

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392939 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.08

(51) Int. Cl. A61K 35/17 (2015.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 5/0781 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.18

(54) СПОСОБЫ РАЗМНОЖЕНИЯ В-КЛЕТОК ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

(31) 63/176,463

(72) Изобретатель:

(32) 2021.04.19

Бреннан Томас, Котхакота Сринивас,
Селби Марк Дж. (US)

(33) US

(86) PCT/US2022/025252

(74) Представитель:

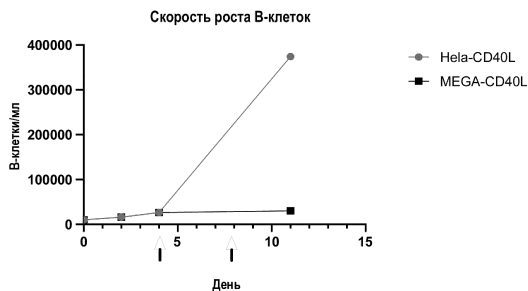
(87) WO 2022/225862 2022.10.27

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

УОКИНГ ФИШ ТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК. (US)

(57) Описанное в данном документе изобретение относится к оптимизированным способам размножения популяций клеток, особенно популяций В-клеток. Настоящее изобретение также относится к оптимизированным клеточным средам для размножения В-клеток, композициям, содержащим размноженные В-клетки, и способам применения таких размноженных В-клеток. Настоящее изобретение также относится к способам лечения заболеваний или нарушений, при которых популяцию В-клеток получают и культивируют, и при этом указанные В-клетки создают для экспрессии полезной нагрузки и/или химерного рецептора, и при этом указанные В-клетки вводят субъекту.



A1

202392939

202392939

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579604EA/019

СПОСОБЫ РАЗМНОЖЕНИЯ В-КЛЕТОК ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[1] В-клетки представляют собой иммунные клетки, отвечающие за целый ряд функций, в том числе помогающие организму противостоять инфекциям и заболеваниям. Они способны секретировать антитела в ответ на распознанный антиген, представляя антигены, а также секретирова цитокины. При раке В-клетки обнаруживаются в третичных лимфоидных структурах («TLS»), окружающих определенные опухоли. TLS состоят из агрегатов иммунных клеток (включая Т- и В-клетки). Их присутствие в опухолях ассоциировано с лучшими исходами лечения пациентов. См., например, публикации Helmink, В.А., *et al.*, Nature, 2020, 577(7791), 549-555; Petitprez F *et al.*, Nature, 2020, 577(7791), 556-560.

[2] Было показано, что внутриопухолевая инъекция LPS-активированных клеток селезенки, в том числе В-клеток, в комбинации с ингибиторами контрольных точек вызывает противоопухолевые ответы. Soldevilla *et al.*, Oncoimmunology, 2018, 7:8, e1450711. Кроме того, учитывая естественную способность В-клеток представлять антигены и секретировать белки, существует большой потенциал клеточной терапии для воздействия на определенные типы пораженных клеток и секретирования терапевтических нагрузок.

[3] Однако масштабирование производства сконструированных В-клеток для клеточной терапии является сложным процессом. В течение нескольких десятилетий активация и пролиферация В-клеток *in vitro* достигалась с помощью систем слоев фидерных клеток, экспрессирующих CD40-лиганд («CD40L»). Banchereau, J. *et al.* (1991) Science 251: 70-72; Schultze, J.L. *et al.* (1997) J. Clin. Invest. 100; 2757-2765; Liebig, T.M. *et al.* (2009) J. Vis. Exp. 32; 1373. Эти системы имеют общий недостаток: они зависят от слоев фидерных клеток, экспрессирующих CD40L. Применение фидерных клеток препятствует стандартизации процесса активации и пролиферации и вносит переменную в протокол.

[4] Было описано размножение В-клеток с применением CD40L со смешанными результатами. См., например, публикации Wennhold *et al.*, 2019, Transfus Med Hemother, 46:36-46. В результате проведения некоторых способов получают низкие выходы размножения с количеством В-клеток, недостаточным для клеточного структурирования и для применения В-клеток в качестве терапевтического средства для введения пациентам. Соответственно, существует потребность в оптимизированных методах размножения В-клеток, средах для выращивания и т.п.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[5] В данном изобретении предлагаются оптимизированные способы размножения популяций клеток, особенно популяций В-клеток. Настоящее изобретение также

относится к оптимизированным клеточным средам, их композициям и способам применения таких размноженных В-клеток. Этот новый способ включает применение нового слитого белка CD40L, сшивающего антитела и П-4 и/или П-21. В данном документе продемонстрировано, что такие способы имеют решающее значение для эффективной активации и пролиферации сконструированных В-клеток, что приводит к 200-кратному увеличению желаемых уровней функционально размноженных В-клеток.

[6] В настоящем изобретении предлагаются способы размножения В-клеток, которые превосходят традиционные способы в том, что традиционные на сегодняшний день способы размножения приводят к нежелательно низкому размножению клеток и, следовательно, к снижению выхода сконструированных В-клеток. Надлежащая функция клеток и их выход имеют решающее значение в клеточной терапии, для аллогенного лечения и особенно в условиях аутологичного лечения, при котором часто существует только одна возможность собрать клетки пациента, культивировать, размножить, сконструировать и ввести эффективную дозу таких клеток.

[7] В различных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающему получение популяции В-клеток из источника, культивирование указанных В-клеток в культуральной среде, состоящей из слитого белка CD40L и CD40L сшивающего агента, конструирование указанных В-клеток для экспрессии либо полезной нагрузки, либо химерного рецептора, либо того и другого; и введение указанных В-клеток указанному субъекту. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения источником является млекопитающее. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения указанный источник представляет собой биологический образец, состоящий из моноклеарных клеток периферической крови.

[8] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 85% идентичной SEQ ID NO. 3. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 3. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 3 слитого белка. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения сшивающий агент CD40L представляет собой антитело. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 5, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 7. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 5, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

[9] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетку конструируют перед культивированием указанных В-клеток в среде со слитым белком CD40L и сшивающим агентом CD40L. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетку конструируют после культивирования указанных В-клеток в среде со слитым белком CD40L и сшивающим агентом CD40L. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения способ включает дальнейшее культивирование указанных В-клеток в присутствии IL-4. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения способ включает дальнейшее культивирование указанных В-клеток в присутствии IL-21.

[10] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения культивируемые В-клетки экспрессируют по меньшей мере один из следующих маркеров: CD62L, CCR7, CD80, CD86, CD54, ICAM, CD58, или CD27. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из по меньшей мере одного из следующих заболеваний: рак, заболевание сердца, воспалительное заболевание, заболевание, связанное с атрофией мышц, или неврологическое заболевание. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой по меньшей мере один из следующих раков: рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак пищевода; рак легкого, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак печени, гепатоцеллюлярная карцинома, стромальные опухоли, такие как GIST, глиобластома и глиома. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения указанному субъекту вводят по меньшей мере около 3×10^7 В-клеток. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения популяцию В-клеток культивируют в течение по меньшей мере 14 дней.

[11] В различных вариантах осуществления настоящего изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающему получение популяции В-клеток из источника, культивирование указанных В-клеток в культуральной среде, состоящей из слитого белка CD40L, при этом указанный слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO. 3, и сшивающее антитело CD40L, переменная область легкой цепи которого на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и переменная область тяжелой цепи которого на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7; и введение указанных В-клеток указанному субъекту.

[12] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения источником является млекопитающее. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 3. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 5, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В различных вариантах осуществления настоящего

изобретение дополнительно включает конструирование указанных В-клеток для экспрессии либо полезной нагрузки, либо химерного рецептора, либо того и другого.

[13] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетку конструируют перед культивированием указанных В-клеток в среде с CD40L и сшивающим антителом CD40L. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетку конструируют после культивирования указанных В-клеток в среде с CD40L и сшивающим антителом CD40L. В различных вариантах осуществления настоящего изобретение дополнительно включает культивирование указанных В-клеток в присутствии ИЛ-4. В различных вариантах осуществления настоящего изобретение дополнительно включает культивирование указанных В-клеток в присутствии ИЛ-21. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения культивируемые В-клетки экспрессируют по меньшей мере один из следующих маркеров: CD62L, CCR7, CD80, CD86, CD54, ICAM, CD58, или CD27. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из по меньшей мере одного из следующих заболеваний: рак, заболевание сердца, воспалительное заболевание, заболевание, связанное с атрофией мышц, или неврологическое заболевание. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой по меньшей мере один из следующих раков: рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак пищевода; рак легкого, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак печени, гепатоцеллюлярная карцинома, стромальные опухоли, такие как GIST, глиобластома и глиома. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения указанному субъекту вводят по меньшей мере около 3×10^7 В-клеток. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения популяцию В-клеток культивируют в течение по меньшей мере 14 дней.

[14] В различных вариантах осуществления настоящего изобретение относится к способу производства сконструированных В-клеток, при этом указанный способ включает получение популяции В-клеток из источника, культивирование указанных В-клеток в культуральной среде, содержащей слитый белок CD40L и сшивающий агент CD40L, и конструирование указанных В-клеток для экспрессии либо полезной нагрузки, либо химерного рецептора, либо того и другого. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения источником является млекопитающее. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения указанный источник представляет собой биологический образец, состоящий из мононуклеарных клеток периферической крови.

[15] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 85% идентичной SEQ ID NO. 3. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 3. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 3 слитого белка. В различных вариантах осуществления

настоящего изобретения сшивающий агент CD40L представляет собой антитело. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 5, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 7. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 5, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

[16] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетку конструируют перед культивированием указанных В-клеток в среде с CD40L и сшивающим агентом CD40L. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетку конструируют после культивирования указанных В-клеток в среде с CD40L и сшивающим агентом CD40L. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения способ включает дальнейшее культивирование указанных В-клеток в присутствии IL-4. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения способ включает дальнейшее культивирование указанных В-клеток в присутствии IL-21. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения культивируемые В-клетки экспрессируют по меньшей мере один из следующих маркеров: CD62L, CCR7, CD80, CD86, CD54, ICAM, CD58, или CD27. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения источником является млекопитающее. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения источник представляет собой биологический образец, состоящий из мононуклеарных клеток периферической крови.

[17] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 85% идентичной SEQ ID NO. 3. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 3. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 3 слитого белка. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения сшивающий агент CD40L представляет собой антитело. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 5, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 7. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 5, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

[18] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения способ

дополнительно включает культивирование указанных В-клеток в присутствии ПЛ-4. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает культивирование указанных В-клеток в присутствии ПЛ-21. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения культивируемые В-клетки экспрессируют по меньшей мере один из следующих маркеров: CD62L, CCR7, CD80, CD86, CD54, ICAM, CD58, или CD27. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения получают по меньшей мере около 3×10^7 В-клеток. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения популяцию В-клеток культивируют в течение по меньшей мере 14 дней.

[19] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ производства сконструированных В-клеток, при этом указанный способ включает получение популяции В-клеток из источника, культивирование указанных В-клеток в культуральной среде, содержащей CD40L, и при этом указанный слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO. 3, и сшивающее антитело CD40L, вариабельная область легкой цепи которого на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и вариабельная область тяжелой цепи которого на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7; и введение указанных В-клеток указанному субъекту. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения источником является млекопитающее. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 3. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

[20] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает конструирование указанных В-клеток для экспрессии либо полезной нагрузки, либо химерного рецептора, либо того и другого. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетку конструируют перед культивированием указанных В-клеток в среде с CD40L и сшивающим агентом CD40L. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетку конструируют после культивирования указанных В-клеток в среде с CD40L и сшивающим агентом CD40L. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает культивирование указанных В-клеток в присутствии ПЛ-4. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает культивирование указанных В-клеток в присутствии ПЛ-21. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения культивируемые В-клетки экспрессируют по меньшей мере один из следующих маркеров: CD62L, CCR7, CD80, CD86, CD54, ICAM, CD58, или CD27. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения получают по меньшей мере около 3×10^7 В-клеток. В различных вариантах

осуществления настоящего изобретения популяцию В-клеток культивируют в течение по меньшей мере 14 дней.

[21] В различных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к среде для размножения В-клеток, содержащей слитый белок CD40L, при этом указанный слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO. 3, и сшивающее антитело CD40L, переменная область легкой цепи которого на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и переменная область тяжелой цепи которого на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7; и введение указанных В-клеток указанному субъекту.

[22] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 3. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 5, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения среда дополнительно содержит IL-4. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения среда дополнительно содержит IL-21.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[23] На Фигуре 1 продемонстрировано, что В-клетки человека можно выращивать и размножать в среде с фидерными клетками HELA-CD40, но они не размножаются в присутствии MEGA-CD40L (Enzo Life Sciences). Процесс выращивания очищенных В-клеток начинали при эквивалентной плотности в день 0, примерно 10 000 клеток на мл, и осуществляли на фидерных клетках HELA-CD40L. В день 4 культуры разделяли на две группы, и одну группу продолжали выращивать в той же среде с фидерными клетками HELA-CD40L, тогда как другую группу выращивали в средах с добавлением MEGA-CD40L (0,1 мкг/мл), но в отсутствие фидерных клеток HELA. В день 8 к питательной среде в условиях обработки MEGA-CD40L добавляли дополнительные 100 нг/мл MEGA-CD40L. Стрелки указывают время начала обработки MEGA-CD40L. Эти данные демонстрируют, что ко дню 11 наблюдалась значительная пролиферация В-клеток при выращивании на фидерных клетках HELA-CD40L, но на день 11 значительного роста не наблюдалось при выращивании с MEGA-CD40L.

[24] На Фигуре 2 продемонстрировано, что клетки человека можно выращивать и размножать в среде, содержащей CD40L и сшивающий агент CD40L, по меньшей мере до около 3×10^7 клеток всего за две недели, даже в отсутствие фидерных клеток HELA-CD40L. На протяжении всего исследования поддерживались две плотности (150K и 1 MM). Культура с более низкой плотностью могла поддерживать более высокую скорость роста и давала большую относительную общую массу. Всего за две недели клетки смогли увеличиться по меньшей мере в 200 раз.

[25] На Фигуре 3 продемонстрировано, что размноженные сконструированные В-

клетки могут поддерживать экспрессию трансгена. На Фигуре 3А продемонстрировано, что 67% размноженных сконструированных В-клеток демонстрировали экспрессию В-клеточного рецептора GPC3 через 72 часа после трансфекции аденовирусным вектором. На Фигуре 3В продемонстрирован процент клеток, экспрессирующих GPC3-BCR, в клетках, трансфицированных пустым вектором (тот, который не экспрессировал GPC3). На Фигуре 3С продемонстрированы клетки, которые вообще не были трансдуцированы каким-либо вектором.

[26] На Фигуре 4 продемонстрированы размножение и скорость роста В-клеток после трансдукции Ad5RGD-GFP. Ad5RGD-GFP приводил к высокой эффективности экспрессии GFP в В-клетках. Экспрессия поддерживалась в около 60% от общего числа В-клеток в течение по меньшей мере 8-10 дней. GFP+ В-клетки продолжали пролиферировать более недели после трансдукции.

[27] На Фигуре 5 продемонстрировано успешное размножение В-клеток человека, трансдуцированных мышиной конструкцией GPC3 с помощью RGD (601). На Фигуре 5А описана структура трансдуцированного химерного рецептора scFv анти-GPC3, который содержит scFv анти-GPC3, шарнирный домен CD8, трансмембранный домен CD28 и сигнальный домен CD79a. На Фигуре 5В продемонстрирован относительный процент В-клеток, экспрессирующих трансдуцированный химерный рецептор GPC3.

[28] На Фигуре 6 продемонстрировано успешное размножение В-клеток человека, трансдуцированных мышиной конструкцией GPC3 с помощью RGD (602). На Фигуре 6А описана структура трансдуцированного химерного рецептора scFv анти-GPC3, который содержит scFv анти-GPC3, шарнирный домен CD8, трансмембранный домен CD28 и сигнальный домен CD79b. На Фигуре 6В продемонстрирован относительный процент В-клеток, экспрессирующих трансдуцированный химерный рецептор GPC3.

[29] На Фигуре 7 продемонстрировано размножение В-клеток человека, трансдуцированных RGD-функционализированным невирусным вектором доставки генов, экспрессирующим химерный рецептор, нацеленный на GPC3. На Фигуре 7А описана структура этого химерного рецептора, который содержит scFv анти-GPC3, шарнирный домен CD8, трансмембранный домен CD28 и сигнальный домен CD79b или CD79a. На Фигуре 7В продемонстрирован относительный процент В-клеток, экспрессирующих трансдуцированный химерный рецептор GPC3.

[30] На Фигуре 8 продемонстрировано успешное размножение В-клеток человека, трансдуцированных мышиной конструкцией GPC3 с помощью RGD (463). На Фигуре 8А описана структура трансдуцированного химерного рецептора scFv анти-GPC3, который содержит scFv анти-GPC3, шарнирный домен CD8, трансмембранный домен CD28 и сигнальный домен CD79b. На Фигуре 8В продемонстрирован относительный процент В-клеток, экспрессирующих трансдуцированный химерный рецептор GPC3.

[31] На Фигуре 9 продемонстрировано размножение В-клеток человека, трансдуцированных RGD-функционализированным невирусным вектором доставки генов, экспрессирующим химерный рецептор, нацеленный на саркогликан (394). На Фигуре 9А

описана структура этого химерного рецептора, который содержит scFv анти-саркогликан, мышинный домен Fc G2a, трансмембранный домен и цитоплазматический хвост. На Фигуре 9В продемонстрирован процент клеток, экспрессирующих химерный рецептор после трансдукции и размножения В-клеток.

[32] На Фигуре 10 продемонстрирован хоминг *in vivo* сконструированных и размноженных В-клеток человека в дренирующие опухоль лимфатические узлы («TDLN») у мышей, несущих опухоли HPEG2.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[33] Следует понимать, что описания в данном документе являются исключительно примерными и пояснительными и не ограничивают настоящее изобретение, как заявлено в формуле изобретения. В данной заявке применение форм единственного числа включает также и множественное число, если явно не указано иное.

Обзор

[34] Следует понимать, что настоящее изобретение относится к способам получения, размножения и/или выделения популяций сконструированных В-клеток. Например, настоящие способы можно применять, например, для получения различных сконструированных В-клеток, как описано в предварительной заявке на патент США № 63/073799, поданной 2 сентября 2020 г., и предварительной заявке на патент США № 63/003120, поданной 31 марта 2020 г. К ним относятся, помимо прочего:

1) В-клетки, которые были модифицированы для направления (хоминга) к представляющему интерес сайту/мишени с помощью, например, связывающего домена, такого как scFv, антитела, лиганда, рецептора или их фрагментов;

2) В-клетки, которые были модифицированы хоминг-доменом, дополнительно содержащим активационный и, необязательно, костимулирующий домен, так что В-клетки могут направляться и активироваться при взаимодействии с желаемой мишенью;

3) В-клетки, сконструированные таким образом, чтобы они были способны производить желаемую полезную белковую нагрузку, такую как антитело, терапевтический белок, полипептид, последовательность нуклеиновой кислоты (такую как РНКi) или тому подобное;

4) Сконструированные В-клетки, содержащие хоминг/связывающий домен, активирующий домен, необязательный костимулирующий домен и дополнительно сконструированные для экспрессии полезной белковой нагрузки, такой как антитело, терапевтический белок, полипептид, последовательность нуклеиновой кислоты (например, РНКi) или тому подобное;

5) В-клетки, которые были модифицированы для экспрессии интегрина, хоминг-антитела, белка или рецептора, так что В-клетки привлекаются к конкретным лигандам, хемокинам или аттрактантам в конкретном представляющем интерес сайте/мишени (например, в хоминг-ткани) и таким образом могут направляться к представляющему интерес сайту/мишени, например, для доставки желаемой полезной нагрузки;

6) В-клетки, которые были модифицированы для экспрессии иммуноингибирующей молекулы, так что воспаление и аутоиммунная активность В-клеток, локализованных в представляющем интерес сайте/мишени, уменьшаются, что приводит к положительному терапевтическому ответу;

7) В-клетки, обработанные соединением или его производными, так что транспортировка В-клеток изменяется за счет экспрессии конкретных интегринов В-клеток и/или хоминг-рецепторов;

8) В-клетки, которые были (i) обработаны агонистом Toll-подобного рецептора (TLR) и/или (ii) сконструированы для экспрессии конститутивно активного TLR, для потенцирования В-клеток и/или продуцирования мощных эффекторных В-клеток для усиления иммунных ответов у субъекта;

9) В-клетки, подвергшиеся электропорации с мРНК, кодирующей конкретные антигены, представляющие интерес, слитые с целевым сигналом лизосомального белка, так что В-клетки могут одновременно и эффективно представлять представляющие интерес конкретные антигены и/или антигенные эпитопы в молекулах HLA как класса I, так и класса II.

