

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393155** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.10.31

(51) Int. Cl. *C12N 5/0789* (2010.01)
C12N 5/0786 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.04.20

(54) **ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ**

(31) **1706410.6; 1801511.5**

(32) **2017.04.21; 2018.01.30**

(33) **GB**

(62) **201992514; 2018.04.20**

(71) Заявитель:
ОСПЕДАЛЕ САН РАФФАЭЛЕ С.Р.Л.;
ФОНДАЦЬОНЕ ТЕЛЕТОН (ИТ)

(72) Изобретатель:
Нальдини Луиджи, Эскобар Джулия,
Гентнер Бернхард Рудольф, Муччи
Адель (ИТ)

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

(57) Гематопозитическая стволовая клетка (HSC), гемопоэтическая клетка-предшественник (HPC), миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень *miR-130a* и/или *miR-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон-альфа ($IFN\alpha$), для применения при лечении или профилактике рака у пациента, где HSC, HPC, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета и/или специфической к связанной с опухолью антигену (ТАА) Т-клеткой.

A1

202393155

202393155

A1

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к применению генной терапии на основе цитокинов, в частности, генной терапии на основе интерферона (например, интерферон–альфа или интерферон–гамма), необязательно, в сочетании с ингибитором контрольных точек иммунитета, Т–клетками, специфическими для опухолеассоциированного антигена (ТАА), и/или 1–метил–триптофаном (1–МТ) для лечения или профилактики злокачественного новообразования.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Недавно был усилен интерес к иммунотерапии как противоопухолевому лечению ввиду ее способности вызывать длительную ремиссию. Более глубокое понимание механизмов, с помощью которых злокачественные клетки ускользают от иммунного ответа, привело к разработке новых терапевтических средств, нацеленных на иммунные контрольные точки, тем самым раскрывая возможности иммунной системы¹. Клинические испытания этих препаратов привели к беспрецедентным показателям по длительности ответов в опухолях, ранее считавшихся неизменно летальными, таких как метастатическая меланома^{2,3}. Однако, несмотря на эти достижения, большая часть пациентов не отвечает на эти способы лечения либо из–за неспособности продуцировать опухолеспецифические Т–клетки, либо из–за наличия иммуносупрессивного микроокружения опухоли, что делает их устойчивыми к блокаде классических негативных контрольных точек, CTLA4 или PD1/PDL1⁴.

Таким образом, предпринимаемые в настоящее время попытки направлены на выявление новых мишеневых контрольных точек иммунитета и комбинированной терапии, что может расширить возможности иммунотерапии для большего числа пациентов с опухолями. В связи с этим усилился интерес к использованию цитокинов, таких как интерфероны (IFN), в качестве противоопухолевых агентов⁵. Помимо цитостатического и антиангиогенного действия на опухолевые клетки и кровеносные сосуды, интерфероны, в частности, интерфероны I–ого типа, увеличивают созревание и способность к перекрестному праймированию дендритных клеток (DC), пролиферацию и цитотоксичность Т–клеток, уничтожающий потенциал естественных клеток–киллеров (NK), а также переключение классов иммуноглобулинов В–клеток^{6,7}. Ранее авторы сообщали о доказательствах, полученных в ходе экспериментальных проверок, того, что стратегия клеточной и генной терапии, основанной на селективной экспрессии трансгена альфа–интерферона (IFN α) в потомстве моноцитов/макрофагов, проникающих в опухоль трансплантированных, полученных методами генной инженерии гемопоэтических стволовых клеток (HSC), может усиливать противоопухолевые реакции. Эта нацеленная на опухоль стратегия доставки IFN α не показала системной токсичности у мышей и ингибировала рост спонтанных опухолей молочной железы, а также метастазов в легких и печени в клетках злокачественного новообразования молочной железы и колоректального

злокачественного новообразования, соответственно⁸⁻¹⁰.

Другим иммунотерапевтическим подходом является адоптивный перенос генно-инженерных Т-клеток, экспрессирующих рецептор трансгенных Т-клеток (TCR) или химерный антигенный рецептор (CAR), направленных против связанного с опухолью антигена (ТАА)^{11,12}. Этот подход особенно приемлем для злокачественных новообразований с низкой мутационной нагрузкой, которые не способны индуцировать эндогенные Т-клеточные ответы против ТАА. Т-клетки CAR, распознающие антиген CD19, продемонстрировали замечательную эффективность при рецидивирующих и рефрактерных В-клеточных злокачественных опухолях. Тем не менее, эти исследования также показали, что терапевтический эффект был менее выражен при нодальном варианте болезни костного мозга (BM) или лейкозе, предполагая, что иммуносупрессивное микроокружение представляет собой серьезное препятствие для успешной иммунотерапии, особенно при солидных опухолевых образованиях. Более того, в быстрорастущих опухолях, таких как В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ALL), потеря антигена происходит у 20% пациентов, получавших CD19 CAR Т-клетки, что свидетельствует об ограниченной возможности иммунотерапии, направленной против одного антигена^{11,13}. Тем не менее, имеется мало данных о том, вызывает ли лейкоз ТАА-специфические Т-клеточные ответы за пределами аллогенного трансплантата, и может ли такой ответ усиливаться в терапевтических целях.

