем промотора EF1альфа вместе с сигналом полиаденилирования BGH для стабильности мРНК. Вектор pEF-DEST51 (Life Technologies) также содержит точки начала репликации PUC и ген бета-лактамазы (названный AmpR), придающий резистентность к антибиотику ампициллину для того, чтобы обеспечить достаточное деление плазмидной ДНК в бактериальном хозяине.

Фиг. 2 иллюстрирует А) немодифицированную Т-клетку, в которой SLC1A5 переносит глутамин натрий-зависимым способом, который обеспечивает субстрат для антипортерного комплекса SLC7A5/SLC3A2 (LAT1), который в значительной степени зависит от выхода внутриклеточного глутамин для импорта аминокислот, таких как триптофан. В) Модифицированная Т-клетка, которая сконструирована для сверхэкспрессии SLC1A5 посредством трансфекции или трансдукции Т-клетки вектором, содержащим SLC1A5, вызывая экспрессию SLC1A5 и, таким образом, увеличивая захват глутамин в клетку. Это дает дополнительный субстрат (глутамин) для антипортерного комплекса SLC7A5/SLC3A2 (LAT1), таким образом повышая импорт/захват триптофана.

На фиг. 3 проиллюстрирован пример заявленного режима действия Т-клеток, сверхэкспрессирующих SLC1A5, и показаны (а) опухолевые клетки IDO<sup>+</sup>, которые создают микросреду с низким содержанием триптофана, которая вызывает остановку клеточного цикла, снижение активации и апоптоз цитотоксических Т-клеток. Опухолевые клетки компенсируют условия с низким содержанием триптофана путем активации экспрессии SLC1A5. (В) Если остричь Т-клетку таким же механизмом компенсации как у опухолевых клеток посредством сверхэкспрессии SLC1A5, Т-клетка может реализовывать свою активность в микросреде опухоли с низким содержанием триптофана.

На фиг. 4 проиллюстрирован пример заявленного режима действия Т-клеток, сверхэкспрессирующих SLC1A5 и ко-стимулирующего CAR гама-дельта, и показано (А) Опухолевые клетки IDO<sup>+</sup> создают

микросреду с низким содержанием триптофана, которая вызывает остановку клеточного цикла, снижает активность и апоптоз Т-клеток, экспрессирующих химерный рецептор антигена  $\gamma\delta$ . Опухолевые клетки компенсируют условия с низким содержанием триптофана за счет активации экспрессии SLC1A5, что позволяет повысить импорт триптофана. (B) Если оснастить гамма-дельта-CAR-Т-клетки тем же механизмом компенсации, что и у опухолевой клетки посредством сверхэкспрессии SLC1A5, то гамма-дельта-CAR-Т-клетка будет способна проявлять свою активность в микросреде опухоли с низким содержанием триптофана и вызывать полную цитотоксическую эффекторную функцию путем распознавания фосфоантигенов через  $\gamma\delta$  TCR и антигена заболевания через CAR (или ко-стимулирующий CAR); CAR/SLC1A5  $\gamma\delta$  Т-клетка способна проявлять свою активность и осуществлять клеточную цитотоксичность.

Фиг. 5 иллюстрирует ко-стимулирующую конструкцию CAR, содержащую сигнальный домен секции GMCSF-R, scFv против CD19, петлю CD28, трансмембранный домен и домен активации и домен активации CD137 (4-1BB). Козэкспрессия SLC1A5 такой же конструкцией может быть достигнута либо с помощью С-концевого саморасщепляемого пептида T2A или с помощью внутреннего сайта связывания рибосомы (IRES) перед последовательностью SLC1A5.