10) В-клетки, подвергшиеся электропорации с самоамплифицирующейся РНК, кодирующей любые элементы, указанные выше в частях 1-9.

[35] Следует понимать, что различные варианты осуществления сконструированных или модифицированных В-клеток по настоящей заявке не являются взаимоисключающими и могут комбинироваться друг с другом любым способом и без каких-либо ограничений, если не указано иное, для достижения или облегчения любого из результатов и/или терапевтических ответов, рассматриваемых в данном документе.

[36] Более конкретно, настоящие способы можно применять в качестве технологии производства для достижения оптимизированного размножения В-клеток в следующих вариантах осуществления продуцирования В-клеток. Они описаны в предварительной заявке на патент США № 63/073799, поданной 2 сентября 2020 г., и предварительной заявке на патент США № 63/003120, поданной 31 марта 2020 г., содержание которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Определенные способы получения конструкций и сконструированных иммунных клеток по настоящему изобретению описаны в РСТ заявке РСТ/US2015/14520, содержание которой включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Дополнительные способы получения конструкций и клеток можно найти в предварительной заявке на патент США № 62//244,036, содержание которой дополнительно включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

[37] Настоящее изобретение также относится к способам лечения заболевания или нарушения с применением сконструированных В-клеток, полученных способами, описанными в данном документе. Примеры заболеваний или нарушений, подходящих для лечения, включают, помимо прочего, рак, заболевание сердца, воспалительное заболевание, заболевание, связанное с атрофией мышц, неврологическое заболевание и

т.п.

Определения

[38] Заголовки разделов, применяемые в данном описании, предназначены только для организационных целей и не должны толковаться как ограничивающие описываемый объект. Все документы или части документов, приведенные в данной заявке, включают, помимо прочего, патенты, заявки на патент, статьи, книги и научные труды и включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки для любой цели. Используемые в соответствии с настоящим изобретением следующие термины, если не указано иное, следует понимать как имеющие следующие значения:

[39] В данной заявке применение «или» означает «и/или», если не указано иное. Кроме того, применение термина «включая», а также других форм, например, «**включает**» и «**включительно**», является неограничивающим. Кроме того, такие термины, как «**элемент**» или «**компонент**» охватывают как элементы, так и компоненты, содержащие одну единицу, и элементы и компоненты, которые содержат более одной субъединицы, если конкретно не указано иное.

[40] Термин «**полинуклеотид**», «**нуклеотид**» или «**нуклеиновая кислота**» включает как одноцепочечные, и двухцепочечные нуклеотидные полимеры. Нуклеотиды, входящие в состав полинуклеотида, могут представлять собой рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды, или модифицированную форму любого типа нуклеотидов. Указанные модификации включают базовые модификации, такие как производные бромуридина и инозина, модификации рибозы, такие как 2',3'-дидеоксирибоза, и модификации межнуклеотидных связей, такие как фосфотиоат, фосфодитиоат, фосфоселеноат, фосфодиселеноат, фосфоанилотиоат, фосфоаниладат и фосфоамидат.

[41] Термин «**олигонуклеотид**» относится к полинуклеотиду, включающему 200 или меньшее количество нуклеотидов. Олигонуклеотиды могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, например, для применения в конструкции мутантного гена. Олигонуклеотиды могут представлять собой смысловые или бессмысловые олигонуклеотиды. Олигонуклеотид может включать метку, в том числе радиоизотопную метку, флюоресцентную метку, гаптенную или антигенную метку, для анализа обнаружения. Олигонуклеотиды могут применяться, например, в качестве праймеров ПЦР, клонирующих праймеров или гибридизационных зондов.

[42] Термин «**контрольная последовательность**» относится к полинуклеотидной последовательности, которая воздействует на экспрессию и обработку кодирующей последовательности, с которой она связывается посредством лиганда. Природа такой контрольной последовательности может зависеть от организма-хозяина. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения контрольные последовательности для прокариот могут включать промотор, сайт связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции. Например, контрольные последовательности для эукариот могут включать промоторы, включающие одну или множество сайтов распознавания для факторов транскрипции, энхансерных последовательностей транскрипции и

последовательности терминации транскрипции. «Контрольные последовательности» могут включать лидерные последовательности (сигнальные пептиды) и/или последовательности сливающихся клеток.

[43] В контексте данного документа термин «**функционально связанный**» означает, что компоненты, к которым применяется данный термин, находятся в связи, которая позволяет им осуществлять присущие им функции в подходящих условиях.

[44] Термин «**вектор**» означает любую молекулу или частицу (например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг или вирус), применяемую для переноса кодирующей белок информации в клетку-хозяина. Термин «вектор экспрессии» или «конструкция экспрессии» относится к вектору, который подходит для трансформации клетки-хозяина и вмещает последовательности нуклеиновых кислот, которые направляют и/или управляют (вместе с клеткой-хозяином) экспрессией одного или большего количества гетерологичных кодирующих областей, функционально связанных с ними. Конструкции экспрессии могут включать, помимо прочего, последовательности, которые воздействуют или управляют транскрипцией, трансляцией и, если присутствуют интроны, воздействием на сплайсинг РНК кодирующей области, функционально связанной с ними.

[45] Термин «**клетка-хозяин**» относится к клетке, которая была трансформирована или способна к трансформации, с помощью последовательности нуклеиновой кислоты и таким образом экспрессирует ген, представляющий интерес. Термин включает потомство исходной клетки, независимо от того, является ли потомство идентичным с точки зрения морфологии или генетической конструкции оригинальной исходной клетке или нет, поскольку присутствует ген, представляющий интерес.

[46] Термин «**трансформация**» относится к изменению генетических характеристик клетки, и клетка была трансформирована, если она была модифицирована с возможностью содержания новых ДНК или РНК. Например, клетка является трансформированной, если она генетически модифицирована от ее исходного состояния путем введения нового генетического материала посредством трансфекции, трансдукции или других методик. После трансфекции или трансдукции трансформирующая ДНК может рекомбинироваться с ДНК клетки путем физической интеграции в хромосому клетки, или может поддерживаться временно в качестве эписомального элемента без репликации, или может подвергаться репликации независимо в виде плазмиды. Клетка считается «стабильно трансформированной», если трансформирующая ДНК подвергается репликации с разделением клетки.

[47] Термин «**трансфекция**» относится к поглощению клеткой чужеродной или экзогенной ДНК. Ряд методик трансфекции хорошо известен в данной области техники и описан в данном документе. См., например, публикацию Graham *et al.*, 1973, *Virology*, 1973, 52:456; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2001, выше; Davis *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology*, 1986, Elsevier; Chu *et al.*, 1981, *Gene*, 13:197.

[48] Термин «**трансдукция**» относится к процессу, посредством которого чужеродная ДНК вводится в клетку через вирусный вектор. См., например, публикацию

Jones *et al.*, Genetics: Principles and Analysis, 1998, Boston: Jones & Bartlett Publ.

[49] Термины «**полипептид**» или «**белок**» относятся к макромолекуле с аминокислотной последовательностью белка, включая делеции, добавления и/или замещения одной или большего количества аминокислот исходной последовательности. Термины «**полипептид**» и «**белок**» конкретно охватывают антигенсвязывающие молекулы, антитела или последовательности, которые имеют делеции, добавления и/или замещения одной или большего количества аминокислот антигенсвязывающего белка. Термин «**фрагмент полипептида**» относится к полипептиду, который имеет аминоконцевую делецию, карбокси-концевую делецию и/или внутреннюю делецию по сравнению с полноразмерным исходным белком. Такие фрагменты также могут содержать модифицированные аминокислоты по сравнению с исходным белком. Пригодные фрагменты полипептидов включают иммунологически функциональные фрагменты антигенсвязывающих молекул.

[50] Термин «**выделенный**» означает (i) не содержащий по меньшей мере несколько других белков, с которыми он может встречаться в обычных условиях, (ii) существенно не содержащий других белков из того же источника, например, от других видов, (iii) отделенный по меньшей мере от около 50% полинуклеотидов, липидов, углеводов или других материалов, с которыми он связан в естественных условиях, (iv) функционально связанный (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым он не связан в естественных условиях, или (v) не встречается в естественных условиях.

[51] «**Вариант**» полипептида (*например*, антигенсвязывающая молекула) содержит аминокислотную последовательность, в которой один или большее количество аминокислотных остатков введены внутрь, удалены из и/или замещены в аминокислотной последовательности относительно другой полипептидной последовательности. Варианты включают слитые белки.

[52] Термин «**идентичность**» относится к взаимосвязи между последовательностями двух или большего количества молекул полипептида или двух или большего количества молекул нуклеиновой кислоты, как определено путем выравнивания и сравнения последовательностей. «**Процент идентичности**» означает процент идентичных остатков между аминокислотами или нуклеотидами в сравниваемых молекулах и рассчитывается на основании размера наименьшей из сравниваемых молекул. Для данных расчетов гэпы в выравниваниях (при наличии) предпочтительно регулируются посредством конкретной математической модели или компьютерной программы (т. е. «**алгоритма**»).

[53] Для расчета процента идентичности сравниваемые последовательности обычно выравнивают с помощью способа, который обеспечивает наибольшее совпадение между последовательностями. Одним примером компьютерной программы, которую можно применять для определения процента идентичности, является программный пакет GCG, который включает GAP (Devereux *et al.*, Nucl. Acid Res., 1984, 12, 387; Genetics

Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.). Компьютерный алгоритм GAP применяется для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых необходимо определить процент идентичности последовательности. Последовательности выравниваются для оптимального совпадения их соответствующей аминокислоты или нуклеотида («**совпавшая совокупность**», определенная алгоритмом). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стандартная матрица сравнения (см., например, Dayhoff *et al.*, 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 for the PAM 250 comparison matrix; Henikoff *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 10915-10919 для матрицы сравнения BLO-SUM 62) также применяется в алгоритме.

[54] В контексте данного документа двадцать обычных (например, встречающихся в естественных условиях) аминокислот и их сокращений следуют обычному применению. См., например, публикацию Immunology - A Synthesis (2nd Edition, Golub and Green, Eds., Sinauer Assoc., Sunderland, Mass. (1991)), включенную в данный документ посредством ссылки для любых целей. Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) 20 обычных аминокислот, аминокислоты не природного происхождения, такие как альфа-, альфа-дизамещенные аминокислоты, N-алкильные аминокислоты, молочная кислота и другие нетипичные аминокислоты также могут быть подходящими компонентами для полипептидов по настоящему изобретению. Примеры нетипичных аминокислот включают следующие: 4-гидроксипролин, гамма-карбоксиглутамат, эpsilon-N, N,N-триметиллизин, epsilon-N-ацетиллизин, 0-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, .сигма.-N-метиларгинин и другие подобные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В обозначении полипептида, применяемом в данном документе, левостороннее направление представляет собой аминоконцевое направление, а правостороннее направление представляет собой карбоксильное концевое направление, в соответствии со стандартным применением и условностями.

[55] Консервативные аминокислотные замещения могут охватывать не встречающиеся в природе аминокислотные остатки, которые обычно вводят путем химического пептидного синтеза, нежели посредством синтеза в биологических системах. Они включают пептидомиметики и другие обращенные или инвертированные формы фрагментов аминокислот. Встречающиеся в природе остатки возможно разделить на классы, основанные на общих свойствах боковой цепи:

- a) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- b) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- c) кислые: Asp, Glu;
- d) основные: His, Lys, Arg;
- e) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro; и
- f) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[56] Например, неконсервативные замещения могут предусматривать замену представителя одного из данных классов на представителя другого класса.

[57] При осуществлении изменений антигенсвязывающей молекулы,

костимулирующего или активирующего доменов разработанной Т-клетки, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, может рассматриваться индекс гидропатичности. Каждой аминокислоте был присвоен индекс гидропатичности на основании ее гидрофобности и характеристик изменения. Аминокислоты с соответствующими индексами являются следующими: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспарат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5). См., например, публикацию Kyte *et al.*, 1982, *J. Mol. Biol.*, 157, 105-131. Известно, что некоторые аминокислоты могут быть замещены другими аминокислотами с подобным индексом или баллом гидропатичности и все еще сохраняют подобную биологическую активность. Также в данной области техники следует понимать, что замещение подобных аминокислот может эффективно осуществляться на основании гидрофильности, в особенности, если биологически функциональный белок или пептид, созданный таким образом, предназначен для применения в иммунологических вариантах осуществления настоящего изобретения, как в данном случае. Типовые замещения аминокислот представлены в Таблице 1.

ТАБЛИЦА 1

Исходные остатки	Типовые замены	Предпочтительные замены
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gin, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин	Leu
Leu	Норлейцин, Ile, Va, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1, 4 Диаминомасляная кислота Gin, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly

Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, норлейцин	Leu

[58] Термин «**производное**» относится к молекуле, которая включает химическую модификацию, отличную от вставки, делеции или замещения аминокислот (или нуклеиновых кислот). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения производные содержат ковалентные модификации, включающие, помимо прочего, в том числе без ограничения химическое связывание с полимерами, липидами или другими органическими или неорганическими фрагментами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения химически модифицированная антигенсвязывающая молекула может иметь больший период полужизни в кровотоке, чем антигенсвязывающая молекула, которая химически не модифицирована. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения производная антигенсвязывающая молекула ковалентно модифицирована для включения в себя одного или большего количества растворимых в воде полимерных прикреплений, включающих, помимо прочего, полиэтиленгликоль, полиоксиэтиленгликоль или полипропиленгликоль.

[59] Пептидные аналоги широко применяются в фармацевтической промышленности в качестве непептидных лекарственных средств со свойствами, аналогичными лекарственным средствам с пептидом матрицы. Данные типы непептидного соединения называются «**пептидные миметики**» или «**пептидомиметики**». Fauchere, J. L., 1986, *Adv. Drug Res.*, 1986, 15, 29; Veber, D. F. & Freidinger, R. M., 1985, *Trends in Neuroscience*, 8, 392-396; and Evans, B. E., *et al.*, 1987, *J. Med. Chem.*, 30, 1229-1239, которая включена в настоящий документ посредством ссылки для любых целей.

[60] Термин «**терапевтически эффективное количество**» относится к количеству иммунных клеток или другого терапевтического агента, которое, как установлено, вызывает терапевтический ответ у млекопитающего. Такие терапевтически эффективные количества легко устанавливаются специалистом в данной области.

[61] Термины «**пациент**» и «**субъект**» применяются взаимозаменяемо и включают субъектов-людей и не являющихся людьми животных-субъектов, а также субъектов с ранее диагностированными нарушениями, субъектов без документально подтвержденных распознанных нарушений, субъектов, получающих медицинскую помощь, субъектов с риском развития нарушений и т.д.

[62] Термин «**лечить**» и «**лечение**» включает терапевтические способы лечения, профилактические способы лечения и варианты применения, в которых снижается риск развития у субъекта нарушения или другой фактор риска. Лечение не требует полного

излечения нарушения и охватывает варианты осуществления, в которых снижаются симптомы или основные факторы риска. Термин «предупредить» не требует 100% ликвидации возможности явления. Скорее он обозначает, что вероятность возникновения явления была снижена в присутствии соединения или способа.

[63] Стандартные методы могут применяться для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и тканевой культуры и трансформации (например, электропорация, липофекция). Методики ферментативных реакций и очищения могут осуществляться в соответствии с указаниями производителя или как обычно принято в данной области техники, или как описано в данном документе. Вышеупомянутые методики и процедуры могут обычно осуществляться в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники, и как описано в различных общих и более конкретных справочных материалах, которые приведены и обсуждены в данном описании. См., например, публикацию Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), которая включена в данный документ посредством ссылки для любых целей.

[64] В контексте данного документа термин «**по существу**» или «**существенно**» относится к количеству, уровню, значению, числу, частоте, проценту, размеру, величине, параметру, весу или длине, которые являются на около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% больше по сравнению с эталонным количеством, уровнем, значением, числом, частотой, процентом, размером, величиной, параметром, весом или длиной. В одном варианте осуществления термины «существенно одинаковый» или «значительно одинаковый» относятся к диапазону количества, уровню, значению, числу, частоте, проценту, величине, размеру, количеству, весу или длине, которые примерно такого же диапазона количества, уровня, значения, числа, частоты, процента, величины, размера, количества, веса или длины.

[65] В контексте данного документа термины «**существенно не содержит**» и «**по существу не содержит**» применяются взаимозаменяемо, и когда они применяются для описания композиции, такой как популяция клеток или культуральная среда, они относятся к композиции, которая не содержит определенного вещества, например, является свободной на 95%, свободной на 96%, свободной на 97%, свободной на 98%, свободной на 99% от указанного вещества, или это вещество не обнаруживается при измерении обычными методами. Аналогичное значение можно применить к термину «**отсутствие**», когда он относится к отсутствию конкретного вещества или компонента композиции.

[66] В контексте данного документа термин «**значимый**» относится к диапазону количества, уровня, значения, числа, частоты, процента, размера, величины, параметра, веса или длины или к явлению, которое легко обнаружить с помощью одного или большего количества стандартных способов. Термины «**незначительный**» и «**незначимый**» и их эквиваленты относятся к диапазону количества, уровня, значения, числа, частоты, процента, размера, величины, параметра, веса или длины или к явлению,

которое трудно обнаружить или оно не обнаруживается с помощью стандартных способов. В одном варианте осуществления настоящего изобретения явление не является значимым, если оно происходит менее чем за 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,1%, 0,001% или меньший период времени.

[67] Во всем данном описании, если контекст не требует иного, слова «**содержит**», «**содержать**» и «**содержащий**» следует понимать как подразумевающие включение указанного этапа или элемента или группы этапов или элементов, но не исключают любого другого этапа, или элемента, или группы этапов или элементов. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения термины «включает», «имеет», «вмещает» и «содержит» применяются как синонимы.

[68] В контексте данного документа термин «**состоящий из**» означает включающий и ограничивается любым перечнем того, что следует за фразой «**состоящий из**». Таким образом, фраза «**состоящий из**» указывает на то, что перечисленные элементы необходимы или обязательны, и что не могут присутствовать никакие другие элементы.

[69] Термин «**по существу состоящий из**» означает включение любых элементов, перечисленных после этой фразы и ограничивается другими элементами, которые не препятствуют или способствуют активности или действию, указанным в описании для перечисленных элементов. Таким образом, фраза «**по существу состоящий из**» указывает на то, что перечисленные элементы необходимы или обязательны, но что никакие другие элементы не являются необязательными и могут присутствовать или не присутствовать в зависимости от того, влияют ли они или не влияют на активность или действие перечисленных элементов.

[70] Ссылка в данном описании на «**один вариант осуществления**», «**вариант осуществления**», «**конкретный вариант осуществления**», «**родственный вариант осуществления**», «**определенный вариант осуществления**», «**дополнительный вариант осуществления**» или «**последующий вариант осуществления**» или их комбинации означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с вариантом осуществления, включены по меньшей мере в один вариант осуществления настоящего изобретения. Таким образом, появление вышеупомянутых фраз в различных местах этого описания не обязательно относится к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть подходящим образом скомбинированы в одном или большем количестве вариантов осуществления настоящего изобретения.