Сохраняется необходимость в улучшении способа лечения злокачественных новообразований. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность, благодаря обнаружения того факта, что улучшенная эффективность может быть достигнута, при использовании цитокина, такого как IFN α , доставляемого генной терапией, в сочетании с другими иммунотерапевтическими стратегиями.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что цитокин, такой как интерферон, доставляемый генной терапией, может стимулировать индукцию, консолидацию и поддержание противоопухолевых ответов и обеспечивать синергизм вместе с другими иммунотерапевтическими стратегиями, в частности, с лечением ингибиторами контрольных точек иммунитета и лечением с помощью Т-клеток, специфических для опухолеассоциированного антигена (ТАА).

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения предложены гемопоэтическая стволовая клетка (HSC), гематопоэтическая клетка-предшественник (HPC), миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, HPC, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации со специфической к связанному с опухолью антигену (ТАА) Т–клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета и ТАА–специфической Т–клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с 1–метил–триптофаном (1–МТ).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен вектор, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где вектор используется в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен вектор, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где вектор используется в комбинации с ТАА–специфической Т–клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен вектор, содержащий по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*,

функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где вектор используется в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета и ТАА-специфической Т-клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен вектор, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где вектор используется в комбинации с 1-метил-триптофаном (1-МТ).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены ТАА-специфичные Т-клетки, экспрессирующие CAR и/или трансгенный TCR, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена ТАА-специфическая Т-клетка для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили вектор, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен ингибитор контрольных точек иммунитета для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен ингибитор контрольных точек иммунитета для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили вектор, содержащий по меньшей мере одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанная с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен 1-метил-триптофан (1-МТ) для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или

mir-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен 1-метил-триптофан (1-МТ) для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили вектор, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность-мишень mir-130a и/или mir-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена комбинация ингибитора контрольных точек иммунитета и ТАА-специфической Т-клетки для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень mir-130a и/или mir-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена комбинация ингибитора контрольных точек иммунитета и ТАА-специфической Т-клетки для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили вектор, содержащий по меньшей мере одну последовательность-мишень mir-130a и/или mir-126, функционально связанная с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает введение HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированной клетки-предшественника, макрофага или моноцита, содержащих вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень mir-130a и/или mir-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, нуждающемуся в этом пациенту, где HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета и/или ТАА-специфической Т-клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает введение вектора, содержащего, по меньшей мере, одну последовательность-мишень mir-130a и/или mir-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, нуждающемуся в этом пациенту, где вектор используют в комбинации с ингибитором иммунной контрольной точки и/или ТАА-специфической Т-клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит, по меньшей мере, одну

последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, где этот способ включает введение пациенту ТАА–специфической Т–клетки и/или введение пациенту ингибитора контрольных точек иммунитета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения и/или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили вектор, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, который включает стадию введения пациенту ТАА–специфической Т–клетки и/или стадию введения пациенту ингибитора контрольных точек иммунитета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает введение HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированной клетки–предшественника, макрофага или моноцита, содержащих вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, нуждающемуся в этом пациенту, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с 1–метил–триптофаном (1–МТ).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает введение вектора, содержащего, по меньшей мере, одну последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, нуждающемуся в этом пациенту, где вектор используют в комбинации с 1–метил–триптофаном (1–МТ).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированную клетку–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит, по меньшей мере, одну последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, где этот способ включает введение пациенту 1–метил–триптофана (1–МТ).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения и/или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили вектор, содержащий по меньшей мере одну последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, который включает стадию введения пациенту 1–метил–триптофана (1–МТ).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены гемопоэтическая стволовая клетка (HSC), гемопоэтическая клетка–предшественник (НРС), миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или

моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir*-130a и/или *mir*-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir*-130a и/или *mir*-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации со специфической к связанному с опухолью антигену (ТАА) Т–клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir*-130a и/или *mir*-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета и ТАА–специфической Т–клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir*-130a и/или *mir*-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с 1–метил–триптофаном (1–МТ).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен полинуклеотид, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir*-130a и/или *mir*-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где полинуклеотид используется в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен полинуклеотид, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir*-