Фиг. 6 иллюстрирует эффективность трансдукции и уровни экспрессии SLC1A5 в  $\gamma\delta$  Т-клетках Vдельта2. PBMC были трансдуцированы векторами на основе лентивирусов, несущими SLC1A5-L (номер доступа #NP\_005619.1) или SLC1A5-S (номер доступа #NP\_001138616.1) и последовательности GFP, через 48 часов после их стимуляции золедроновой кислотой. В течение дополнительных 16 дней количество трансдуцированных клеток увеличивали, и процент GFP-позитивных клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. Эффективность трансдукции, измеренная по GFP-позитивным клеткам (%), составила 16,7% (SLC1A5-S) и 20% (SLC1A5-L) (A). Клетки также окрашивали внутриклеточно на SLC1A5 путем фиксации/пермеабилзации и анализировали методом проточной цитометрии. По меньшей мере 97%  $\gamma\delta$  Т-клеток экспрессировали SLC1A5, независимо от трансдукции (с). Однако уровни экспрессии SLC1A5 (измеренные по средней интенсивности флуоресценции, MFI) были выше в  $\gamma\delta$  Т-клетках, трансдуцированных SLC1A5-L (~ в 10 раз) или SLC1A5-S (~1,5 раза), чем в нетрансдуцированных  $\gamma\delta$  Т-клетках (B). Эти данные показывают, что  $\gamma\delta$  Т-клетки, трансдуцированные SLC1A5-L или SLC1A5-S, имеют более высокие уровни экспрессии переносчика.

Фиг. 7 иллюстрирует резистентность к ингибитору SLC1A5 О-бензил-L-серину (BenSer) и полученную позитивную селекцию Vдельта2  $\gamma\delta$  Т-клеток, трансдуцированных лентивирусом, содержащим последовательность SLC1A5-L. PBMC трансдуцировали через 48 ч после стимуляции золедроновой кислотой. Количество клеток увеличивали в среде ALys с или без BenSer максимум 21 дня.

Количество клеток на 2-ой или 3-ей недели анализировали цитометрией в потоке, измеряя выживаемость (используя пропидий йодид) или GFP-положительные  $\gamma\delta$  Т-клетки, для определения преимущества выживаемости трансдуцированных  $\gamma\delta$  Т-клеток при селективном давлении. Через три недели культивирования в присутствии BenSer было обнаружено снижение жизнеспособности нетрансдуцированных  $\gamma\delta$  Т-клеток по сравнению с  $\gamma\delta$  Т-клетками на более ранних стадиях культивирования (от значения 80% на 12-й день до менее 60% на 23-й день) (A). Однако,  $\gamma\delta$  Т-клетки, трансдуцированные изоформой SLC1A5-L, не показали снижения жизнеспособности и приобрели резистентность к BenSer, (A). Кроме того, повышение GFP-позитивных  $\gamma\delta$  Т-клеток было зарегистрировано через две-три недели культивирования в присутствии BenSer по сравнению с контролем (~17% и ~14% увеличение, соответственно (B и C). Таким образом, эти данные показали, что сверхэкспрессия SLC1A5-L делает  $\gamma\delta$  Т-клетки резистентными к BenSer в культурной среде, которая имитирует низкие уровни L-триптофана.

### Примеры

Для компенсации нехватки или истощения триптофана, вызванного экспрессией IDO и TDO, когда опухолевые клетки регулируют экспрессию переносчиков аминокислот, включая SLC1A5 и его усеченные изоформы, которые, в свою очередь, усиливают захват глутамин и триптофана в опухолевую клетку, и вызывая истощение триптофаном микросреды вокруг опухолевой клетки, настоящее изобретение предлагает Т-клетки, которые обладают повышенной экспрессией таких переносчиков аминокислот, включая SLC1A5 и его усеченные изоформы, чтобы позволяет Т-клеткам пролиферировать при таких низких концентрациях триптофана.

В конкретном варианте осуществления, SLC1A5 может быть коэкспрессирован на том же векторе, что и конструкция химерного антигена, которая экспрессируется и презентуется на Т-клетке.

Соответственно, SLC1A5 может быть экспрессирован под контролем промотора или связан с экспрессией рецептора химерного рецептора антигена с помощью внутреннего сайта присоединения в рибосоме (IRES) или расщепляемой последовательности T2A, обеспечивающей одну мРНК под контролем общего промотора, транскрибирующую один полипептид, который будет отщепляться при трансляции с получением двух белков (см. фиг. 5). Как описано в настоящем документе, вектор, в котором находится переносчик SLC1A5, может быть вектором экспрессии млекопитающего, таким как вектор серии Gateway 'DEST' (Life Technologies), лентивирусный вектор может быть таким как pCDH от System Biosciences, вектором транспозона или вектором, подходящим для получения миниколец.