[71] В контексте данного документа термин «**около**» или «**примерно**» относится к количеству, уровню, значению, числу, частоте, проценту, величине, размеру, объему, массе или длине, которые варьируют вплоть до 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% относительно диапазона количества, уровня, значения, числа, частоты, процента, величины, размера, объема, массы или длины. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения термины «около» или «примерно», предшествующие числовому значению, указывают значение плюс или минус диапазон 15%, 10%, 5% или 1% или

любые промежуточные их диапазоны.

[72] В контексте данного документа термин «**введение**» относится к процессу, который содержит приведение клетки в контакт с полинуклеотидом, полипептидом или небольшой молекулой. Этап введения может также включать микроинъекцию полинуклеотидов или полипептидов в клетку, применение липосом для доставки полинуклеотидов или полипептидов в клетку или слияние полинуклеотидов или полипептидов с проницаемыми для клетки фрагментами для введения их в клетку.

[73] Способы размножения популяций В-лимфоцитов для клеточной терапии

[74] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения рассматриваются оптимизированные способы размножения популяций сконструированных В-лимфоцитов. Указанные способы включают перекрестное сшивание CD40, экспрессируемого на В-клетках, через клеточную среду, содержащую лиганд CD40 и сшивающие антитела. Было продемонстрировано, что комбинация CD40L вместе с IL-4, который является известным фактором роста активированных В-клеток, имеет решающее значение для эффективной активации и пролиферации В-клеток. Banchereau, J. *et al.* (1991) SCIENCE 251:1991251. 70-72; Schultze, J.L. *et al.* (1997) J. CLIN. INVEST. 100; 2757-2765. Аналогично, сообщалось, что IL-21 является эффективным стимулом активации и пролиферации В-клеток. Однако, кроме того, IL-21 стимулирует созревание В-клеток в сторону фенотипа плазматических клеток. Примечательно, что клеточная среда и способы различных вариантов осуществления настоящего изобретения позволяют сконструированным В-клеткам достигать результатов активации и пролиферации, которые сравнимы с классическим протоколом NIH3T3/tCD40L на основе фидерных клеток.

1. CD-40 Лиганд

[75] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные В-клетки размножаются в присутствии лиганда CD40 («CD40L»). В различных вариантах осуществления настоящего изобретения CD40L представляет собой

[76]

MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLY
YIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQSQSIHLGGVFE
LQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL (SEQ ID NO: 1)

[77] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные В-клетки размножаются в присутствии слитого белка, содержащего последовательность CD40L и мультимеризующий домен. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения мультимеризующий домен получен из тенансина. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения мультимеризующий домен содержит:

[78] ACGCAAAPDIKDLLSRLEELEGLVSSLREQ (SEQ ID NO: 2)

[79] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения мультимеризующий домен представляет собой SEQ ID NO: 2, а CD40L представляет

собой SEQ ID NO: 1. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения слитый белок, содержащий мультимеризующий домен и CD40L, содержит:

VGDGSSHHHHHSSGGGRGSHHHHHHGGACGCAAAPDIKDLLSRLEELEGLVS
SLREQGGGSGGGSGGGSMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLV
TLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSS
AKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL (SEQ ID NO: 3).

[80] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 85% идентичной SEQ ID NO. 3. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 3. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения CD40L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 3.

[81] Сшивающий агент

[82] Предполагается, что В-клетки по настоящему изобретению будут размножаться в присутствии сшивающего агента CD40L. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения сшивающий агент CD40L представляет собой антитело. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения область легкой цепи сшивающего антитела содержит:

[83]

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMNCKSSQSLLNSGNQRNYLAWYQQKPGQPPKLLIHGAST
RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHRYPLTFGAGTKLELKRADAA
PTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPKDKINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKST
YSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNREK (SEQ ID NO: 4)

[84] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения варибельная область легкой цепи сшивающего антитела содержит:

[85]

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMNCKSSQSLLNSGNQRNYLAWYQQKPGQPPKLLIHGAST
RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHRYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID
NO: 5)

[86] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения область тяжелой цепи сшивающего антитела содержит:

[87]

EVQLQQFGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPNYGST
SYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYYCARDWTGAMDYWGQGTSTV
VSSAKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSVHTFPALL
QSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKKLEPSGPISTINPCPPCKECKC
PAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISLTPKVTCTVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQT
QTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVY
ILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSK

LNMKTSKWEKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK (SEQ ID NO: 6)

[88] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения переменная область легкой цепи сшивающего антитела содержит:

[89]

EVQLQQFGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPNYGST
SYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYYCARDWTGAMDYWGQGTSVT
VSS (SEQ ID NO. 7)

[90] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 5, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 7. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 5, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит легкую цепь SEQ ID NO. 4 и тяжелую цепь SEQ ID NO. 6. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 85% идентичной SEQ ID NO. 4, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 85% идентичной SEQ ID NO. 6. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 4, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 6.

Сконструированные В-клетки

[91] В контексте данного документа термин «сконструированная В-клетка» относится к В-клетке, которая была генетически изменена для экспрессии желаемого белка или молекулы. Такой белок или молекула может представлять собой эндогенный или химерный рецептор. Такие сконструированные В-клетки могут быть генетически изменены для экспрессии «хоминг»-рецептора, который нацелен на конкретный тип ткани/органа или на опухоль или конкретный тип клеток.

1. Антигены

[92] **Опухолевые антигены.** В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения представляющий интерес сайт/мишень для В-клетки представляет собой опухолевый антиген. Выбор антигенсвязывающего домена (фрагмента) по настоящему изобретению будет зависеть от конкретного типа рака, подлежащего лечению. Некоторые опухолевые антигены могут быть мембраносвязанными, тогда как другие могут секретироваться. Например, опухолевый антиген может секретироваться и накапливаться во внеклеточном матриксе, или

опухолевый антиген может экспрессироваться как часть комплекса МНС. Опухолевые антигены хорошо известны в данной области техники и могут включать, например, следующие антигены: CD19, KRAS, HGF, CLL, глиомассоциированный антиген, карциноэмбриональный антиген (CEA); β -хорионический гонадотропин человека, альфафетопротейн (AFP), лектин-реактивный AFP, тиреоглобулин, RAGE-1, MN-CA IX, обратная транскриптаза теломеразы человека, RU1, RU2 (AS), кишечная карбоксилэстераза, mut hsp70-2, M-CSF, простаза, простатспецифический антиген (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, белок, PSMA, Her2/neu, сурвивин и теломераза, опухолевый антиген-1 карциномы предстательной железы (PSTA-1), MAGE, ELF2M, нейтрофильная эластаза, эфринB2, CD22, фактор роста инсулина (IGF)-I, IGF-II, рецептор IGF-I, мезотелин, EGFR, BCMA, KIT и IL-13.

[93] **Антигены инфекционных заболеваний.** В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения представляющий интерес сайт/мишень представляет собой антиген инфекционного заболевания, против которого может быть желательным иммунный ответ. Антигены инфекционных заболеваний хорошо известны в данной области техники и могут включать, помимо прочего, вирусы, бактерии, простейшие и паразитарные антигены, такие как паразиты, грибы, дрожжи, микоплазма, вирусные белки, бактериальные белки и углеводы, а также грибковые белки и углеводы. Кроме того, тип инфекционного заболевания антигена инфекционного заболевания конкретно не ограничен и может включать, помимо прочего, трудноизлечимые заболевания среди вирусных инфекционных заболеваний, такие как СПИД, гепатит В, инфекция, вызванная вирусом Эпштейна-Барр (EBV), HPV-инфекция, HCV-инфекция и т.д. Паразитарные антигены могут включать, помимо прочего, споровидный белок малярийного паразита.

[94] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированные В-клетки экспрессируют сконструированный В-клеточный рецептор (CAR-B), содержащий внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения внеклеточный домен содержит связывающий домен и шарнирный домен.

[95] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения внеклеточный домен содержит связывающий домен, такой как scFv, лиганд, антитело, рецептор или его фрагмент, который позволяет модифицированной В-клетке нацеливаться на конкретные целевые клетки путем связывания с белками, экспрессируемыми на поверхности этих клеток. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированные опухолевые клетки нацеливаются на белки/антигены, экспрессируемые на поверхности опухолевых клеток, и связываются с ними. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированная В-клетка дополнительно экспрессирует полезную нагрузку. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения полезная нагрузка способна увеличивать количество перекрестно представленных дендритных клеток (DC) в опухолях. В

определенных вариантах осуществления настоящего изобретения полезная нагрузка способна активировать и привлекать Т-клетки в опухоли. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения полезная нагрузка способна стимулировать образование третичных лимфоидных структур (TLS) в опухолях. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированная В-клетка экспрессирует как CAR-B, так и полезную нагрузку. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения CAR-B содержит стимулирующие домены, которые активируют экспрессию полезной нагрузки при связывании с антигеном или белком, экспрессируемым на поверхности опухолевой клетки.

[96] Дизайн и доменная ориентация химерных антигенных рецепторов в В-клетках (CAR-B)

[97] В различных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к химерному В-клеточному рецептору (CAR-B). Следует понимать, что химерные В-клеточные рецепторы (CAR-B) представляют собой генетически сконструированные рецепторы. Данные сконструированные рецепторы могут быть легко введены внутрь В-клеток и экспрессированы ими в соответствии с методами, известными в данной области техники. С помощью CAR-B одиночный рецептор можно запрограммировать как на распознавание конкретного белка или антигена, экспрессируемого на опухолевой клетке, так и на вызов противоопухолевого ответа при связывании с указанным белком или антигеном. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения CAR-B частично служат хоминг-механизмом для доставки В-клеток в целевую ткань.

[98] Следует понимать, что относительно клетки, несущей рецептор, химерный В-клеточный рецептор по настоящему изобретению будет содержать внеклеточный домен (который будет содержать антигенсвязывающий домен и может содержать внеклеточный сигнальный домен и/или шарнирный домен), трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Внутриклеточный домен содержит по меньшей мере активирующий домен, предпочтительно содержащий CD79a (иммуноглобулин α), CD79b (иммуноглобулин β), CD40, CD19, CD137, Fc γ 2a и/или MyD88. Следует также понимать, что антигенсвязывающий домен сконструирован таким образом, что он расположен во внеклеточной части молекулы/конструкции, так что он способен распознавать свою мишень или мишени и связываться с ними.

[99] Следует понимать, что структурно данные домены соответствуют местам, соответствующим иммунным клеткам. Типовые конструкции CAR-B в соответствии с настоящим изобретением представлены в Таблице 2.

ТАБЛИЦА 2

Название конструкции	Внеклеточный домен	Шарнир	ТМ	Сигнал 1	Сигнал 2
pWF-82	анти-PSMA	CD8	CD28	hCD19	

pWF-83	анти-PSMA	CD8	CD28	hCD40	
pWF-84	анти-PSMA	CD8	CD28	hCD40	CD79b
pWF-85	анти-PSMA	CD8	CD28	hCD40	CD137
pWF-86	анти-PSMA	CD8	CD28	hCD40	Fcγr2a
pWF-87	анти-PSMA	CD8	CD28	hMyd88	hCD40
pWF-88	анти-PSMA	CD8	CD28	CD79a	
pWF-89	анти-PSMA	CD8	CD28	CD79b	
pWF-391	анти-PSMA	3x strep II tag	CD28	CD79b	
pWF-394	анти-Саркогликан	3x strep II tag	CD28	CD79b	
pWF-396	анти-GPC-3	CD8	CD28	CD79a	
pWF-397	анти-GPC-3	CD8	CD28	CD79b	
pWF-460	анти-GPC-3	IgG1 Fc человека	CD28	CD79a	
pWF428	анти-GPC-3	Константная область лямбда человека	Константная область лямбда человека		
pWF429	анти-GPC-3	IgG1 Fc человека	IgG1 Fc человека		
pWF-521	Анти-GPC3 vL-hc константная область лямбда- линкер-vH-hcH1- сH2-сH3	IgG1 Fc человека	IgG1 человека	Эндогенный комплекс BCR	
pWF-533	Анти-GPC3-vL- hcH1		IgG1 человека (комплекс с pWF534)	Эндогенный комплекс BCR	
pWF-534	Анти-GPC3-vH- hcКаппа-hcH2- сH3	IgG1 Fc человека	IgG1 человека	Эндогенный комплекс BCR	

[100] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения химерные В-клеточные рецепторы содержат внеклеточный домен, трансмембранный домен и

цитоплазматический домен. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения цитоплазматический домен содержит активирующий домен. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения цитоплазматический домен также может содержать костимулирующий домен. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения внеклеточный домен содержит антигенсвязывающий домен. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения внеклеточный домен дополнительно содержит шарнирную область между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом.

[101] **Внеклеточный домен.** В настоящем изобретении можно применять ряд внеклеточных доменов. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения внеклеточный домен содержит антигенсвязывающий домен. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения внеклеточный домен также может содержать шарнирную область и/или сигнальный домен. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения внеклеточные домены, содержащие константный домен IgG1, также могут содержать либо IgG1 (впадина), либо IgG1 (выступ) для облегчения направленного образования sBCR.

[102] **Антигенсвязывающий домен и связывающий домен.** В контексте данного документа термины «антигенсвязывающий домен», «домен, связывающий антиген» или «связывающий домен» относятся к части B-CAR, способной связывать антиген или белок, экспрессируемый на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающий домен связывается с антигеном или белком на клетке, вовлеченным в патогенез гиперпролиферативного заболевания. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающий домен связывается с антигеном или белком, экспрессируемым на поверхности опухолевой клетки. Антигенсвязывающие молекулы будут более понятны с учетом приведенных ниже определений и описаний.

[103] Как сообщается, антигенсвязывающий домен «специфически связывает» целевой антиген или белок, когда константа диссоциации (K_d) составляет 1×10^{-7} М. Антигенсвязывающий домен специфически связывает антиген с «высокой аффинностью», когда значение K_d составляет $1-5 \times 10^{-9}$ М, и с «очень высокой аффинностью», когда значение K_d составляет $1-5 \times 10^{-10}$ М. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающий домен имеет значение K_d 10^{-9} М. В одном варианте осуществления настоящего изобретения скорость диссоциации составляет $< 1 \times 10^{-5}$. В других вариантах осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающий домен будет связываться с антигеном или белком со значением K_d около от 10^{-7} М до 10^{-13} М, а в еще одном варианте осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающий домен будет связываться со значением K_d $1,0-5,0 \times 10$.

[104] Как сообщается, антигенсвязывающий домен является «селективным», когда он связывается с одной мишенью более прочно, чем со второй мишенью.

[105] Термин «нейтрализующий» относится к антигенсвязывающему домену,

который связывается с лигандом и предотвращает или снижает биологический эффект этого лиганда. Это может быть осуществлено, например, посредством непосредственного блокирования сайта связывания на лиганде или посредством связывания с лигандом и изменения способности лиганда к связыванию посредством не прямых воздействий (таких как структурные или энергетические изменения в лиганде). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения этот термин может также обозначать антигенсвязывающий домен, который предотвращает выполнение биологической функции белком, с которым он связан.

[106] Термин «**мишень**» или «**антиген**» относится к молекуле или части молекулы, способной связываться антигенсвязывающей молекулой. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения мишень может иметь один или большее количество эпитопов.

[107] Термин «**антитело**» относится к так называемым иммуноглобулинам, Y-образным белкам, которые вырабатываются иммунной системой для распознавания определенного антигена. Термин «фрагмент антитела» относится к антигенсвязывающим фрагментам и фрагментам Fc антител. Типы антигенсвязывающих фрагментов включают: молекулы F(ab')₂, Fab, Fab' и Fv. Фрагменты Fc полностью образуются из константной области тяжелой цепи иммуноглобулина.

[108] **Внеклеточные сигнальные домены.** Внеклеточный домен является положительным для сигналинга и для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. Внеклеточные домены, которые конкретно применяются в настоящем изобретении могут быть получены из следующих элементов (т.е., содержать их): CD28, CD28T (*см., например, заявку на патент США US2017/0283500A1*), OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, белок программируемой гибели клеток-1 (PD-1), индуцируемый костимулятор Т-клеток (ICOS), антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, CD79a (иммуноглобулин α), CD79b (иммуноглобулин β), DAP-10, Fc гамма рецептор, молекула MHC класса I, TNF рецепторные белки, белок иммуноглобулина, цитокиновый рецептор, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), рецепторы активации NK-клеток, BTLA, рецепторы Toll-лигандов, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 la, LFA-1, ITGAM, CD1 lb, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганд, который специфически связывается с CD83, или любые их комбинации. Внеклеточный домен может быть

образован либо из природного, либо из синтетического источника.

[109] **Шарнирные домены.** Как описано в данном документе, внеклеточные домены зачастую содержат шарнирную область. Это часть внеклеточного домена, проксимальная к клеточной мембране. Внеклеточный домен может дополнительно содержать спейсерную область. В соответствии с настоящим изобретением может применяться разнообразие шарниров, в том числе костимулирующие молекулы, как обсуждалось выше, а также последовательности иммуноглобулина (Ig), спейсер 3X strep II или другие подходящие молекулы, для достижения необходимого пространственного расстояния от целевой клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вся внеклеточная область содержит шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения шарнирная область содержит внеклеточный домен CD28 или CD8 или его часть, как описано в настоящем документе.

[110] **Трансмембранные домены.** В-CAR может быть сконструирован так, чтобы содержать трансмембранный домен, который слит или иным образом связан с внеклеточным доменом В-CAR. Его аналогичным образом можно слить с внутриклеточным доменом В-CAR. В одном варианте осуществления настоящего изобретения применяют трансмембранный домен, который в естественных условиях связан с одним из доменов в В-CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован посредством аминокислотного замещения во избежание связывания таких доменов с их трансмембранными доменами или различными белками поверхностной мембраны для сведения к минимуму взаимодействий с другими представителями комплекса рецепторов. Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, то домен может быть образован из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. Трансмембранные области, которые конкретно применяются в настоящем изобретении могут быть получены из следующих элементов (*m.e.* содержать их): CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, белок программируемой гибели клеток-1 (PD-1), индуцируемый костимулятор Т-клеток (ICOS), антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, CD79a (иммуноглобулин α), CD79b (иммуноглобулин β), DAP-10, Fc гамма рецептор, молекула МНС класса 1, TNF рецепторные белки, белок иммуноглобулина, цитокиновый рецептор, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), рецепторы активации NK-клеток, BTLA, рецепторы Toll-лигандов, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 1a, LFA-1, ITGAM, CD1 1b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160

(BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганд, который специфически связывается с CD83, или любые их комбинации.

[111] Необязательно, короткие линкеры могут образовывать связи между любыми или некоторыми внеклеточными, трансмембранным и внутриклеточными доменами В-CAR.

[112] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения трансмембранный домен в В-CAR по настоящему изобретению представляет собой трансмембранный домен CD28. В одном варианте осуществления настоящего изобретения трансмембранный домен в В-CAR по настоящему изобретению представляет собой трансмембранный домен CD8.

[113] **Внутриклеточные (цитоплазматические) домены.** Внутриклеточный (IC или цитоплазматический) домен рецепторов В-CAR по настоящему изобретению может обеспечивать активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки.

[114] Следует понимать, что подходящие внутриклеточные молекулы включают, помимо прочего, CD79a (иммуноглобулин α), CD79b (иммуноглобулин β), CD40, CD19, CD137, Fc γ 2a и MyD88. Внутриклеточные молекулы могут дополнительно включать следующие элементы: CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, белок программируемой гибели клеток-1 (PD-1), индуцируемый костимулятор Т-клеток (ICOS), антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, CD79a (иммуноглобулин α), CD79b (иммуноглобулин β), DAP-10, Fc гамма рецептор, молекула МНС класса 1, TNF рецепторные белки, белок иммуноглобулина, цитокиновый рецептор, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), рецепторы активации NK-клеток, BTLA, рецепторы Toll-лигандов, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 1a, LFA-1, ITGAM, CD1 1b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганд, который специфически связывается с CD83, или любые их комбинации. Цитоплазматические сигнальные последовательности в цитоплазматической сигнальные части CAR-B по настоящему изобретению могут быть связаны между собой в случайном или определенном порядке.

[115] В контексте данного документа термин «**костимулирующий**» домен или

молекула, относится к гетерогенной группе молекул клеточной поверхности, которые действуют, усиливая или противодействуя первоначальным активирующим сигналам клетки.

[116] В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения цитоплазматический домен сконструирован так, чтобы содержать сигнальный домен hCD19. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения цитоплазматический домен сконструирован так, чтобы содержать сигнальный домен hCD40. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения цитоплазматический домен сконструирован так, чтобы содержать сигнальный домен hCD40 и hCD79b. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения цитоплазматический домен сконструирован так, чтобы содержать сигнальный домен hCD40 и hCD137. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения цитоплазматический домен сконструирован так, чтобы содержать сигнальный домен hCD40 и hFcγ2a. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения цитоплазматический домен сконструирован так, чтобы содержать сигнальный домен hCD40 и hMyd88. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения цитоплазматический домен сконструирован так, чтобы содержать сигнальный домен hCD79a. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения цитоплазматический домен сконструирован так, чтобы содержать сигнальный домен hCD79b. Эти варианты осуществления настоящего изобретения предпочтительно имеют человеческое происхождение, но могут быть получены и от других видов.

Модифицированные В-клетки, экспрессирующие полезную нагрузку.

[117] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается модифицированная В-клетка, способная экспрессировать полезную нагрузку. В контексте данного документа термин **«полезная нагрузка»** относится к аминокислотной последовательности, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид или белок, или молекуле РНК, для применения в качестве терапевтического агента. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения полезная нагрузка предназначена для доставки в опухоль или микроокружение опухоли. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения желательно, чтобы В-клетка доставляла в опухоль или микроокружение опухоли полезную нагрузку, способную, например, увеличивать количество перекрестно представленных дендритных клеток (DC) в опухолях. Перекрестно представленные DC позволят улучшить представление опухолевых антигенов. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения полезная нагрузка может быть способна активировать и привлекать Т-клетки в опухоли. Активация большего количества Т-клеток в опухолях будет дополнять перекрестно представленные DC, изменяя микроокружение опухоли и обеспечивая более мощные противоопухолевые иммунные возможности. Полезные нагрузки также могут способствовать образованию третичных лимфоидных структур (TLS) в опухолях.

Клинические исследования продемонстрировали, что существует взаимосвязь между В-клетками, TLS и ответами на блокаду иммунных контрольных точек.

[118] Неисключающие примеры полезной нагрузки по настоящему изобретению включают: IL-1, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-21, интерферон α , интерферон β , интерферон γ , TSLP, CCL21, FLT3L, XCL1, LIGHT (TNFSF14), OX40L, CD137L, CD40L, ICOSL, антитело анти-CD3, CD47, TIM4-FC, CXCL13, CCL21, CD80, CD40L, IFN α A2, LIGHT, 4-1BBL, MDGF (C19orf10), FGF10, PDGF, агрин, TNF- α , GM-CSF, антитело анти-FAP, антитело анти-TGF- β ; ловушка TGF- β , приманка или другая ингибирующая молекула; антитело анти-BMP; ловушка BMP, приманка или другая ингибирующая молекула.

[119] **Сигналинг для экспрессии полезной нагрузки.** В различных вариантах осуществления настоящего изобретения полезная нагрузка экспрессируется в модифицированной В-клетке в виде конструкции ДНК под контролем активированного пути транскрипции. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия полезной нагрузки контролируется путем ядерного фактора активированных Т-клеток («NFAT»). Путь NFAT представляет собой путь фактора транскрипции, активируемый во время иммунного ответа и активируемый NF κ B. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированная В-клетка экспрессирует как полезную нагрузку, так и CAR-В. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых модифицированная В-клетка экспрессирует как полезную нагрузку, так и CAR-В, CAR-В может дополнительно кодировать сигнальные молекулы, которые индуцируют активацию путикВ NF. Такие молекулы включают, помимо прочего: CD79a (иммуноглобулин α), CD79b (иммуноглобулин β), CD40, CD19, CD137, Fc γ 2a и MyD88.

[120] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения изобретение относится к выделенным В-клеткам, которые экспрессируют по меньшей мере одну полезную нагрузку. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения изобретение относится к выделенным В-клеткам, которые экспрессируют более одной полезной нагрузки. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения изобретение относится к выделенным В-клеткам, которые экспрессируют 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 различных полезных нагрузок.

[121] **Модификация В-клеток для хоминга.** В различных вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные В-клетки могут быть модифицированы с помощью хоминг-доменов (например, как проиллюстрировано на ФИГ. 2) так, что В-клетки могут направляться к представляющему интерес сайту/мишени и активироваться при взаимодействии с мишенью. Кроме того, хоминг-рецепторы В-клеток, экспрессируемые на мембранах В-клеток, которые распознают адресины и лиганды в целевых тканях, соединения или их производные, которые изменяют транспортировку В-клеток в определенный сайт, а также молекулы, ингибирующие воспаление и аутоиммунную активность В-клеток, могут играть роль в

хомингу В-клеток и развитии специализированных иммунных ответов.

[122] **Модифицированные В-клетки, экспрессирующие интегрин, представляющий интерес.** Основными хоминг-рецепторами, экспрессируемыми лимфоцитами, являются интегрин, которые представляют собой большой класс молекул, характеризующихся гетеродимерной структурой α и β цепей. В целом спаривание конкретных α и β цепей интегрин определяет тип хоминг-рецептора. Например, спаривание $\alpha 4$ цепи с $\beta 7$ цепью характеризует основную молекулу интегрин ($\alpha 4\beta 7$), ответственную за связывание лимфоцитов с молекулой клеточной адгезии мукозального адресина 1 (MAdCAM-1), экспрессируемой на венах с высоким эндотелием (HEV) в пейеровых бляшках (PP) и эндотелиальных венах (LPV) lamina propria желудочно-кишечного тракта (GI). Аналогично, спаривание $\alpha 4$ цепи с $\beta 1$ цепью характеризует хоминг-рецептор ($\alpha 4\beta 1$) кожи.

[123] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетка, подлежащая модификации, может быть выбрана заранее с конкретными признаками, которые опосредуют предпочтительную локализацию. Например, В-клетки памяти, экспрессирующие CXCR3, можно обогатить, а затем подвергнуть структурированию. Клетки CXCR3 могут привлекать лиганды, экспрессируемые в сайтах воспаления. Таким образом, модифицированные В-клетки могут преимущественно локализоваться в таких сайтах.

[124] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается модифицированная В-клетка, которая экспрессирует $\alpha 4$ и $\beta 7$ цепи интегрин. Желательно, чтобы экспрессия интегрин $\alpha 4\beta 7$ способствовала хомингу модифицированных В-клеток в толстую кишку. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается модифицированная В-клетка, которая the α экспрессирует 4 и $\beta 1$ цепи интегрин. Желательно, чтобы экспрессия интегрин $\alpha 4\beta 1$ способствовала хомингу модифицированных В-клеток в толстую кишку. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается модифицированная В-клетка, которая экспрессирует желаемую пару α и β цепи интегрин, так что экспрессированный интегрин способствует хомингу модифицированной В-клетки в желаемый и представляющий интерес сайт/мишень. Соответственно, в различных вариантах осуществления настоящего изобретения любая желаемая комбинация α и β цепей интегрин рассматривается для экспрессии в В-клетках, так что модифицированные В-клетки, экспрессирующие конкретный интегрин, нацеливаются на желаемый и представляющий интерес сайт/мишень.

[125] **Модифицированные В-клетки, экспрессирующие хоминг-рецепторы, представляющие интерес.** В-клетки обладают способностью направляться к воспалительным тканям, и изменение экспрессии их хоминг рецепторов может дополнять их нативные хоминг-тенденции. Локализация В-клеток также определяется экспрессией молекул-аттрактантов (например, мишеней, таких как лиганды и хемокины) в сайтах воспаления в конкретных местах или тканях. Такие молекулы также могут включать

антитела, такие как антитело MECA79, которое нацеливает клетки на адрессин периферического узла (PNAd). Bahmani *et al.*, J Clin Invest. 2018;128(11):4770-4786; Azzi *et al.*, Cell Rep. 2016;15(6):1202-13. Соответственно, В-клетки могут быть сконструированы так, чтобы они экспрессировали определенные антитела, белки и рецепторы, которые облегчают хоминг В-клеток к представляющему интерес сайту/мишени и взаимодействие таких В-клеток с желаемой мишенью. В определенных случаях экспрессия таких рецепторов перенаправляет В-клетки в ткань, которая представляет интерес.

[126] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения настоящего изобретения предлагается модифицированная В-клетка, способная экспрессировать хоминг-антитело, -белок или -рецептор, экспрессия которых способна направлять В-клетку к конкретному представляющему интерес сайту/мишени. Типовой пример хоминга Т-клеток к конкретным хоминг-тканям (целевым тканям) с применением конкретных пар хоминг-рецептора/-лиганда представлен в Таблице 3. Те же самые конкретные пары хоминг-рецептора/-лиганда также способны облегчать хоминг В-клеток к конкретной хоминг-ткани (целевой ткани). Соответственно, в различных вариантах осуществления настоящего изобретения настоящего изобретения хоминг модифицированных В-клеток в типовую хоминг-ткань (целевую ткань) облегчается с применением соответствующих пар хоминг-рецептора/-лиганда, как представлено в Таблице 3.

ТАБЛИЦА 3

Хоминг-рецепторы T_{eff} клеток и их родственные лиганды, опосредующие органотропное нацеливание		
Тип хоминг-ткани	Хоминг-рецепторы T_{eff}клеток	Родственный лиганд
Кожа	CLA (гликоформа PSGL-1)	E/P-селектин
	CD43E	E-селектин
	VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$)	VCAM-1
	LFA-1 ($\alpha_1\beta_2$)	ICAM-1
	CCR4	CCL17
	CCR10	CCL27
	Кишечный тракт (кишечник, толстая кишка, mLN, PP)	$\alpha_4\beta_7$
CCR9 ^a		CCL25 ^a
CXCR4		CXCL12
Селективные лиганды ^b		E/P-селектин ^b
VLA-4 ^b		VCAM-1 ^b
LFA-1 ^b		ICAM-1 ^b

	CCR6 ^b	CCL20 (MIP-3 α) ^b
Печень	CD44	Гиалуронат
	VLA-4	VCAM-1
	CCR5	CCL5
		VAP-1
	Селективные лиганды ^b	E/P-селектин
	$\alpha_4\beta_7$ ^b	MAdCAM-1 ^b
Легкие	LFA-1	ICAM-1
	CCR3	CCL28
	CCR4	CCL17
	CXCR4	CXCL12
	Селективные лиганды ^b	E/P-селектин ^b
	VLA-4 ^b	VCAM-1 ^b
	LFA-1 ^b	ICAM-1 ^b
Костный мозг	CLA (гликоформа PSGL-1)	E/P-селектин
	CD43E	E-селектин
	VLA-4	VCAM-1
	LFA-1	ICAM-1
	CXCR4	CXCL12
	$\alpha_4\beta_7$ ^b	MAdCAM-1 ^b
Сердце	CCR5	CCL4, CCL5
	CCR4	?
	CXCR3	CXCL10
	c-Met	HGF
Головной мозг	VLA-4 ^b	VCAM-1 ^b
	LFA-1 ^b	ICAM-1 ^b
	CXCR3 ^b	CXCL9/CXCL10 ^b
Периферийный LN^c	Селективные лиганды ^b	E/P-селектин ^b
	LFA-1 ^b	ICAM-1 ^b
	CXCR3 ^b	CXCL9/CXCL10 ^b

^aУчаствует в хоминге T_{eff} клеток к кишечнику, но не к толстой кишке.

^bВоспалительные реакции, травмирование тканей.

°В невоспалительных, стабильных условиях клетки T_{eff} обычно теряют экспрессию L-селектина и CCR7 и в значительной степени ограничены в доступе к LN, хотя могут проникать во время воспалительных реакций (b), как продемонстрировано. Напротив, как наивные T-клетки, так и T_{cm} клетки экспрессируют L-селектин, CCR7 и CXCR4 и задействуют PNA_d, CCL19/CCL21 и CXCL12 соответственно, чтобы подвергаться скручиванию T-клеток и LFA-1/ICAM-1/2-опосредованной адгезии и трансмиграции в LN.

[127] Типовой тип хоминг-ткани (целевая ткань), а также лиганд или хемокин, которые обеспечивают тканеограниченный хоминг В-клеток в соответствии с настоящим изобретением, представлены в Таблице 4.

ТАБЛИЦА 4

Тип хоминг-ткани	Лиганд/Хемокины
CNS	VCAM-1, CD62P, лиганды для CCR1,2, 5, CXCR3
Печень	CD62P, VAP-1, CXCL16
Тонкий кишечник	MAdCAM, CD62P, CCL25
Толстая кишка	MAdCAM, CD62P, CCL20, GPR15L
Кожа	CD62E, CD62P, CCL17(22), ICAM-1
Вилочковая железа	VCAM, CD62P, CCL25
Периферический лимфатический узел	PNA _d , CCL21, ICAM-1
Пейерова бляшка	MAdCAM, CCL21, CXCL13
Костный мозг	VCAM, CD62P, CXCL12, ICAM-1

[128] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается модифицированная В-клетка, которая экспрессирует одно или большее количество антител, белков или рецепторов, которые облегчают хоминг модифицированной В-клетки к типовым целевым/хоминг-тканям с применением конкретных пар хоминг-рецептора/-лиганда, как представлено в Таблице 3. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается модифицированная В-клетка, которая экспрессирует одно или большее количество хоминг-рецепторов, которые облегчают хоминг модифицированной В-клетки к типовой целевой/хоминг-ткани с помощью лиганда или хемокинов, представленных в Таблицах 3 и /или 4. В контексте данного документа термин «**хоминг В-клеток**» относится к локализации, нацеливанию, транспортировке, направлению или перенаправлению В-клетки по настоящей заявке на

представляющий интерес сайт/мишень, например, относится к хомингу в целевую ткань, воспалительный сайт в конкретном месте или ткани, или опухоль или микроокружение опухоли, куда желательна доставка терапевтической нагрузки. Как применяется в контексте хоминга В-клеток термин «**антитело**», «**белок**» или «**рецептор**» относится к аминокислотной последовательности, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид или белок, или молекуле РНК, предназначенной для применения в качестве терапевтического агента, который при экспрессии в модифицированной В-клетке по настоящему изобретению будет направлять В-клетку к представляющему интерес сайту/мишени.

[129] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения хоминг-антитело, белок или рецепторная молекула предназначены для хоминга/нацеливания модифицированной В-клетки, экспрессирующей такую молекулу, на представляющий интерес сайт/мишень. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения хоминг-антитело, белок или рецепторная молекула предназначены для хоминга/нацеливания модифицированной В-клетки, экспрессирующей такую молекулу, на воспалительные сайты в конкретных местах или тканях. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения хоминг-антитело, -белок или -рецептор предназначены для нацеливания В-клетки на опухоль или микроокружение опухоли. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения желательно нацеливание В-клеток на определенные места, чтобы сконструированные или модифицированные В-клетки по настоящему изобретению могли доставлять терапевтическую полезную нагрузку в желаемые места, которые представляют интерес, например, в хоминг- или целевую ткань, воспалительный сайт в конкретном месте или ткани, или опухоль или микроокружение опухоли. Соответственно, в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения желательно, чтобы В-клетки направлялись к представляющему интерес сайту/мишени, например, в опухоль или микроокружение опухоли, и доставляли в представляющий интерес сайт/мишень полезную нагрузку, способную, например, увеличивать количество перекрестно представленных дендритных клеток (DC) в представляющем интерес сайте/мишени (например, в опухолях).

[130] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения хоминг-антитело, -белок или -рецептор экспрессируются в модифицированной или сконструированной В-клетке в виде конструкции ДНК. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения хоминг-антитело, -белок или -рецептор экспрессируются в модифицированной В-клетке в виде конструкции ДНК под контролем конститутивно активированного пути транскрипции. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения хоминг-антитело, -белок или -рецептор, участвующие в хоминге/нацеливании на В-клетки, либо не экспрессируются в В-клетке в естественных условиях, либо экспрессируются на более высоких уровнях, чем экспрессируются в В-клетке в естественных условиях. Типовой хоминг

модифицированных В-клеток к конкретным целевым тканям с применением конкретных пар хоминг рецептора/-лиганда в соответствии с настоящим изобретением представлен в Таблице 4. Следует понимать, что, несмотря на типовые хоминг-ткани, хоминг-рецептор и пары лигандов, представленные в Таблице 4, модифицированная В-клетка по настоящему изобретению может быть сконструирована для экспрессии любого хоминг-антитела, - белка или -рецептора (например, любого хоминг-рецептора, представленного в Таблице 5), так что модифицированную В-клетку можно направить к конкретному представляющему интерес сайту/мишени.

ТАБЛИЦА 5

Тип хоминг-ткани	Хоминг-рецептор	Лиганд/Хемокин
Печень	CXCR6	CXCL16
Тонкий кишечник	CCR9	CCL25
Толстый кишечник (толстая кишка)	CCR6	CCL20
Лимфатический узел	CCR7	CCL21
Костный мозг	CXCR4	CXCL12
Пейерова бляшка	CCR7 и CXCR5	CCL21 и CXCL13 соответственно
Кожа	CCR4	CCL17(22)

[131] Неисключающие примеры хоминг (целевых) тканей для конкретных пар хоминг-рецептора/-лиганда по настоящему изобретению включают: кожу, кишечный тракт (кишечник, толстая кишка, брыжеечные лимфатические узлы (mLN), пейерова бляшка (PP), тонкая кишка), печень, легкие, костный мозг, сердце, периферические лимфатические узлы (LN), CNS, тимус и костный мозг.

[132] Неисключающие примеры хоминг-рецепторов, которые могут быть соединены с конкретными или соответствующими аттрактантами/лигандами/хемокинами по настоящему изобретению, включают: CLA (гликоформа PSGL-1), CLA (гликоформа PSGL-1), CCR10, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR9, CD43E, CD44, c-Met, CXCR3, CXCR4, LFA-1, LFA-1 (α L β 2), лиганды селектина, VLA-4, VLA-4 (α 4 β 1) и α 4 β 7.

[133] Неисключающие примеры лигандов/хемокинов, которые могут быть соединены с конкретными или соответствующими хоминг-рецепторами по настоящему изобретению, включают: CXCL16, CCL17, CCL17(22), CCL20 (MIP-3 α), CCL21, CCL25, CCL27, CCL28, CCL4, CCL5, CD62E, CD62P, CXCL10, CXCL12, CXCL13, CXCL16, CXCL9/CXCL10, CXCR3, E/P-селектин, E-селектин, GPR15L, HGF, гиалуронат, ICAM-1, лиганды для CCR1,2, 5, MAdCAM, MAdCAM-1, PNA α , VAP-1, VCAM и VCAM-1.

[134] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения

предлагается модифицированная В-клетка, которая экспрессирует или имеет повышенную экспрессию типовых хоминг-рецепторов В-клеток (*например*, как представлено в Таблице 3), так что модифицированная В-клетка нацеливается на соответствующую представляющую интерес хоминг-ткань, которая экспрессирует соответствующие лиганды/хемокины (*например*, как представлено в Таблицах 3 и/или 4). В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается модифицированная В-клетка, которая совместно экспрессирует интегрин с конкретной парой α и β цепей и конкретным хоминг-рецептором В-клеток (например, как представлено в Таблицах 3 и/или 4), экспрессия из которых интегрин и/или хоминг-рецептора способствуют или облегчают хоминг/нацеливание модифицированной В-клетки на представляющий интерес сайт/мишень. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается модифицированная В-клетка, которая совместно экспрессирует интегрин $\alpha 4\beta 7$ и CCR9. Желательно, чтобы совместная экспрессия $\alpha 4\beta 7$ и CCR9 способствовала хомингу модифицированных В-клеток в тонкий кишечник по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается модифицированная В-клетка, которая совместно экспрессирует интегрин $\alpha 4\beta 1$ и CCR4. Желательно, чтобы совместная экспрессия $\alpha 4\beta 1$ и CCR4 способствовала хомингу модифицированных В-клеток в тонкий кишечник по настоящему изобретению.