Совместная экспрессия SLC1A5 обладает несколькими преимуществами, а именно:

трансфектированные Т-клетки, экспрессирующие химерный рецептор антигена и SLC1A5, имеют преимущество в росте в условиях низкого содержания триптофана и/или глутамина, и, таким образом, эти условия могут быть использованы для отбора клеток, экспрессирующих как химерный рецептор антигена, так и переносчик;

Т-клетки, экспрессирующие только SLC1A5 или SLC1A5 в сочетании с химерным рецептором антигена, более устойчивы к пролиферативной блокаде после воздействия условий с низким содержанием триптофана, опухолей, экспрессирующих IDO или TDO;

Т-клетки, экспрессирующие только SLC1A5 или SLC1A5 в сочетании с химерным рецептором антигена, могут селективно истощаться после переноса адоптивной клетки с использованием антитела, специфичного для переносчика SLC1A5;

как описано в настоящем документе, Т-клетки, которые имеют преимущество в росте в условиях низкого содержания триптофана и/или глутамина, могут быть отобраны после трансфекции, используя условия с низким содержанием глутамина и/или триптофана в средах для культивирования клеток;

альтернативно, подходящие Т-клетки могут быть позитивно селектированы, используя, например, антитела, способные связываться с SLC1A5 или тому подобное. Например, можно использовать в технологии магнитной сортировки активированных клеток (MACS), флуоресцентной сортировки клеток (FACS) или аналогичные способы, известные специалистам в данной области.

Пример 1.

Получение вектора для трансфекции Т-клетки ДНК, кодирующая длинную изоформу SLC1A5, получали от GeneArt (Life Technologies) в скелете pDONR221 между сайтами рекомбинации attL1 и attL2. В SLC1A5 может быть рекомбинирована в различные подходящие векторы Gateway, используя LR клоназу II и рекомбиназную реакцию (Life Technologies). В этом примере SLC1A5 рекомбинировали в pEF-DEST51, содержащий промотор EF1альфа и сигнальную последовательность полиаденилирования BGH (см. фиг. 1).

Пример 2.

Трансфекция Т-клетки для экспрессии SLC1A5 на уровне, который позволяет Т-клетке преодолевать пролиферативную блокаду Т-клеток в результате снижения концентрации триптофана, например, ниже 5 мкМ.

Проводили электропорацию Т-клеток вектором, описанным в примере 1 с помощью системы электропорации Nucleofection (Lonza) или Neon (ThermoFisher). После восстановления в полной среде (например, IMDM) в течение 24 до 48 ч, Т-клетки культивировали в среде IMDM, содержащей менее 5 мкМ L-триптофана.

Пример 3.

Пример получения длинного изоформного гена SLC1A5 с помощью лентивирусной системы.

Длинный изоформный ген SLC1A5 примера 1 клонировали в векторный скелет pCDH (Systems Bioscience). Лентивирусные супернатанты получали путем совместной трансфекции клеток HEK293T вектором pCDH и смесью лентивирусных упаковочных векторов, экспрессирующих гены gag, pol, rev и env, необходимые для продукции вируса, используя реагент для трансфекции Purefection (System Bioscience). Вирусные супернатанты собирали в течение 48 и 72 ч после трансфекции и концентрировали с помощью PEG-it (System Bioscience). Т-клетки наносили на чашки и инфицировали, добавляя лентивирус.

Длинную изоформу SLC1A5 (SLC1A5-L) и ее усеченную изоформу (SLC1A5-S) трансдуцировали в  $\gamma\delta$  Т-клетки с помощью лентивирусной системы, содержащей последовательности SLC1A5-L или SLC1A5-S, а затем последовательности T2A и GFP. Эффективность функциональной трансдукции составила 16,7 (SLC1A5-S) и 20% (SLC1A5-L), на основе GFP-позитивных  $\gamma\delta$  Т-клеток (см. фиг. 6A). Кроме того, подавляющее большинство  $\gamma\delta$  Т-клеток экспрессировали SLC1A5, независимо были ли они трансдуцированы или нет (см. фиг. 6B). Однако уровни экспрессии SLC1A5 были в 10 раз выше (SLC1A5-L) или в 1,5 раза выше (SLC1A5-S) с трансдуцированными  $\gamma\delta$  Т-клетками по сравнению с не-трансдуцированными  $\gamma\delta$  Т-клетками (см. фиг. 6C).

Пример 4.

Пример получения длинной изоформы гена SLC1A5 с помощью системы на основе транспозона.

Длинную изоформу гена SLC1A5 примера 1 клонировали в вектор PB51x (System Bioscience). Т-клетки совместно трансфицировали вектором PB51x и вектором экспрессии на основе транспозазы 'Super' PiggyBac (System Bioscience) с помощью системы электропорации Nucleofection (Lonza) или Neon (Thermo Fisher).

Пример 5.

Использование SLC1A5 в качестве маркера селекции и обсуждение среды, которая бы могла обеспечить селективное окружающее давление.

Т-клетки трансфектировали (как в примерах 2 и 4) или трансдуцировали (как в примере 3) с помощью векторной конструкции SLC1A5 (как в примере 1), что обеспечивает сверхэкспрессию SLC1A5. После трансфекции/трансдукции Т-клеток вектором, способным экспрессировать SLC1A5, Т-клетки ос-

тавляли для восстановления в течение периода от 24 до 48 ч в полной среде, такой как ALyS или IMDM. После периода восстановления Т-клетки культивировали в среде ALyS или IMDM, содержащих менее 5 мкМ L-триптофана или содержащих менее 4 мМ L-глутамин, или при комбинированных условиях. Рост контролировали в сравнении с немодифицированными Т-клетками.

Поскольку фактическую концентрацию L-триптофана в культуральных клеточных системах не контролировали с течением времени, то это может повлиять на ответ гамма-дельта-Т-клеток. Поэтому, в культуральную среду добавляли ингибитор SLC1A5 О-бензил-L-серин (BenSer) для получения контролируемого давления отбора, имитирующего условие с низким содержанием L-триптофана. PBMC, трансдуцированные лентивирусными векторами, несущими SLC1A5-S или SLC1A5-L (48 ч после стимуляции золедроновой кислотой), культивировали в среде ALyS вместе или без BenSer. В течение второй и третьей недели культивирования,  $\gamma\delta$  Т-клетки анализировали методом проточной цитометрии для измерения жизнеспособности клеток и GFP-положительных клеток, для определения преимущества выживаемости трансдуцированных  $\gamma\delta$  Т-клеток под давлением отбора. Через три недели культивирования, присутствие BenSer снижало жизнеспособность нетрансдуцированных  $\gamma\delta$  Т-клеток по сравнению с клетками на более ранних этапах культивирования (фиг. 7А). Однако,  $\gamma\delta$  Т-клетки, трансдуцированные изоформой SLC1A5-L, не показали такого снижения жизнеспособности и, следовательно, становились резистентными к BenSer (фиг. 7А). Кроме того, процент GFP-позитивных  $\gamma\delta$  Т-клеток повышался через две и три недели культивирования в присутствии BenSer по сравнению с контролем на основе носителя (приблизительно 17% и 14% увеличение, соответственно, фиг. 7В-С). Таким образом, сверхэкспрессия изоформы SLC1A5-L делает гамма дельта Т-клетки резистентными к BenSer в культуральной среде, которая имитирует низкие уровни L-триптофана.

Хотя изобретение было конкретно продемонстрировано и описано со ссылкой на конкретные примеры, специалисту в данной области будет понятно, что в нем могут быть сделаны различные изменения в форме и деталях, не выходя за рамки настоящего изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ отбора модифицированных Т-клеток, адаптированных для сверхэкспрессии SLC1A5, изоформы SLC1A5 или альтернативного переносчика триптофана или глутамин, где способ включает стадии:

а) культивирования популяции Т-клеток, содержащей модифицированные Т-клетки, адаптированные для сверхэкспрессии SLC1A5, изоформы SLC1A5 или альтернативного переносчика триптофана и глутамин в условиях низкого содержания триптофана и/или глутамин, которые обеспечивает среда с по крайней мере одним из: L-триптофаном в концентрации менее 5 мкМ и L-глутамином в концентрации менее 3 мкМ, или в присутствии ингибитора SLC1A5 для имитирования условий низкого содержания триптофана, которые обеспечивает О-бензил-L-серин в этой среде;

б) отбора этих модифицированных Т-клеток, которые пролиферируют при культивировании в соответствии со стадией а.