[135] Модифицированные В-клетки, экспрессирующие иммуноингибирующие молекулы. В-клетки играют ключевую роль во многих аутоиммунных заболеваниях. Однако В-клетки можно применять в терапевтических целях для противодействия аутоиммунным процессам. В частности, В-клетки можно сконструировать так, чтобы они экспрессировали по меньшей мере одну или большее количество иммуноингибирующих молекул, которые могут снижать аутоиммунную активность В-клеток, приводя к уменьшению частоты аутоиммунных заболеваний. Иммуноингибирующие молекулы хорошо известны в данной области техники. Такие ингибирующие молекулы могут включать, помимо прочего, IL-10, TGF- β , PD-L1, PD-L2, LAG-3 и TIM-3. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается модифицированная В-клетка, сконструированная для экспрессии по меньшей мере одной или большего количества ингибирующих молекул, выбранных из IL-10, TGF- β , PD-L1, PD-L2, LAG-3, и TIM-3 или любых их комбинаций, так что воспаление в этом сайте и аутоиммунная активность В-клеток, локализованных в этом сайте, уменьшаются, тем самым приводя к положительному терапевтическому ответу.

[136] Соединения, которые изменяют транспортировку В-клеток. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается модифицированная В-клетка, которую обрабатывают по меньшей мере одним или большим количеством соединений или их производными, которые изменяют транспортировку В-клеток путем индуцирования экспрессии конкретного интегрин В-клеток и/или хоминг рецептора. Соединения или их производные, которые изменяют транспортировку В-клеток, хорошо известны в данной области техники. В определенных

вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается модифицированная В-клетка, обработанная полностью транс-ретиноевой кислотой (АТРА) или ее производными, которые способствуют хомингу В-клеток в кишечный тракт (тонкую кишку) вследствие повышенной экспрессии интегрина $\alpha 4\beta 7$ и хоминг-рецептора CCR9. В контексте данного документа термин «соединение» относится к химическому веществу, лекарственному средству, терапевтическому агенту или их производным, которые изменяют транспортировку В-клеток желаемым образом.

[137] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированную В-клетку, сконструированную для совместной экспрессии конкретного интегрин (например, с конкретной парой α и β цепей) и конкретного хоминг-рецептора В-клетки, который представляет интерес, обрабатывают по меньшей мере одним или большим количеством соединений или их производных, которые изменяют транспортировку модифицированных В-клеток и способствуют хомингу клеток к конкретному представляющему интерес сайт/мишени, вследствие повышенной экспрессии конкретного интегрин и/или хоминг-рецептора. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетка, модифицированная для совместной экспрессии интегрин с конкретными парами α и β цепей и конкретным хоминг-рецептором В-клеток, дополнительно экспрессирует по меньшей мере одну или большее количество иммуноингибирующих молекул, так что аутоиммунная активность модифицированных В-клеток, нацеленных на конкретный сайт воспаления, уменьшается, что приводит к уменьшению аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированную В-клетку, сконструированную для экспрессии одной или большего количества иммуноингибирующих молекул, например, IL-10, TGF- β , PD-L1, PD-L2, LAG-3 и TIM-3 или их комбинаций, обрабатывают АТРА или его производными в течение конкретного периода времени, так что индуцируется экспрессия интегрин $\alpha 4\beta 7$ и хоминг-рецептора CCR9, что способствует хомингу В-клеток к конкретному представляющему интерес сайт/мишени (например, к кишечному тракту), при этом воспаление в этом сайте и аутоиммунная активность В-клеток, локализованных в этом сайте, уменьшаются, что приводит к положительному терапевтическому ответу. В одном варианте осуществления настоящего изобретения модифицированную В-клетку, сконструированную для экспрессии одной или большего количества иммуноингибирующих молекул, например, IL-10, TGF- β или их комбинаций, обрабатывают АТРА или его производными в течении конкретного периода времени, так что индуцируется экспрессия интегрин $\alpha 4\beta 7$ и хоминг-рецептора CCR9, что способствует хомингу В-клеток к представляющему интерес сайт/мишени (например, к кишечному тракту), при этом воспаление в этом сайте и аутоиммунная активность В-клеток, локализованных в этом сайте, уменьшаются, что приводит к положительному терапевтическому ответу.

[138] Понятно, что любая В-клетка по настоящему изобретению, модифицированная для совместной экспрессии конкретного интегрин В-клеток и

хоминг-рецептора, который нацеливает В-клетку на конкретную представляющую интерес хоминг-/целевую ткань, может быть дополнительно сконструирована для экспрессии одного или большего количества иммуоингибирующих молекул для уменьшения воспаления и аутоиммунной активности В-клеток, локализованных на этом сайте и/или обработанных соединением, которое изменяет хоминг/нацеливание модифицированных В-клеток путем индуцирования экспрессии конкретного интегрина В-клеток и/или хоминг-рецептора.

[139] **Активация В-клеток TLR агонистами и TLR.** В-клетки обладают естественной способностью поглощать и представлять антигены, распознаваемые их специфическими рецепторами В-клеток (BCR). В-клетки, активированные Toll-подобными рецепторами (TLR), приводят к образованию мощных эффекторных В-клеток, защищающих организм при иммунном ответе. Экспрессия или повышение экспрессии TLR в В-клетках может запускать механизм потенцирования В-клетками врожденных сигналов, регулирующих адаптивные иммунные ответы.

[140] **Активация В-клеток агонистами TLR.** В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается В-клетка, при этом В-клетку обрабатывают *in vitro* или *ex vivo* по меньшей мере одним агонистом TLR. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения TLR может представлять собой TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 и/или TLR13. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения агонист TLR предпочтительно связывается с одним или большим количеством TLR, выбранными из группы, состоящей из TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 и TLR13. Агонисты TLR хорошо известны в данной области техники и могут включать, помимо прочего, богатые на CpG олигонуклеотиды и имитаторы двухцепочечной РНК, соединение «полиинозиновая кислота:полицитидиловая кислота» (поли-I:C). В различных вариантах осуществления настоящего изобретения агонист TLR может представлять собой CpG олигонуклеотиды.

[141] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения каждую В-клетку можно обрабатывать одним агонистом TLR. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения каждую В-клетку можно обрабатывать более чем одним агонистом TLR. Например, каждую В-клетку можно обрабатывать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 различными агонистами TLR. В альтернативном варианте пациенту можно вводить гетерогенную популяцию В-клеток, при этом каждую В-клетку обрабатывают уникальным агонистом TLR или комбинацией агонистов TLR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетки для применения терапевтического агента обрабатывают одним или большим количеством агонистов TLR одновременно или перед введением В-клеток субъекту или пациенту, нуждающемуся в этом. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения лечение одним или большим количеством агонистов TLR способно продуцировать более мощные эффекторные В-клетки для защиты организма при иммунном ответе. В определенных

вариантах осуществления настоящего изобретения лечение одним или большим количеством агонистов TLR способно усиливать иммунные ответы В-клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения обработка В-клетки по настоящему изобретению по меньшей мере одним или большим количеством агонистов TLR индуцирует экспрессию или активацию одного или большего количества TLR.

[142] **Активация В-клеток посредством экспрессии TLR.** В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается модифицированная В-клетка, способная экспрессировать конститутивно активный TLR. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения TLR экспрессируется в модифицированной или сконструированной В-клетке в виде конструкции ДНК под контролем конститутивно активированного пути транскрипции. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения TLR либо не экспрессируется в В-клетке в естественных условиях образом, либо экспрессируется на более высоких уровнях, чем экспрессируется в В-клетке в естественных условиях. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения TLR может представлять собой TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 и/или TLR13.

[143] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения каждая В-клетка может экспрессировать более одного конститутивно активного TLR. Например, каждая В-клетка может экспрессировать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 13 различных конститутивно активных TLR. В альтернативном варианте пациенту можно вводить гетерогенную популяцию В-клеток, каждая из которых способна экспрессировать и/или секретировать уникальный TLR или комбинацию TLR, которые являются конститутивно активными. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения субъекту или пациенту посредством гетерогенной популяции В-клеток можно вводить 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 различных конститутивно активных TLR.

[144] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетка представляет собой модифицированную В-клетку, которая экспрессирует по меньшей мере один конститутивно активный TLR. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированную В-клетку, которая экспрессирует по меньшей мере один конститутивно активный TLR, обрабатывают одним или большим количеством агонистов TLR. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия конститутивно активного TLR способна продуцировать более мощные эффекторные В-клетки для защиты организма при иммунном ответе. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессия конститутивно активного TLR способна усиливать иммунные ответы В-клеток. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированная В-клетка экспрессирует как конститутивно активный TLR, так и любой CAR-В согласно настоящей заявке. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированную В-клетку, экспрессирующую конститутивно активный TLR, и/или CAR-В, дополнительно обрабатывают одним или большим

количеством агонистов TLR одновременно или перед введением модифицированных В-клеток субъекту или пациенту, нуждающемуся в этом. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетки могут быть сконструированы для экспрессии полезных нагрузок и модификаторов, таких как TLR, в отсутствие CAR-V для внутриопухолевого введения.

[145] **Модифицированные В-клетки, которые одновременно представляют антигены в молекулах HLA класса I и класса II.** В-клетки, помимо своей функции продуцирования антител, также экспрессируют высокий уровень молекул лейкоцитарного антигена человека (HLA) класса II и могут представлять антигены CD4⁺ Т-клеткам. Hong *et al.*, 2018, *Immunity* 49, 695-708. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается модифицированная В-клетка, которая способна представлять конкретные представляющие интерес антигены и/или производные от антигена эпитопы, такие как опухолевые антигены или антигены инфекционных заболеваний, одновременно в молекулах HLA класса I и класса II. Опухолевые антигены и антигены инфекционных заболеваний хорошо известны в данной области техники и описаны в вышеупомянутых разделах. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения конкретный антиген, который представляет интерес, например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания, слит с нацеливающим сигналом лизосомального белка, который нацеливает антиген на лизосомы и одновременно и эффективно представляет антиген как в молекулах HLA класса I так и класса II. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевой сигнал представляет собой нацеливающий сигнал ассоциированного с лизосомами мембранного белка-1 (LAMP1). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий сигнал способен проникать в компартменты рециркуляции эндосом. С-концевая последовательность Сlec9A является таким нацеливающим фрагментом. В контексте данного документа термин «конкретный опухолевый антиген» или «антиген инфекционного заболевания», слитый с нацеливающим сигналом, относится к аминокислотной последовательности, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид или белок, или молекуле РНК (например, молекуле мРНК) для применения в качестве терапевтического агента. В одном варианте осуществления настоящего изобретения конкретный опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания, слитый с нацеливающим сигналом, относится к молекуле мРНК для применения в качестве терапевтического агента. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения желательно, чтобы конкретные опухолевые антигены и/или антигены инфекционных заболеваний, слитые с нацеливающим сигналом, таким как нацеливающий сигнал LAMP1 или Сlec9A, были нацелены на лизосомы или эндосомы и представлялись одновременно и эффективно как в молекулах HLA класса I так и класса II. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения желательно, чтобы электропорация В-клеток (например, В-клеток человека) до или после созревания, с мРНК, кодирующей конкретные опухолевые антигены и/или

представляющие интерес антигены инфекционных заболеваний, слитые с нацеливающим сигналом, таким как нацеливающий сигнал LAMP1 или Clec9A, давала возможность одновременно и эффективно представлять конкретные антигены и/или производные от антигена эпитопы в молекулах HLA класса I и класса II. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения представляющие интерес конкретные опухолевые антигены и/или антигены инфекционных заболеваний либо не представляются В-клеткой естественным образом, либо не представляются В-клеткой одновременно в молекулах HLA класса I и класса II естественным образом, либо не представляются В-клеткой с высокой эффективностью в молекулах HLA класса I и класса II естественным образом. Предполагается, что введение таких подвергнутых электропорации В-клеток субъекту, например человеку-хозяину, будет способствовать развитию или потенцированию антигенспецифических иммунных ответов путем представления представляющих интерес конкретных антигенов и/или производных от антигена эпитопов одновременно и эффективно как в молекулах HLA класса I так и класса II.

[146] В различных вариантах своего осуществления настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, например, к последовательности mРНК, кодирующей по меньшей мере один конкретный антиген, который представляет интерес, например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания, слитый с нацеливающим сигналом, таким как нацеливающий сигнал LAMP1 для применения в качестве терапевтического агента при электропорации В-клеток для одновременного и эффективного представления конкретного антигена и/или производных от антигена эпитопов в молекулах HLA класса I и класса II. В различных вариантах своего осуществления настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, например, к последовательности mРНК, кодирующей больше чем один (например, 1, 2, 3, 4, 5 или большее количество) конкретный опухолевый антиген и/или представляющий интерес антиген инфекционного заболевания, слитый с нацеливающим сигналом. В различных вариантах своего осуществления настоящее изобретение относится к пулам различных последовательностей нуклеиновых кислот, например, пулам различных последовательностей mРНК, для применения в качестве терапевтического агента при электропорации В-клеток, как описано выше, при этом каждый пул кодирует по меньшей мере один конкретный антиген, который представляет интерес, например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания, слитый с нацеливающим сигналом, который отличается от других пулов последовательностей mРНК. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъекту можно вводить гомогенную популяцию В-клеток, при этом каждую В-клетку подвергают электропорации с mРНК, кодирующей по меньшей мере один конкретный представляющий интерес антиген, слитый с нацеливающим сигналом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъекту можно вводить гомогенную популяцию В-клеток, при этом каждую В-клетку подвергают электропорации с mРНК, кодирующей больше чем один конкретный представляющий интерес антиген, слитый с

нацеливающим сигналом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъекту можно вводить гетерогенную популяцию В-клеток, при этом каждую В-клетку подвергают электропорации с комбинацией mРНК, каждая из которых кодирует по меньшей мере один конкретный представляющий интерес антиген, слитый с другим нацеливающим сигналом.

[147] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетки для применения в электропорации, как описано выше, представляют собой любые модифицированные В-клетки согласно настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированная В-клетка содержит химерный антигенный рецептор для В-клеток (CAR-V). В различных вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированная В-клетка может экспрессировать CAR-V и одновременно и эффективно представлять представляющий интерес конкретный антиген и/или производные от антигена эпитопы в молекулах HLA класса I и класса II.

[148] В различных вариантах своего осуществления настоящее изобретение относится к способу введения выделенной В-клетки пациенту, нуждающемуся в этом. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения пациенту можно вводить популяцию В-клеток. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения каждая В-клетка может экспрессировать более одного пептида или белка полезной нагрузки. Например, каждая В-клетка может экспрессировать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, или 12 различных полезных нагрузок. В альтернативном варианте пациенту можно вводить гетерогенную популяцию В-клеток, каждая из которых способна экспрессировать и/или секретировать уникальную полезную нагрузку или комбинацию полезных нагрузок. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения пациенту можно вводить 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 различных полезных нагрузок через гетерогенную популяцию В-клеток.

Способы лечения

[149] В различных аспектах настоящего изобретения размноженная популяция В-клеток будет доставлена в качестве терапевтического средства пациенту, нуждающемуся в этом. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения размноженная популяция В-клеток будет способна лечить или предотвращать различные заболевания или нарушения, включая рак.

[150] В некоторых вариантах своего осуществления настоящее изобретение относится к созданию опосредованного В-клетками иммунного ответа у субъекта, содержащему введение субъекту эффективного количества размноженных иммунных клеток согласно настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения опосредованный В-клетками иммунный ответ направлен против целевой клетки или клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная иммунная клетка содержит химерный антигенный рецептор для В-клеток (B-CAR). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевая клетка представляет собой опухолевую клетку. В некоторых аспектах настоящее

изобретение включает способ лечения или предотвращения образования злокачественной опухоли, при этом указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества по меньшей мере одной выделенной антигенсвязывающей молекулы, описанной в данном документе. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает способ лечения или предупреждения образования злокачественной опухоли, при этом указанный способ содержащий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества по меньшей мере одной иммунной клетки, при этом иммунная клетка содержит по меньшей мере один химерный антигенный рецептор.

[151] В некоторых аспектах настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую размноженную популяцию сконструированных В-клеток, содержащую по меньшей мере одну антигенсвязывающую молекулу, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное средство. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит дополнительный активный агент.

[152] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта диагностируют метастатическое заболевание, локализованное в печени. В других вариантах осуществления настоящего изобретения метастатическое заболевание представляет собой рак. В других вариантах осуществления настоящего изобретения рак метастазировал из первичной опухоли в молочную железу, толстую кишку, прямую кишку, пищевод, легкие, поджелудочную железу и/или желудок. В других вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта диагностируют неоперабельные метастатические опухоли печени. В других вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта диагностируют неоперабельные метастатические опухоли печени вследствие первичного колоректального рака. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта диагностируют гепатоцеллюлярную карциному.

[153] Следует понимать, что целевые дозы для модифицированных В-клеток могут варьировать в диапазоне от 1×10^6 до 2×10^{10} клеток/кг, предпочтительно 2×10^6 клеток/кг, более предпочтительно. Следует понимать, что дозы выше и ниже данного диапазона могут быть пригодны для определенных субъектов, и пригодные уровни дозы при необходимости могут быть определены лечащим врачом. Кроме того, могут быть представлены множество доз клеток в соответствии с настоящим изобретением.

[154] Также предлагаются способы уменьшения размера опухоли у субъекта, включающие введение субъекту модифицированной В-клетки по настоящему изобретению, при этом указанная клетка содержит рецептор CAR-B, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном на опухоли, полезной нагрузкой или как с CAR-B, так и с полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъект имеет солидную опухоль или злокачественную опухоль крови, например, лимфому или лейкоз. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированную В-клетку доставляют в ложе опухоли. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак

присутствует в костном мозге субъекта.

[155] Также предлагаются способы доставки В-клеток к представляющему интерес сайту/мишени у субъекта, включающие введение субъекту модифицированной В-клетки по настоящему изобретению, при этом указанная клетка содержит интегрин, хоминг-антитело, белок или рецептор, который привлекается к лиганду, хемокину или аттрактанту в представляющем интерес сайте/мишени. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представляющий интерес сайт/мишень представляет собой, например, хоминг- или целевую ткань, воспалительный сайт в конкретном месте или ткань, или опухоль или микроокружение опухоли, куда желательна доставка терапевтической нагрузки.

[156] Также предложены способы уменьшения воспаления и аутоиммунной активности В-клеток в представляющем интерес участке/мишени у субъекта, включающие введение субъекту модифицированной В-клетки по настоящему изобретению, причем клетка содержит иммуноингибирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представляющий интерес сайт/мишень представляет собой, например, хоминг или целевую ткань, воспалительный сайт в конкретном месте или ткань, или опухоль или микроокружение опухоли, куда желательна доставка терапевтической нагрузки.

[157] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения размноженная популяция сконструированных В-клеток представляет собой аутологичные В-клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированные В-клетки представляют собой аллогенные В-клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированные В-клетки представляют собой гетерологичные В-клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированные В-клетки по настоящей заявке трансфицированы или преобразованы *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения разработанные клетки по настоящей заявке трансфицированы или преобразованы *ex vivo*.