2. Способ отбора модифицированных Т-клеток, адаптированных для сверхэкспрессии SLC1A5, изоформы SLC1A5 или альтернативного переносчика триптофана или глутамин, по п.1, где способ дополнительно включает стадии:

с) получения антитела со специфичностью связывания по меньшей мере к одному из: SLC1A5, изоформе SLC1A5 или альтернативному переносчику триптофана или глутамин, к Т-клетке, экспрессирующей по меньшей мере один из: SLC1A5, изоформу SLC1A5 или альтернативный переносчик триптофана или глутамин,

д) необязательно, детекции связывания антитела с Т-клетками на стадии а, и

е) отбора клеток, с которыми связалось антитело.

3. Способ отбора модифицированных Т-клеток, адаптированных для сверхэкспрессии SLC1A5, изоформы SLC1A5 или альтернативного переносчика триптофана или глутамин, по п.2, где способ также включает стадии:

ф) выделения клеток, с которыми связалось антитело.

4. Способ отбора модифицированных Т-клеток по п.1, где ингибитор SLC1A5 представляет собой О-бензил-L-серин.

5. Способ по любому из пп.1-4, где модифицированная Т-клетка одновременно экспрессирует химерный антигенный рецептор и переносчик глутамин и/или триптофана, что обеспечивается той же конструкцией.

6. Модифицированная Т-клетка, адаптированная для сверхэкспрессии SLC1A5 или изоформы SLC1A5,

где Т-клетка адаптирована для экспрессии SLC1A5 или изоформы SLC1A5 на уровне, который по меньшей мере в два раза выше уровня экспрессии, наблюдаемом в немодифицированной активированной Т-клетке,

где Т-клетка экспрессирует гамма-дельта Т-клеточный рецептор и ко-стимулирующий химерный антигенный рецептор (CAR),

где ко-стимулирующий CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен,

где трансмембранный домен содержит один или несколько трансмембранных доменов CD3, или CD4, или CD8, или CD28, или их части; и

где внутриклеточный сигнальный домен содержит один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов: CD28, CD137 (4-1BB), ICOS, CD27, OX40, LFA1, PD-1, CD150, CD154, CD244, NKG2D, DNAX-активирующий белок (DAP)-10, DAP-12, LIGHT, Fc-рецептор  $\gamma$ -цепи,  $\gamma$ -цепь обычного IL-2 или рецептор IL-12,

где внутриклеточный сигнальный домен обеспечивает ко-стимулирующий сигнал (только сигнал 2) Т-клетке после связывания внеклеточного антигенсвязывающего домена с антигеном.

7. Модифицированная Т-клетка по п.6,

где Т-клетка экспрессирует гамма-дельта Т-клеточный рецептора и химерный антигенный рецептор (CAR),

где, при использовании, сигнал 1 образуется при первом событии связывания TCR на гамма дельте Т-клетке с мишенью для связывания с клеткой, распознаваемой TCR, и сигнал 2 образуется при втором событии связывания антигена с антигенсвязывающим доменом костимуляторного CAR, и при объединении сигнала 1 и сигнала 2 первого и второго события связывания, соответственно, происходит активация Т-клетки.

8. Модифицированная Т-клетка по п.6 или 7,

где Т-клетка экспрессирует гамма-дельта Т-клеточный рецептор,

где гамма-дельта ( $\gamma\delta$ ) Т-клетка имеет подтип V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

9. Модифицированная Т-клетка по любому из пп.6-8, где SLC1A5 сверхэкспрессируется в сочетании с SLC7A5 и SLC3A2 с образованием переносчика LAT1.

10. Способ по любому из пп.1-5, где выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая переносчик, выбрана из

представителя семейства переносчиков с высокой аффинностью к глутамату и нейтральным аминокислотам (SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3, SLC1A4, SLC1A5, SLC1A6, SLC1A7);

тяжелых субъединиц гетеродимерных переносчиков аминокислот (SLC3A1, SLC3A2);

представителя семейства натрий- и хлорид-зависимых натрий:нейромедиатор симпортеров (SLC6A1, SLC6A2, SLC6A3, SLC6A4, SLC6A5, SLC6A6, SLC6A7, SLC6A8, SLC6A9, SLC6A10, SLC6A11, SLC6A12, SLC6A13, SLC6A14, SLC6A15, SLC6A16, SLC6A17, SLC6A18, SLC6A19, SLC6A20) или

представителя гликопротеин-связанного семейства переносчиков катионных аминокислот (SLC7A1, SLC7A2, SLC7A3, SLC7A4, SLC7A5, SLC7A6, SLC7A7, SLC7A8, SLC7A9, SLC7A10, SLC7A11, SLC7A13, SLC7A14).

11. Модифицированная Т-клетка по любому из пп.6-9, где выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая переносчик, выбрана из

представителя семейства переносчиков с высокой аффинностью к глутамату и нейтральным аминокислотам (SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3, SLC1A4, SLC1A5, SLC1A6, SLC1A7);

тяжелых субъединиц гетеродимерных переносчиков аминокислот (SLC3A1, SLC3A2);

представителя семейства натрий- и хлорид-зависимых натрий:нейромедиатор симпортеров (SLC6A1, SLC6A2, SLC6A3, SLC6A4, SLC6A5, SLC6A6, SLC6A7, SLC6A8, SLC6A9, SLC6A10, SLC6A11, SLC6A12, SLC6A13, SLC6A14, SLC6A15, SLC6A16, SLC6A17, SLC6A18, SLC6A19, SLC6A20) или

представителя гликопротеин-связанного семейства переносчиков катионных аминокислот (SLC7A1, SLC7A2, SLC7A3, SLC7A4, SLC7A5, SLC7A6, SLC7A7, SLC7A8, SLC7A9, SLC7A10, SLC7A11, SLC7A13, SLC7A14).

12. Применение модифицированной Т-клетки по любому из пп.6-9 в медицине.

13. Применение модифицированной Т-клетки по любому из пп.6-9 в лечении злокачественного новообразования или вируса.

14. Применение по п.12, где Т-клетка выделена у индивида с заболеванием, на которое направлено лечение.

15. Применение модифицированной Т-клетки, адаптированной для сверхэкспрессии SLC1A5, изоформы SLC1A5 или альтернативного переносчика триптофана или глутамина,

где Т-клетка адаптирована для экспрессии SLC1A5, изоформы SLC1A5 или переносчика триптофана или глутамина на уровне, который по меньшей мере в два раза выше уровня экспрессии, наблюдаемом в немодифицированной активированной Т-клетке,

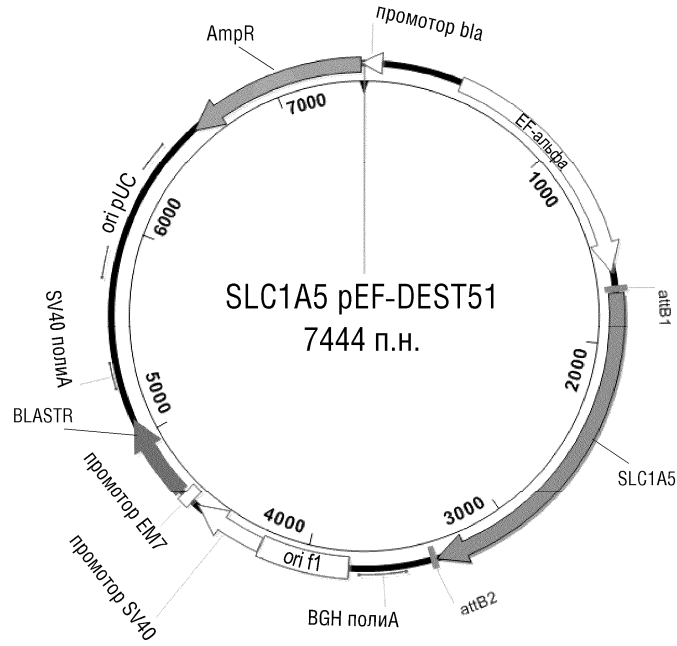
где Т-клетка экспрессирует гамма-дельта Т-клеточный рецептор и ко-стимулирующий химерный антигенный рецептор (CAR),