[158] В контексте данного документа термины «**субъект**» или «**пациент**» означает индивидуум. В некотором аспекте субъект представляет собой млекопитающее, например, человека. В некотором аспекте субъект может быть приматом, не являющимся человеком. К приматам, не относящимся к человеку, относятся игрунки, обезьяны, шимпанзе, гориллы, орангутанги и гиббоны, и это лишь некоторые из них. В контексте данного документа термин «субъект» также включает домашних животных, таких как кошки, собаки и *т.д.*, домашний скот (*например*, ламы, лошади, коровы), диких животных (*например*, олень, вапити, лось и *т.д.*), лабораторных животных (*например*, мышь, кролик, крыса, песчанка, морская свинка и *т.д.*) и виды птиц (*например*, куры, индейки, утки и *т.д.*). Предпочтительно субъектом является человек. Более предпочтительно, субъектом является пациент-человек.

[159] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции,

содержащие CAR-экспрессирующие иммунные эффекторские клетки, описанные в данном документе, можно вводить вместе с любым количеством химиотерапевтических агентов. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азаридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, в том числе альтретамины, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилтиофосфаорамида и триметиллоломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамуцин, ифосфамид, мехлоретамин, мехлоретамин оксид гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевинны, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, активномицины, аутрамицины, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихимицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицины, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эсорубицин, идарубицин, марцеломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицины, потфиروмицин, пуромицин, кве-ламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностаин, зорубицин; ингибиторы обмена веществ, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолон, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, подавляющие функции надпочечников, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминоклевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; эллиптиния ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентосатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразин; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазонозная кислота; триазиквон; 2, 2', 2''-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиотепа; таксаны, например, паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb) и дексетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин C; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новатрон; тенипозид; дауномицин; аминокптерин; кселода; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS2000; дифформетилорнитин (DMFO); производные ретиноевой кислоты, такие как TARGRETIN™ (бексаротен),

PANRETIN™, (алитретиноин); ONTAK™ (денилейкин дифтитокс); эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из приведенного выше. Также в данное определение включены противогормональные агенты, которые действуют для регулирования или ингибирования действия гормонов относительно опухоли, например, антиэстрогены, в том числе, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гoserелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из приведенного выше. При необходимости также вводят комбинации химиотерапевтических агентов, включая, помимо прочего, СНОР, т.е., циклофосфамид (CYTOXAN®), доксорубицин (гидроксидоксорбицин), флударабин, винкристин (ONCOVIN®) и преднизон.

[160] Большое количество дополнительных терапевтических агентов можно применять вместе с композициями, описанными в данном документе. Например, потенциально пригодные дополнительные терапевтические агенты включают ингибиторы PD-1, такие как ниволумаб (OPDIVO®), пембролизумаб (KEYTRUDA®), пембролизумаб, пидилизумаб и атезолизумаб (TECENTRIQ®).

[161] Дополнительные терапевтические агенты, пригодные для применения в комбинации с настоящим изобретением, включают, помимо прочего, ибрутиниб (IMBRUVICA®), офатумумаб (ARZERRA®), ритуксимаб (RITUXAN®), бевацизумаб (AVASTIN®), трастузумаб (HERCEPTIN®), трастузумаб эмастатин (KADCYLA®), иматиниб (GLEEVEC®), цетуксимаб (ERBITUX®), панитумумаб (VECTIBIX®), катумаксомаб, ибритумомаб, офатумумаб, тозитумомаб, брентуксимаб, алемтузумаб, гемтузумаб, эрлотиниб, gefитиниб, вандетаниб, афатиниб, лапатиниб, нератиниб, акситиниб, маситиниб, пазопаниб, сунитиниб, сорафениб, тоцераниб, лестауртиниб, акситиниб, цедираниб, ленватиниб, нинтенданиб, пазопаниб, регорафениб, семаксаниб, сорафениб, сунитиниб, тивозаниб, тоцераниб, вандетаниб, энтректиниб, кабозантиниб, иматиниб, дасатиниб, нилотиниб, понатиниб, радотиниб, босутиниб, лестауртиниб, руксолитиниб, пакритиниб, кобиметиниб, селуметиниб, траметиниб, биниметиниб, алектиниб, церитиниб, кризотиниб, афлиберцепт, адипотид, денилейкин дифтитокс, mTOR-ингибиторы, такие как Эверолимус и Темсиролимус, ингибиторы сигнального пути Hedgehog, такие как сонидегиб и висмодегиб, ингибиторы CDK, такие как ингибитор CDK (палбоциклиб).

[162] В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения композицию, содержащую CAR-включающую иммунную клетку, можно вводить с противовоспалительным средством. Противовоспалительные средства или лекарственные средства включают без ограничения стероиды и глюкокортикоиды (в том числе бетаметазон, будесонид, дексаметазон, гидрокортизона ацетат, гидрокортизон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, преднизон, триамцинолон), нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAIDS), в том числе

аспирин, ибупрофен, напроксен, метотрексат, сульфасалазин, лефлуномид, лекарственные средства против TNF, циклофосфамид и микофенолат. Типовые NSAID включают ибупрофен, напроксен, напроксен натрия, ингибиторы Cox-2 и салилаты. Типовые обезболивающие средства включают ацетаминофен, оксикодон, трамадол или пропоксифен гидрохлорид. Типовые глюкокортикоиды включают кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон или преднизон. Типовые модификаторы биологического ответа включают молекулы, направленные против маркеров поверхности клетки (например, CD4, CD5 и т.д.), ингибиторы цитокина, например, антагонисты TNF (например, этанерцепт (ENBREL®), адалимумаб (HUMIRA®) и инфликсимаб (REMICADE®), ингибиторы хемокина и ингибиторы адгезионной молекулы. Модификаторы биологического ответа включают моноклональные антитела, а рекомбинантные формы молекул. Типовые DMARD включают азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, метотрексат, пеницилламин, лефлуномид, сульфасалазин, гидроксихлорохин, золото (для перорального (ауранофин) и внутримышечного введения) и миноциклин.

[163] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции, описанные в данном документе, вводят вместе с цитокином. В контексте данного документа термин «**цитокин**» предназначен для обозначения белков, высвобождаемых одной популяцией клеток, которые действуют на другую клетку в качестве межклеточных медиаторов. Примерами цитокинов являются лимфокины, монокины и обычные полипептидные гормоны. Помимо цитокинов включены гормоны роста, такие как гормон роста человека, N-метионилловый гормон роста человека и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреотропный гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); фактор роста печени (HGF); фактор роста фибробластов (FGF); пролактин; плацентарный лактоген; мюллеровская ингибирующая субстанция; пептид, связанный с гонадотропином мыши; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбозин (TPO); факторы роста нервов (NGF), такие как NGF-бета; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF-альфа и TGF-бета; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоетин (EPO); остеиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон-альфа, бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофаг-CSF (M-CSF); гранулоцит-макрофаг-CSF (GM-CSF); и гранулоцит-CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1-альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, фактор некроза опухоли, такой как TNF-альфа или TNF-бета; и другие полипептидные факторы, в том числе LIF и комплектный лиганд (KL). В контексте данного документа термин «цитокин» включает белки из природных источников или из рекомбинантной клеточной культуры, и биологически активные эквиваленты цитокинов нативной последовательности.

ПРИМЕРЫ

[164] Несмотря на то, что предыдущее изобретение было довольно подробно описано в качестве иллюстрации и примера в целях ясности понимания, в свете идей данного описания специалистам в данной области техники будет очевидно, что в это изобретение могут быть внесены некоторые изменения и модификации без отступления от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения. Следующие примеры приведены с целью иллюстрации, а не с целью ограничения. Специалисты в данной области техники легко распознают разнообразные некритические параметры, которые можно изменять или модифицировать с получением по существу идентичных результатов.

Пример 1: Очистка и обогащение В-клеток человека

[165] В-клетки человека собирали и обогащали из РВМС согласно следующему протоколу. РВМС получали из лейкоцитарной пленки следующим образом. Объем на донора (приблизительно 25 мл) доводили до 120 мл с помощью PBS. После этого 30 мл наслаивали на 15 мл фиколла в четырех пробирках по 50 мл. Затем проводили вращение в течение 20 минут при 450g. После чего верхний слой отделяли и отбрасывали. Затем выделяли границу раздела РВМС, которая находится чуть ниже первого слоя (нейтрофилы являются наиболее плотными и увеличиваются в количестве к нижней части слоя). Границу раздела в каждой из 4 пробирок брали у каждого донора и переносили в две конические пробирки емкостью 50 мл. Объем содержимого каждой пробирки доводили до 50 мл с помощью PBS. Затем каждую из двух трубок вращали при 500g в течение 5 минут.

[166] Лизис RBC осуществляли путем аспирации осадка и доведения до общего объема 10 мл, объединенного для обоих осадков лизирующего буфера АСК. Затем раствор выдерживали в течение пяти минут при комнатной температуре. После этого добавляли 40 мл PBS, раствор перемешивали и затем центрифугировали при 500 g в течение 5 минут. Затем эту смесь доводили до объема 40 мл в PBS, чтобы подсчитать выход РВМС. Для каждого препарата для обогащения В-клеток было использовано 150 миллионов РВМС.

[167] Обогащение В-клеток проводили в соответствии с инструкциями для продукта ID 17954 EASYSEP® для очистки В-клеток человека (Stem Cell Technologies). Раствор центрифугировали и 150 миллионов РВМС ресуспендировали в 3 мл буфера для выделения EASYSEP®. Осадок ресуспендировали в 3 мл буфера EASYSEP® в пробирке емкостью 15 мл. Добавляли 150 мкл усилителя коктейля. Добавляли 150 мкл коктейля для выделения, пробирки перемешивали и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Быстрые сферы перемешивали вихревым способом в течение 30 секунд, в пробирку добавляли 150 мкл, затем перемешивали и перемещали к магниту. Через 3 минуты смесь переливали в новую пробирку и повторяли этап с магнитом.

Пример 2: Размножение В-клеток с использованием фидерных клеток HELA-CD40L или MEGA-CD40L

[168] Из-за низкого количества В-клеток в периферической крови человека трудно получить достаточное количество В-клеток для целей клинической клеточной терапии.

Таким образом, размножение В-клеток является важным этапом в изготовлении В-клеток для клинического применения. В-клеткам человека для роста требуется CD40L. Установлено, что В-клетки могут выживать и размножаться, если их выращивать на монослое клеток HEL, экспрессирующих CD40L. Однако необходимо разработать способы выращивания В-клеток, не зависящие от фидерных клеток. Чтобы определить, существуют ли для этой цели коммерчески доступные инструменты или реагенты, Enzo MEGA-CD40L тестировали в сравнении с ростом на фидерных клетках HELA-CD40L.

[169] **Условия среды для роста на фидерных клетках HeLa-CD40LL.** Планшеты с фидерными клетками готовили путем облучения клеток CD40L HeLa из расчета 5×10^6 на планшет в 24 лунках. Базовая среда состояла из RPMI-1640+10% FCS; Penn/strep (100 ед/мл, 100 мкг/мл); селенит натрия (100 нМ); и IL-4 (2 нг/мл) (R & D 204-IL). Фидерным клеткам давали возможность расти в течение по меньшей мере 24 часов перед высевом В-клеток.

[170] **Условия среды для роста с MEGA-CD40L.** Условия среды были такими же, как указано выше, за исключением отсутствия фидерных клеток. Вместо этого В-клетки высевали в среду, содержащую RPMI-1640+10% FCS; Penn/strep (100 ед/мл, 100 мкг/мл); селенит натрия (100 нМ); IL-4 (2 нг/мл) (R & D 204-IL); и MEGA-CD40L (100 нг/мл).

[171] Скорость роста В-клеток в условиях HeLa-CD40L и MEGA-CD40L изображена на Фиг. 1. В этом исследовании продемонстрировано, что В-клетки человека можно выращивать и размножать в среде с фидерными клетками HELA-CD40L, но они не размножаются в присутствии MEGA-CD40L.

[172] Процесс выращивания очищенных В-клеток начинали при эквивалентной плотности в день 0, примерно 10 000 клеток на мл, и осуществляли на фидерных клетках HELA-CD40L. В день 4 культуры разделяли на две группы, и одну группу продолжали выращивать в той же среде с фидерными клетками HELA-CD40L, тогда как другую группу выращивали в средах с добавлением MEGA-CD40L (0,1 мкг/мл), но в отсутствие фидерных клеток HELA. В день 8 к питательной среде в условиях обработки MEGA-CD40L добавляли дополнительные 100 нг/мл MEGA-CD40L. Стрелки на Фиг. 1 указывают время начала обработки MEGA-CD40L.

[173] Эти данные демонстрируют, что ко дню 11 наблюдалась значительная пролиферация В-клеток при выращивании на фидерных клетках HELA-CD40L, но на день 11 значительного роста не наблюдалось при выращивании с MEGA-CD40L.

Пример 3: Размножение В-клеток без фидерных клеток

[174] В этом примере В-клетки размножали в отсутствие фидерных клеток, экспрессирующих HELA-CD40L. В-клетки высевали в среду для размножения, содержащую IL-4 (5 мкг; 5000 МЕ/мкг, растворенный в 100 мкл H₂O для достижения концентрации $2,5 \times 10^5$ МЕ/мл); CD40L (SEQ ID NO: 140, 500 мкг, ресуспендированные в 500 мкл); сшивающее антитело CD40L (SEQ ID NO: 143 и 144); сыворотку АВ человека (IC092938249 VWR); и 10 мкл пенициллин-стрептомицина. В-клетки высевали при плотности: (i) от 100 000 до 150 000/мл; или (ii) 1 000 000/мл и размножали в течение по

меньшей мере 15 дней, снабжая свежей средой каждые семь дней.

[175] Клетки, поддерживаемые при плотности от 100 000 до 150 000 клеток/мл, были способны размножиться более чем в 200 раз за две недели; тогда как клетки, поддерживаемые при плотности 1 000 000 клеток/мл, демонстрировали значительно меньшую интенсивность роста. См. Фиг. 2.

Пример 4: Конструирование размноженных В-клеток

[176] Размноженные В-клетки человека конструировали для экспрессии различных химерных рецепторов с помощью аденовирусного вектора. В-клетки сначала очищали, обогащали и размножали с помощью методик, описанных в Примерах 1 и 3. В-клетки культивировали в среде для размножения по Примеру 3 в течение 10 дней, а затем трансдуцировали аденовирусом, указанным в Таблице 6.

ТАБЛИЦА 6

Название	Подтип	Промотор	Внеклеточный домен	Шарнир	Трансмембранный домен	Внутриклеточный
IL-10	Ad5RGD	pMMLV(LTR)-hEF1a	mIL10	Н/Д		
cBCR1-GPC3	Ad5F35		GPC3			
RGD-478	Ad5RGD	pMMLV(LTR)-hEF1a	анти-саркогликан scFv	muIgG2a Fc		
RGD-601	Ad5RGD	pMMLV(LTR)-hEF1a	GPC3-scFv	mCD8H	mCD28M	mCD79a
RGD-463	Ad5RGD	pMMLV(LTR)-hEF1a	GPC3-scFv	muIgG2a Fc		
RGD-602	Ad5RGD	pMMLV(LTR)-hEF1a	GPC3-scFv	muIgG2a FC		
RGD-394	Ad5RGD	pMMLV(LTR)-hEF1a	GPC3-scFv	mCD8H	mCD28M	mCD79b
GFP-RGD	Ad5RGD	pMMLV(LTR)-hEF1a	анти-саркогликан scFv			
Пустой вектор	Ad5RGD	Н/Д				
Без вируса	Н/Д	Н/П				

[177] Аденовирус Ad5 либо содержал. Затем В-клетки культивировали *in vitro* в течение 10 дней с использованием среды для размножения В-клеток, как описано в данном документе. Затем размноженные В-клетки трансдуцировали аденовирусом согласно следующему протоколу.

[178] В-клетки выращивали в течение 10 дней и получили выход примерно 14 миллионов клеток. Были протестированы несколько вирусных конструкций аденовируса F35, кодирующих BCR человека. Один из примеров заключается в следующем. Использовали аденовирус, кодирующий GPC3-специфичный BCR. Также использовали контрольный пустой аденовирусный вектор. Также использовали имитационный контроль, не содержащий вируса.

[179] 20 мкл 10^9 мл вирусных частиц добавляли к 0,5 млн В-клеток при следующих условиях:

[180] В-клетки высевали в OPTIMEM® с 0,2% BSA и CD40L+Xlinker (MilteNY Product #130-098-775, с той же концентрацией, как описано в средах для размножения, описанных выше), IL-4 (как описано в средах для размножения) и 0,5 мкг/мл полибрена в 200 мкл на 24-луночной планшете. После добавления вируса планшет вращали в течение 1 часа при 1100 g, затем переносили в инкубатор на 2,5 часа и вводили 2 мл свежей среды для размножения. Через 3 дня клетки окрашивали GPC3-BV для обнаружения В-клеток, экспрессирующих BCR. Результаты представлены на Фиг. 2А-2С и демонстрируют, что по меньшей мере 67% клеток экспрессировали BCR GPC3 через 72 часа после трансдукции.

Пример 5: Экспрессия Ad5RGD-GFP в В-клетках человека

[181] В-клетки из PBMC выращивали в культуре в течение 10 дней. В-клетки трансдуцировали конструкциями Ad5-RGD, кодирующими GFP, и помещали в OPTIMEM® с 0,2% BSA, CD40L+Xlinker, 5% АВ сывороткой человека и IL-4. Затем добавляли вирус и центрифугировали при 1100 g в течение 1 часа, после чего инкубировали в течение 3 часов при 37 °C. Затем среду меняли на нормальную среду для роста В-клеток человека до проведения анализа.

[182] Результаты тестирования экспрессии GFP в различные моменты времени были следующими:

72	120	144	192	240
----	-----	-----	-----	-----

[183] Чтобы оценить влияние вируса на жизнеспособность клеток, общее количество клеток и доля положительных результатов GFP тестировали с помощью VICELL® и FACS в день 6, 8 и 10. Результаты приведены на Фиг. 4. Трансдукция Ad5-RGD модифицированного GFP приводит к высокой эффективности экспрессии GFP в В-клетках. Экспрессия поддерживалась в около 60% от общего числа В-клеток в течение по меньшей мере 10 дней. Трансдуцированные В-клетки продолжали пролиферировать в течение по меньшей мере одной недели после трансдукции.

Пример 6: Экспрессия мышинных конструкций BCR или IL-10 в В-клетках человека в результате трансдукции аденовирусом

[184] В-клетки, полученные из PBMC, выращивали в культуре в течение 10 дней. Затем В-клетки трансдуцировали конструкциями Ad5-RGD, кодирующими мышиный IL-10 или несколько форматов мышиных BCR. (Мышиные форматы использовали во время ожидания человеческих форматов). Затем В-клетки культивировали в условиях, включающих OPTIMEM® с 0,2% BSA, CD40L+Xlinker, 5% АВ сыворотку человека и IL-4. Добавляли вирус и центрифугировали при 1100 g в течение 1 часа, после чего инкубировали в течение 3 часов при 37 °С, затем среду меняли на нормальную среду для роста В-клеток человека до проведения анализа. Вирус тестировали в двух соотношениях (20 мкл: 0,5 миллиона В-клеток и 2 мкл: 0,5 миллиона В-клеток).

[185] Тестирование экспрессии проводили на день 4, через 96 часов после трансдукции. Супернатанты IL-10 хранили при -80 °С. Конструкции GPC3 обнаруживали путем связывания с GPC3-BV человека. Саркогликановую конструкцию обнаруживали путем связывания со стреп меткой FITC. Результаты представлены на Фигурах с 5 по 9.

Пример 7: Мониторинг *in vivo* хоминга и экспрессии BCR человека в В-клетках человека после доставки аденовирусом

[186] В-клетки из PBMC выращивали в культуре в течение 10 дней. Затем В-клетки трансдуцировали конструкциями Ad5f35, кодирующими люциферазу +/- GPC3-BCR. PWF-524/PWWF-684 (Luc+GPC3 CAR) и PWF-684 (Luc) трансдуцировали и затем культивировали в течение ночи в среде Веннхолда, чтобы дать время для экспрессии BCR и Luc. После этого примерно 0,9 миллиона клеток вводили внутривенно мышам с опухолями HEPG2. Проводили мониторинг Luc с помощью биолюминесценции.