где ко-стимулирующий CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен,

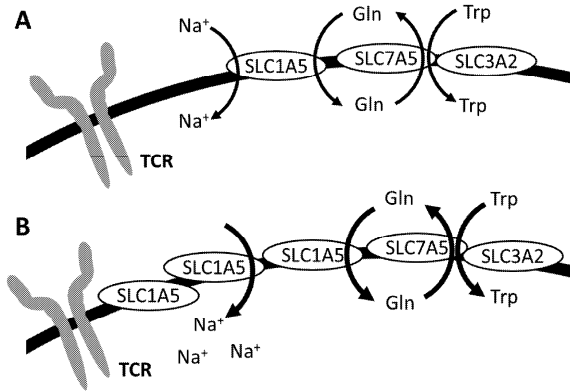
где трансмембранный домен содержит один или несколько трансмембранных доменов CD3, или CD4, или CD8, или CD28, или их части; и

где внутриклеточный сигнальный домен содержит один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов: CD28, CD137 (4-1BB), ICOS, CD27, OX40, LFA1, PD-1, CD150, CD154, CD244, NKG2D, DNAX-активирующий белок (DAP)-10, DAP-12, LIGHT, Fc-рецептор  $\gamma$ -цепи,  $\gamma$ -цепь обычного IL-2 или рецептор IL-12,

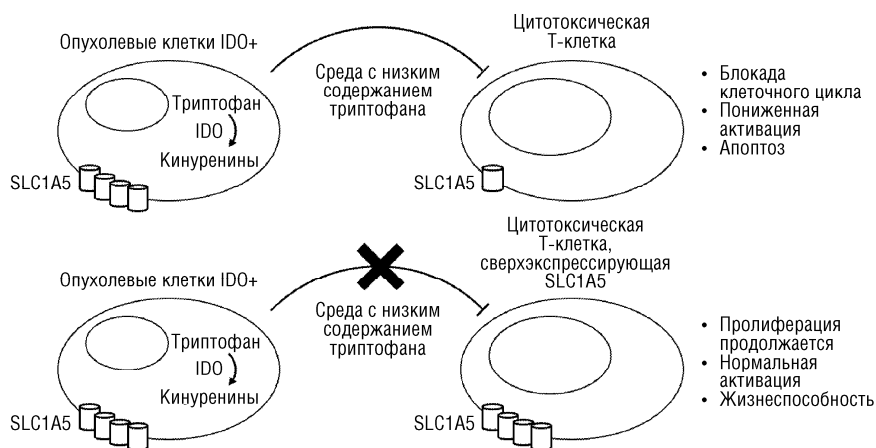
где внутриклеточный сигнальный домен обеспечивает ко-стимулирующий сигнал (только сигнал 2) Т-клетке после связывания антигена с внеклеточным антигенсвязывающим доменом, для получения лекарственного средства.



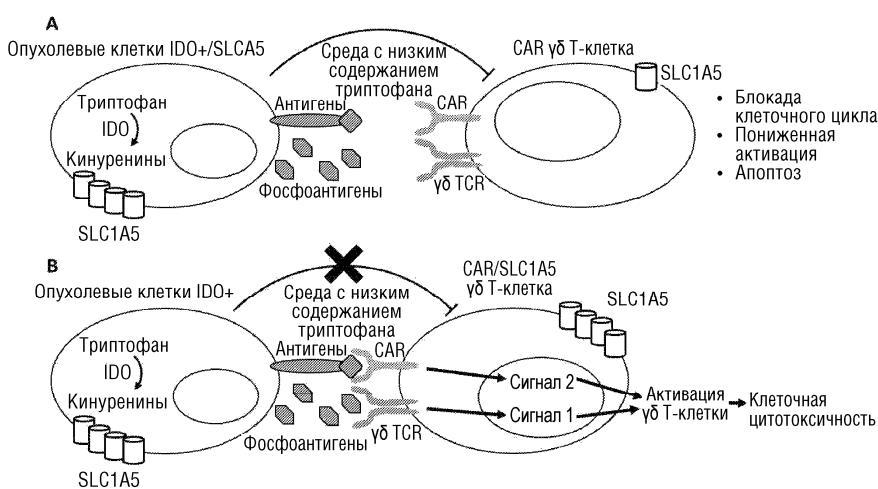
Фиг. 1



Фиг. 2

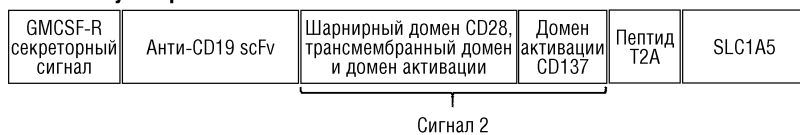


Фиг. 3

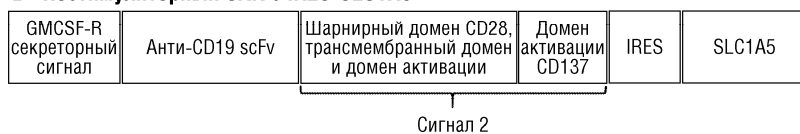


Фиг. 4

**А Костимуляторный CAR с T2A-SLC1A5**

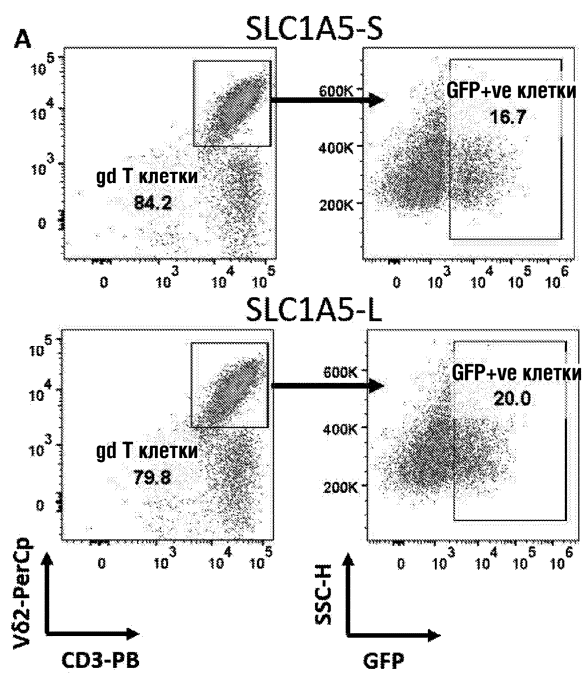
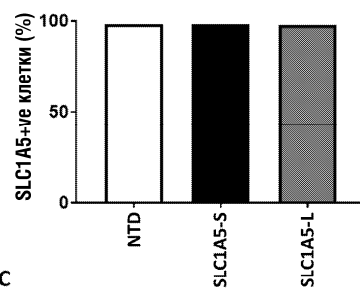
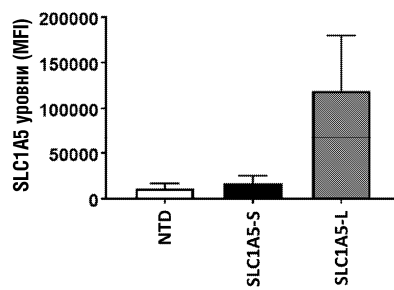


**В Костимуляторный CAR с IRES-SLC1A5**

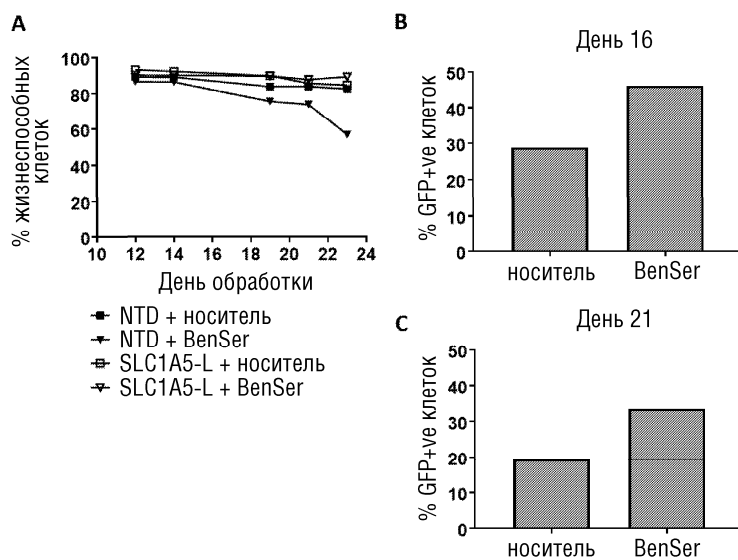


Фиг. 5



**B****C**

Фиг. 6



Фиг. 7