[187] Данные приведены на Фиг. 10, которая демонстрирует, что GPC3 CAR (524) увеличивает хоминг человеческих В-клеток в 100 раз к TDLN мышей SHORN, имеющих опухоли HEPG2. В частности, у мышей SHORN наблюдается дефицит Т-, В- и NK-клеток, что позволяет человеческим В-клеткам не отторгаться. В TDLN отмечено 100-кратное обогащение по сравнению с легкими. В легких наблюдалось увеличение сигнала в 2-5 раз, что, возможно, было связано с метастазированием HEPG2. На Фиг. 10 продемонстрировано, что сконструированный GPC3 CARs может способствовать хомингу В-клеток в воспаленные лимфоидные органы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий:

получение популяции В-клеток из источника;

культивирование указанных В-клеток в культуральной среде, содержащей слитый белок CD40L и сшивающий агент CD40L;

конструирование указанных В-клеток для экспрессии либо полезной нагрузки, либо химерного рецептора, либо того и другого; и

введение указанных В-клеток указанному субъекту.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что источник представляет собой млекопитающее.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что указанный источник представляет собой биологический образец, состоящий из моноклеарных клеток периферической крови.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 85% идентичной SEQ ID NO. 3.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 3.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что сшивающий агент CD40L представляет собой антитело.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 5, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 7.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 5, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что В-клетку конструируют перед культивированием указанных В-клеток в среде со слитым белком CD40L и сшивающим агентом CD40L.

11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что В-клетку конструируют после культивирования указанных В-клеток в среде со слитым белком CD40L и сшивающим агентом CD40L.

12. Способ по п. 1, дополнительно включающий культивирование указанных В-клеток в присутствии IL-4.

13. Способ по п. 1, дополнительно включающий культивирование указанных В-клеток в присутствии IL-21.

14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что культивируемые В-клетки экспрессируют по меньшей мере один из следующих маркеров: CD62L, CCR7, CD80, CD86, CD54, ICAM, CD58, или CD27.

15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из по меньшей мере одного из следующих заболеваний: рак, заболевание сердца, воспалительное заболевание, заболевание, связанное с атрофией мышц, или неврологическое заболевание.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что рак представляет собой по меньшей мере один из следующих раков: рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак пищевода, рак легкого, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак печени, гепатоцеллюлярная карцинома, стромальные опухоли, такие как GIST, глиобластома и глиома.

17. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят по меньшей мере около 3×10^7 В-клеток.

18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что популяцию В-клеток культивируют в течение по меньшей мере 14 дней.

19. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий:

получение популяции В-клеток из источника;

культивирование указанных В-клеток в культуральной среде, содержащей слитый белок CD40L, при этом указанный слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO. 3, и сшивающее антитело CD40L, переменная область легкой цепи которого на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и переменная область тяжелой цепи которого на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7; и

введение указанных В-клеток указанному субъекту.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что источник представляет собой млекопитающее.

21. Способ по п. 19, отличающийся тем, что слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

22. Способ по п. 19, отличающийся тем, что антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 5, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

23. Способ по п. 19, дополнительно включающий конструирование указанных В-клеток для экспрессии либо полезной нагрузки, либо химерного рецептора, либо того и другого.

24. Способ по п. 19, отличающийся тем, что В-клетку конструируют перед культивированием указанных В-клеток в среде со слитым белком CD40L и сшивающим антителом CD40L.

25. Способ по п. 19, отличающийся тем, что В-клетку конструируют после культивирования указанных В-клеток в среде со слитым белком CD40L и сшивающим антителом CD40L.

26. Способ по п. 19, дополнительно включающий культивирование указанных В-клеток в присутствии IL-4.

27. Способ по п. 19, дополнительно включающий культивирование указанных В-клеток в присутствии IL-21.

28. Способ по п. 19, отличающийся тем, что культивируемые В-клетки экспрессируют по меньшей мере один из следующих маркеров: CD62L, CCR7, CD80, CD86, CD54, ICAM, CD58, или CD27.

29. Способ по п. 19, отличающийся тем, что заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из по меньшей мере одного из следующих заболеваний: рак, заболевание сердца, воспалительное заболевание, заболевание, связанное с атрофией мышц, или неврологическое заболевание.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что рак представляет собой по меньшей мере один из следующих раков: рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак пищевода; рак легкого, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак печени, гепатоцеллюлярная карцинома, стромальные опухоли, такие как GIST, глиобластома и глиома.

31. Способ по п. 19, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят по меньшей мере около 3×10^7 В-клеток.

32. Способ по п. 19, отличающийся тем, что популяцию В-клеток культивируют в течение по меньшей мере 14 дней.

33. Способ изготовления сконструированных В-клеток, включающий получение популяции В-клеток из источника; культивирование указанных В-клеток в культуральной среде, содержащей слитый белок CD40L и сшивающий агент CD40L; и

конструирование указанных В-клеток для экспрессии либо полезной нагрузки, либо химерного рецептора, либо того и другого.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что источник представляет собой млекопитающее.

35. Способ по п. 33, отличающийся тем, что указанный источник представляет собой биологический образец, состоящий из мононуклеарных клеток периферической крови.

36. Способ по п. 33, отличающийся тем, что слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 85% идентичной SEQ ID NO. 3.

37. Способ по п. 33, отличающийся тем, что слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 3.

38. Способ по п. 33, отличающийся тем, что слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

39. Способ по п. 33, отличающийся тем, что сшивающий агент CD40L представляет собой антитело.

40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 5, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO. 7.

41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 5, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

42. Способ по п. 33, отличающийся тем, что В-клетку конструируют перед культивированием указанных В-клеток в среде со слитым белком CD40L и сшивающим агентом CD40L.

43. Способ по п. 33, отличающийся тем, что В-клетку конструируют после культивирования указанных В-клеток в среде со слитым белком CD40L и сшивающим агентом CD40L.

44. Способ по п. 33, дополнительно включающий культивирование указанных В-клеток в присутствии IL-4.

45. Способ по п. 33, дополнительно включающий культивирование указанных В-клеток в присутствии IL-21.

46. Способ по п. 33, отличающийся тем, что культивируемые В-клетки экспрессируют по меньшей мере один из следующих маркеров: CD62L, CCR7, CD80, CD86, CD54, ICAM, CD58, или CD27.

47. Способ по п. 33, отличающийся тем, что получают по меньшей мере около 3×10^7 В-клеток.

48. Способ по п. 33, отличающийся тем, что популяцию В-клеток культивируют в течение по меньшей мере 14 дней.

49. Способ изготовления сконструированных В-клеток, включающий получение популяции В-клеток из источника; и культивирование указанных В-клеток в культуральной среде, содержащей слитый белок CD40L, при этом указанный CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO. 3, и сшивающее антитело CD40L, переменная область легкой цепи которого на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 5, и вариабельная область тяжелой цепи которого на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7.

50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что источник представляет собой млекопитающее.

51. Способ по п. 49, отличающийся тем, что слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

52. Способ по п. 49, отличающийся тем, что антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 5, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

53. Способ по п. 49, дополнительно включающий конструирование указанных В-клеток для экспрессии либо полезной нагрузки, либо химерного рецептора, либо того и другого.

54. Способ по п. 49, отличающийся тем, что В-клетку конструируют перед культивированием указанных В-клеток в среде со слитым белком CD40L и сшивающим агентом CD40L.

55. Способ по п. 49, отличающийся тем, что В-клетку конструируют после культивирования указанных В-клеток в среде со слитым белком CD40L и сшивающим агентом CD40L.

56. Способ по п. 49, дополнительно включающий культивирование указанных В-клеток в присутствии IL-4.

57. Способ по п. 49, дополнительно включающий культивирование указанных В-клеток в присутствии IL-21.

58. Способ по п. 49, отличающийся тем, что культивируемые В-клетки экспрессируют по меньшей мере один из следующих маркеров: CD62L, CCR7, CD80, CD86, CD54, ICAM, CD58, или CD27.

59. Способ по п. 49, отличающийся тем, что получают по меньшей мере около 3×10^7 В-клеток.

60. Способ по п. 49, отличающийся тем, что популяцию В-клеток культивируют в течение по меньшей мере 14 дней.

61. Среда для размножения В-клеток, содержащая CD40L, при этом указанный слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO. 3 и

сшивающее антитело CD40L, вариабельная область легкой цепи которого на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и вариабельная область тяжелой цепи которого на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7; и

введение указанных В-клеток указанному субъекту.

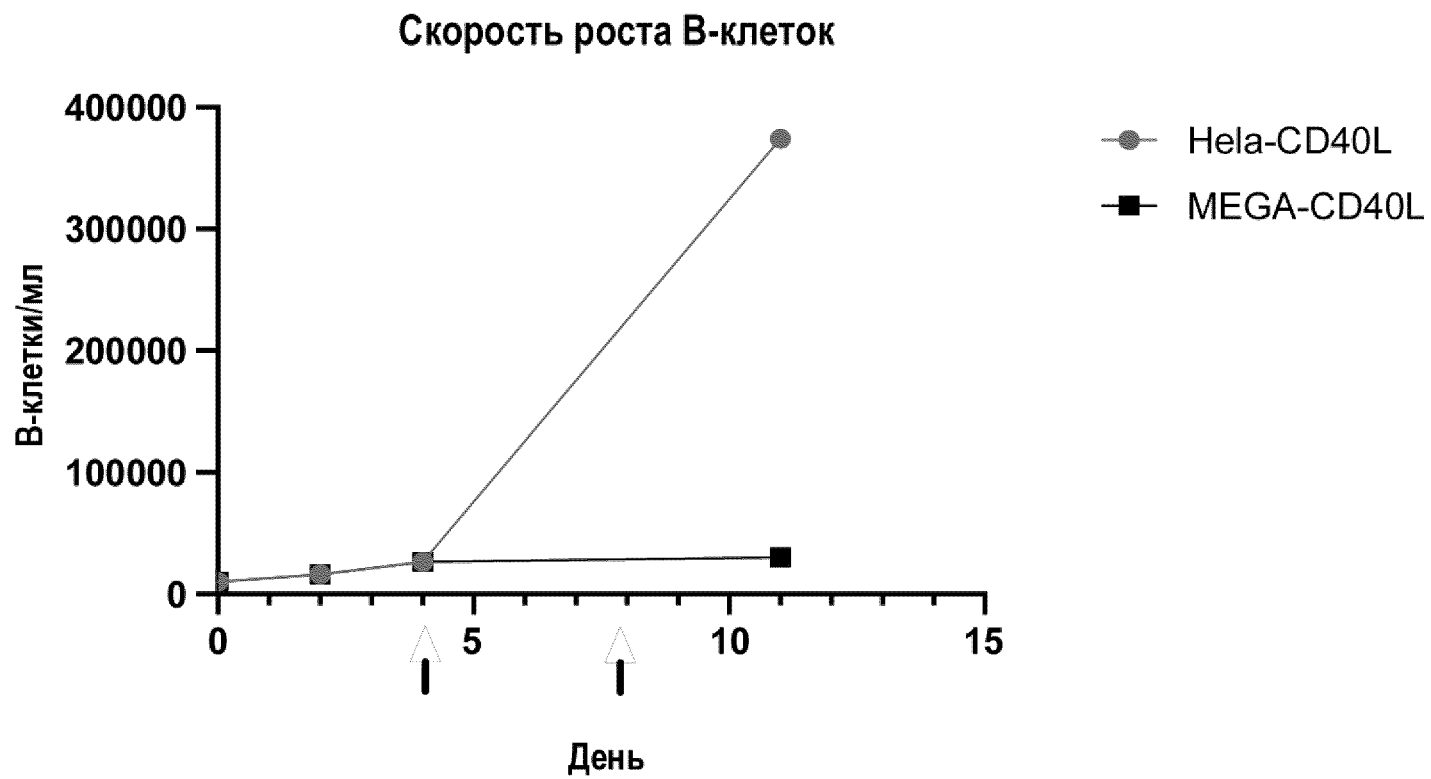
62. Среда по п. 61, отличающаяся тем, что слитый белок CD40L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

63. Среда по п. 61, отличающаяся тем, что антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 5, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

64. Среда по п. 61, дополнительно содержащая IL-4.

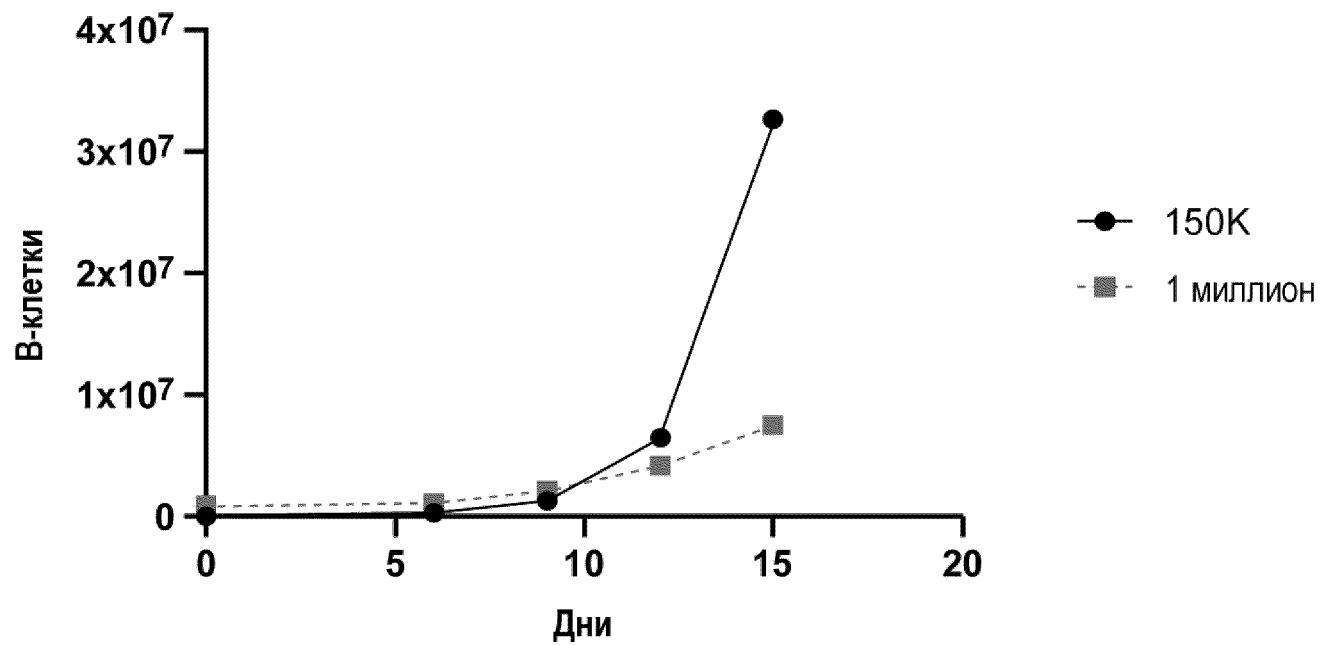
65. Среда по п. 61, дополнительно содержащая IL-21.

По доверенности

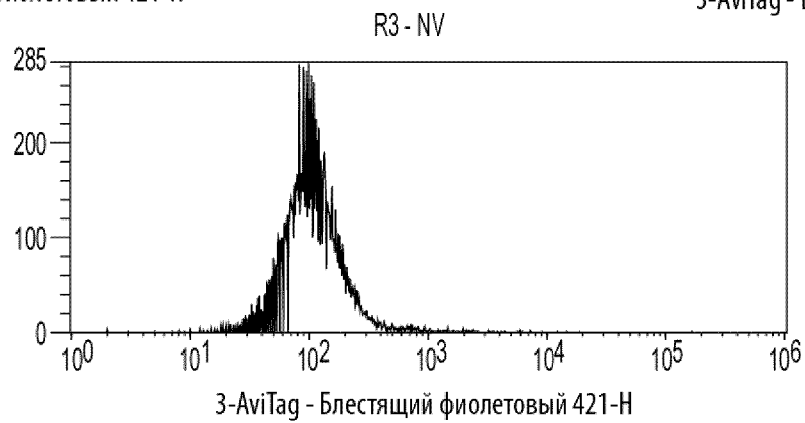
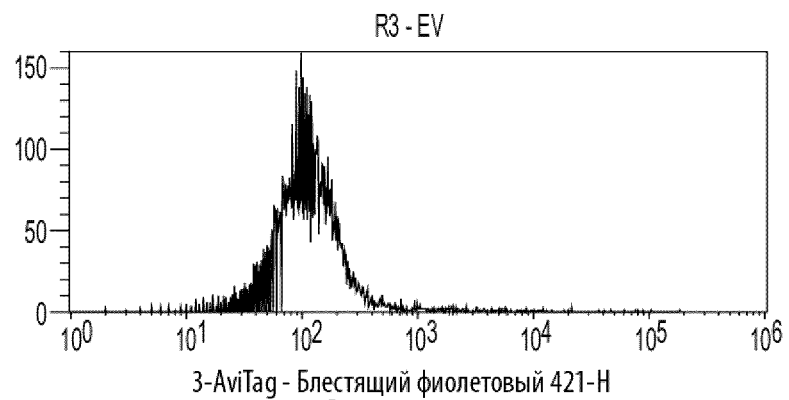
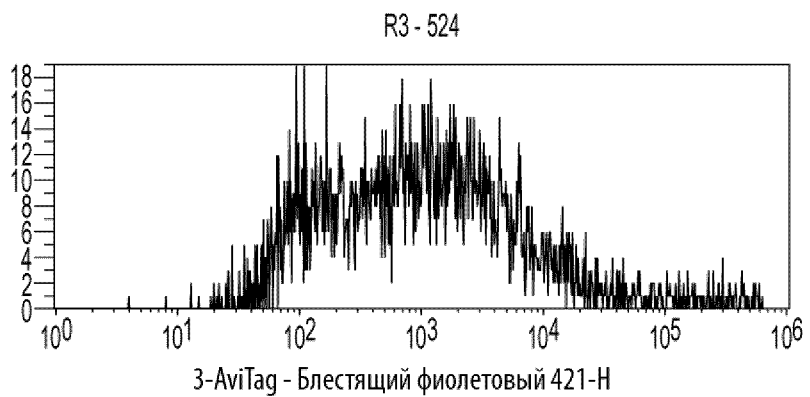


Фиг. 1

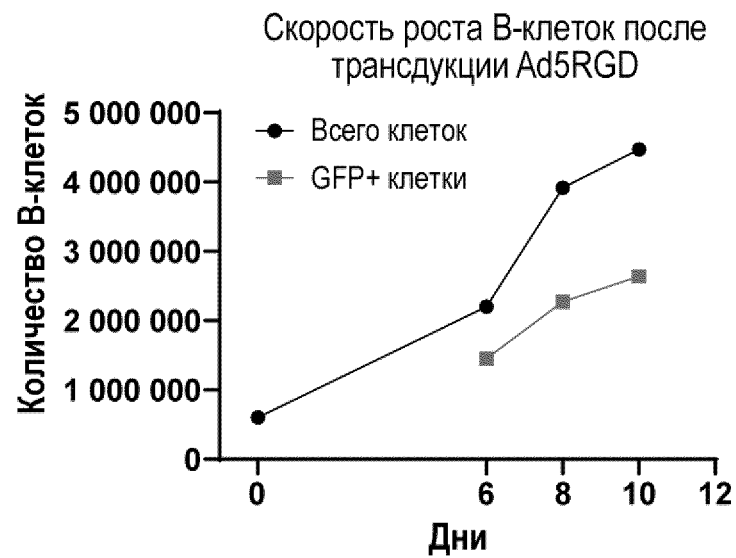
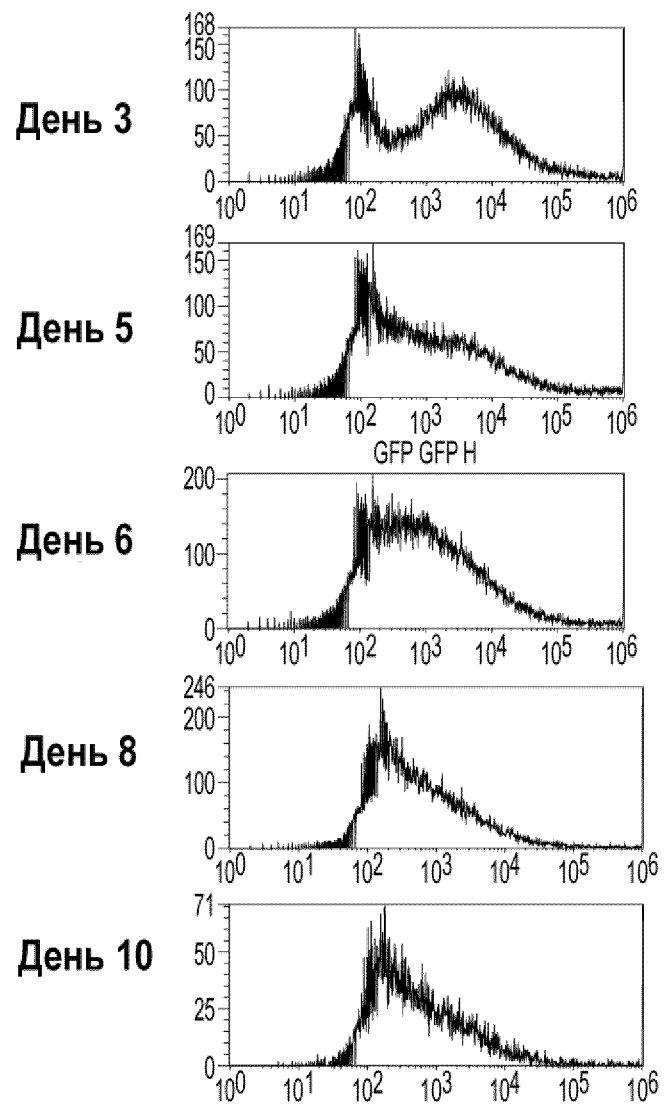
Определенные человеческие среды для размножения



Фиг. 2



Фиг. 3

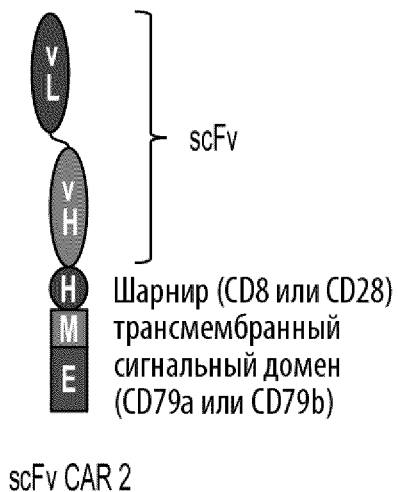


Фиг. 4

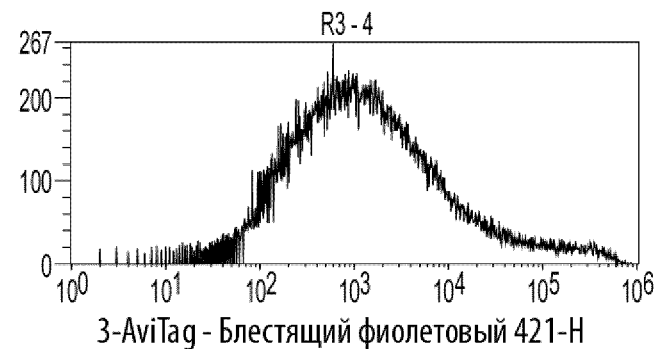
GPC3 Конструкция 601

Конструкция 601 RGD:

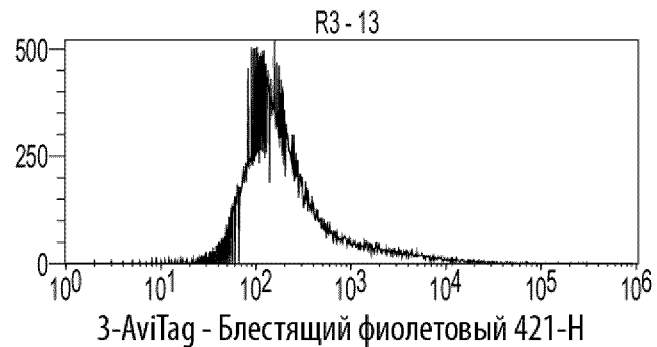
pMMLV(LTR)-hEF1a анти GPC3 scFv-mCD8H-mCD28M-mCD79a #7-1



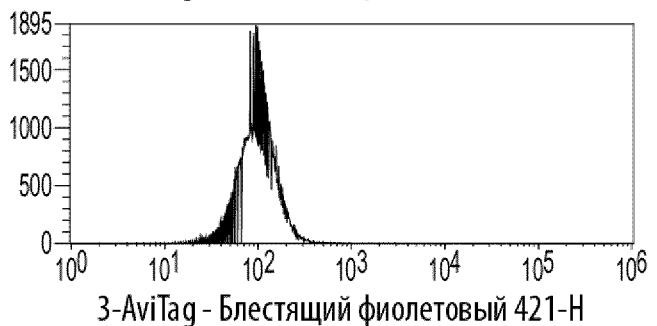
**Высокое
соотношение**



**Низкое
соотношение**



Без вируса

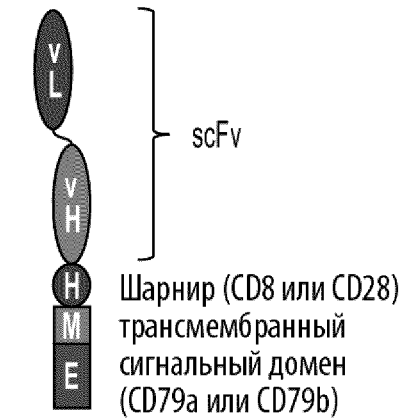


Фиг. 5

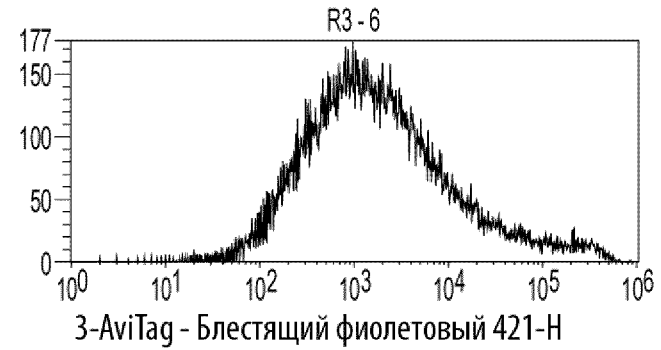
GPC3 Конструкция 602

Конструкция 602 RGD:

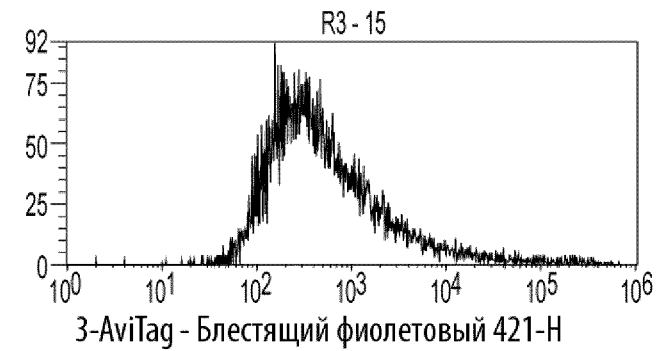
pMMLV(LTR)-hEF1a анти GPC3 scFv-mCD8H-mCD28M-mCD79a #8-2



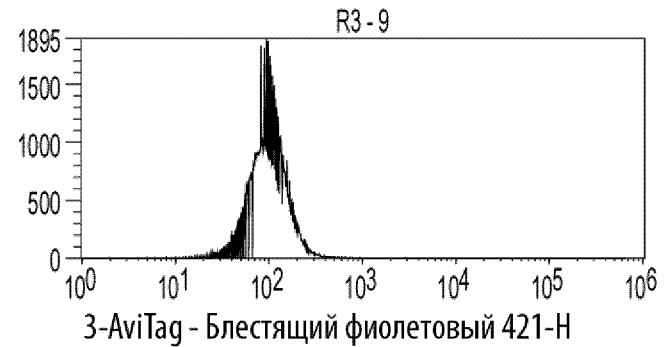
Высокое
соотношение



Низкое
соотношение



Без вируса

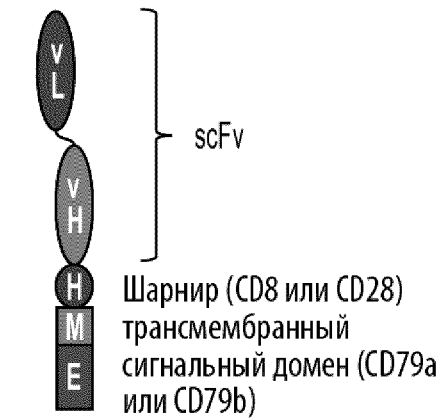


Фиг. 6

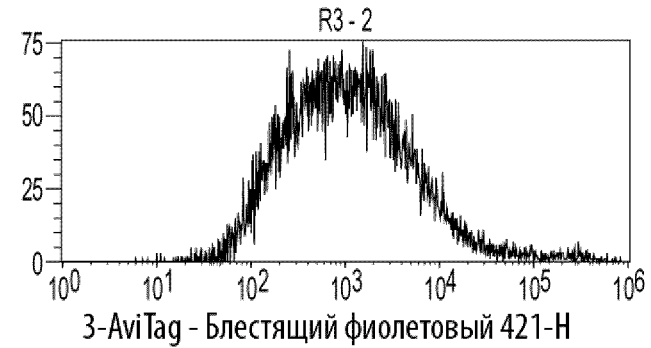
GPC3 Конструкция

Идентификатор конструкции по Ad5F35:

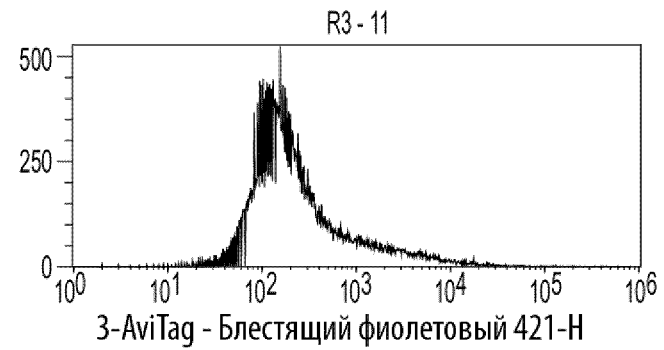
Ad5F35-aGPC3-CBR1 – Это CAR человека



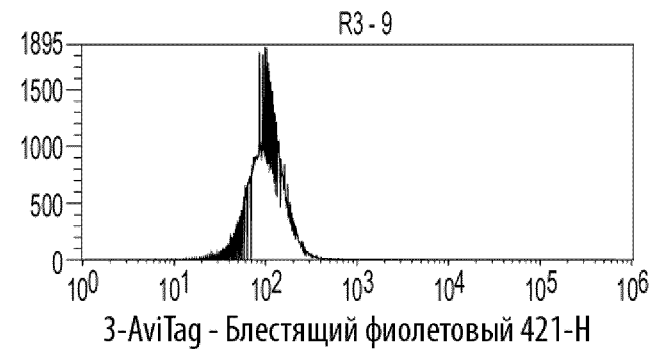
**Высокое
соотношение**



**Низкое
соотношение**



Без вируса

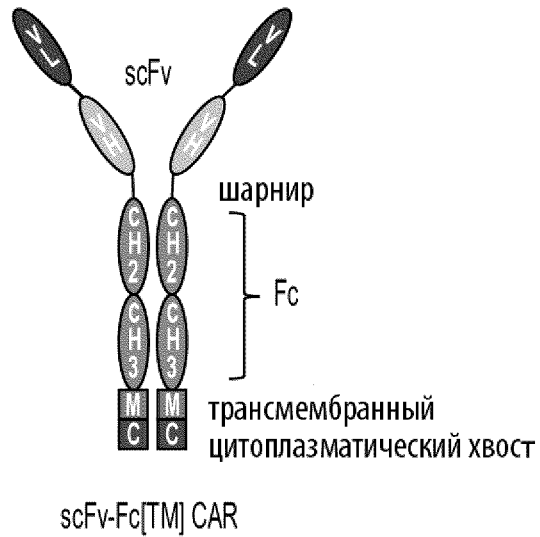


Фиг. 7

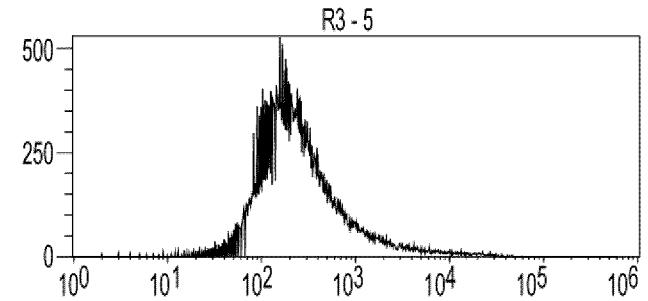
GPC3 Конструкция 463

Конструкция 463 RGD:

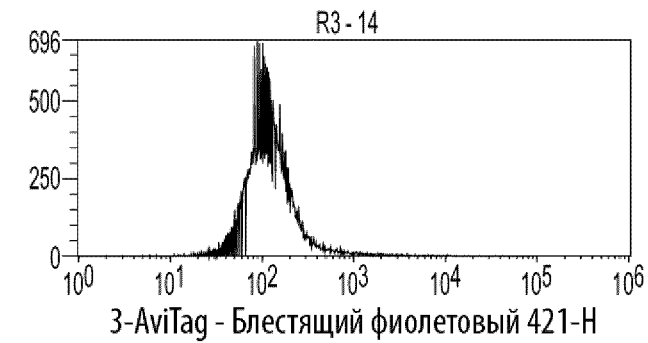
рMMLV(LTR)-hEF1a промотор-анти GPC3 scFv-mulgG2a Fc-(с TM+cyto) A4-1



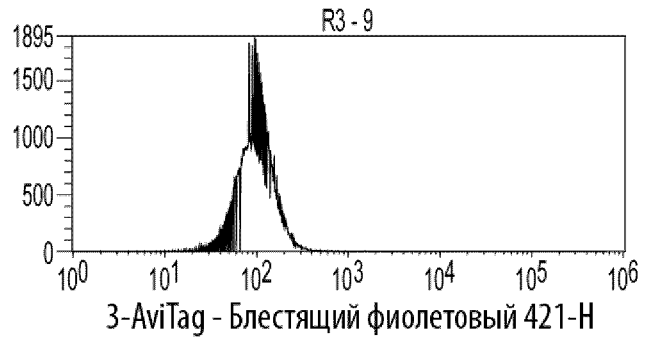
Высокое
соотношение



Низкое
соотношение



Без вируса



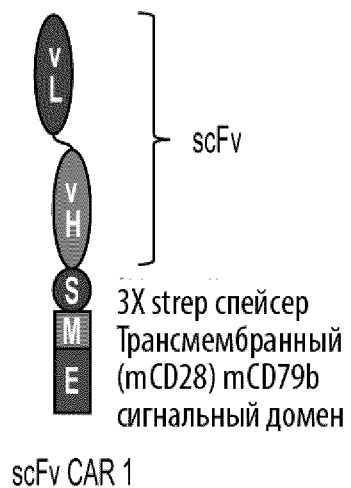
Фиг. 8

Саркогликановая конструкция 394

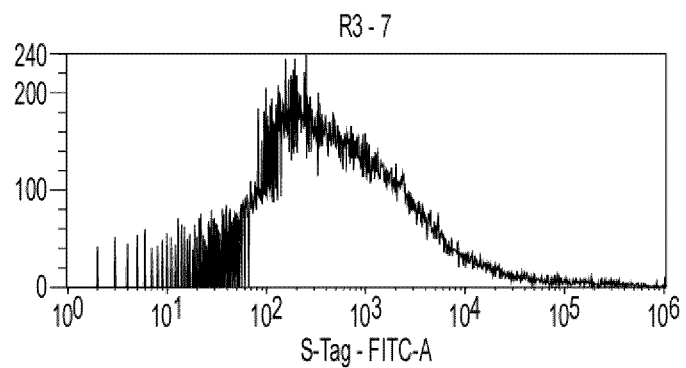
Конструкция 394 RGD:

рMMLV(LTR)-hEF1a промотор-антисаркогликан CBCR1 (Pesch)

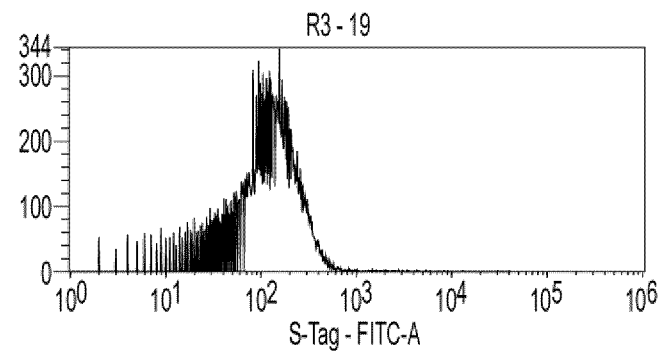
Обнаружен с помощью FITC стрептавидиновой метки



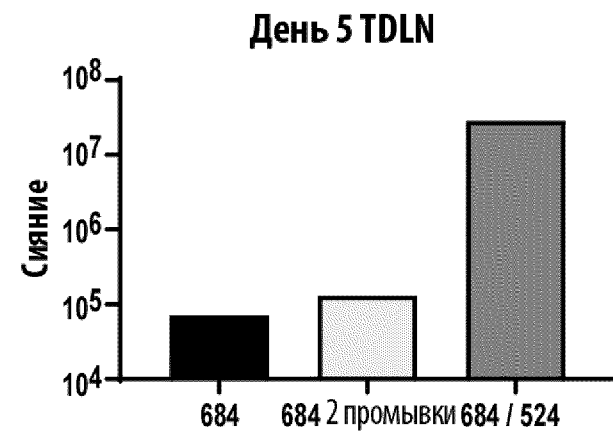
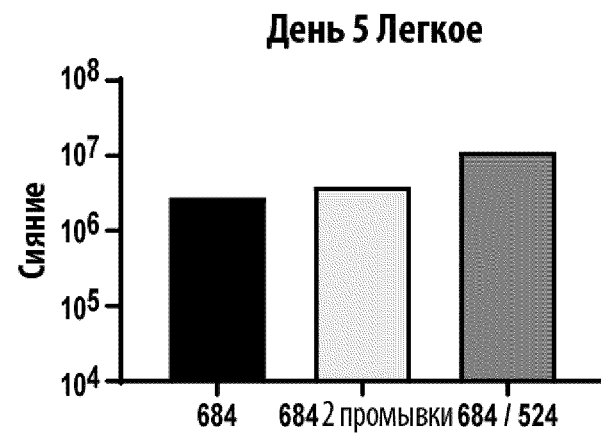
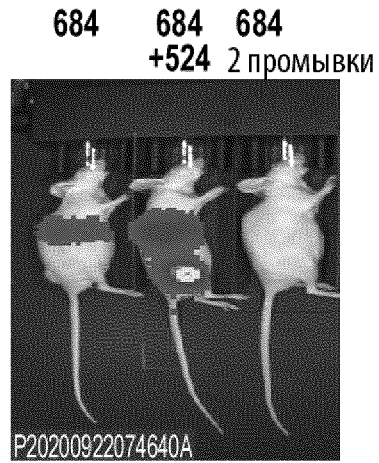
Низкое соотношение



Без вируса



Фиг. 9



Фиг. 10