130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где полинуклеотид используется в комбинации с ТАА-специфической Т-клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен полинуклеотид, содержащий по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где полинуклеотид используется в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета и ТАА-специфической Т-клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен полинуклеотид, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где полинуклеотид используется в комбинации в комбинации с 1-метил-триптофаном (1-MT).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены ТАА-специфичные Т-клетки, экспрессирующие CAR и/или трансгенный TCR, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена ТАА-специфическая Т-клетка для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили полинуклеотид, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен ингибитор контрольных точек иммунитета для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен ингибитор контрольных точек иммунитета для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили полинуклеотид, содержащий по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-

130a и/или miR-126, функционально связанная с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен 1-метил-триптофан (1-МТ) для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен 1-метил-триптофан (1-МТ) для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили полинуклеотид, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена комбинация ингибитора контрольных точек иммунитета и ТАА-специфической Т-клетки для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена комбинация ингибитора контрольных точек иммунитета и ТАА-специфической Т-клетки для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили полинуклеотид, содержащий по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанная с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает введение HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированной клетки-предшественника, макрофага или моноцита, содержащих полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, нуждающемуся в этом пациенту, где HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета и/или ТАА-специфической Т-клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает введение полинуклеотида, содержащего, по меньшей мере, одну последовательность-

мишень mir-130a и/или mir-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, нуждающемуся в этом пациенту, где полинуклеотид используют в комбинации с ингибитором иммунной контрольной точки и/или ТАА-специфической Т-клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит, по меньшей мере, одну последовательность-мишень mir-130a и/или mir-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, где этот способ включает введение пациенту ТАА-специфической Т-клетки и/или введение пациенту ингибитора контрольных точек иммунитета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения и/или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили полинуклеотид, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность-мишень mir-130a и/или mir-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, который включает стадию введения пациенту ТАА-специфической Т-клетки и/или стадию введения пациенту ингибитора контрольных точек иммунитета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает введение HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированной клетки-предшественника, макрофага или моноцита, содержащих полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень mir-130a и/или mir-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, нуждающемуся в этом пациенту, где HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с 1-метил-триптофаном (1-MT).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает введение полинуклеотида, содержащего, по меньшей мере, одну последовательность-мишень mir-130a и/или mir-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, нуждающемуся в этом пациенту, где полинуклеотид используют в комбинации с 1-метил-триптофаном (1-MT).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит, по меньшей мере, одну последовательность-мишень mir-130a и/или mir-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, где этот способ

включает введение пациенту 1-метил-триптофана (1-МТ).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения и/или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили полинуклеотид, содержащий по меньшей мере одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, который включает стадию введения пациенту 1-метил-триптофана (1-МТ).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены гемопоэтическая стволовая клетка (HSC), гематопоэтическая клетка-предшественник (HPC), миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон (IFN) 1 типа, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, HPC, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены HSC, HPC, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, HPC, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации со специфической к связанному с опухолью антигену (ТАА) Т-клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены HSC, HPC, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, HPC, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета и ТАА-специфической Т-клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены HSC, HPC, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, для применения при лечении или

профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с 1–метил–триптофаном (1–МТ).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен вектор, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность–мишень miR–130a и/или miR–126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где вектор используется в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен вектор, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность–мишень miR–130a и/или miR–126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где вектор используется в комбинации с ТАА–специфической Т–клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен вектор, содержащий по меньшей мере одну последовательность–мишень miR–130a и/или miR–126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где вектор используется в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета и ТАА–специфической Т–клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен вектор, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность–мишень miR–130a и/или miR–126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где вектор используется в комбинации с 1–метил–триптофаном (1–МТ).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены ТАА–специфичные Т–клетки, экспрессирующие CAR и/или трансгенный TCR, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированную клетку–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень miR–130a и/или miR–126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена ТАА–специфическая Т–клетка для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили вектор, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность–мишень miR–130a и/или miR–126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен ингибитор контрольных точек иммунитета для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированную клетку–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон I типа.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен ингибитор контрольных точек иммунитета для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили вектор, содержащий по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанная с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон I типа.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен 1–метил–триптофан (1–МТ) для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированную клетку–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон I типа.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен 1–метил–триптофан (1–МТ) для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили вектор, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон I типа.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена комбинация ингибитора контрольных точек иммунитета и ТАА–специфической Т–клетки для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированную клетку–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон I типа.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена комбинация ингибитора контрольных точек иммунитета и ТАА–специфической Т–клетки для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили вектор, содержащий по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанная с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон I типа.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ

лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает введение HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированной клетки–предшественника, макрофага или моноцита, содержащих вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, нуждающемуся в этом пациенту, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета и/или ТАА–специфической Т–клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает введение вектора, содержащего, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, нуждающемуся в этом пациенту, где вектор используют в комбинации с ингибитором иммунной контрольной точки и/или ТАА–специфической Т–клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированную клетку–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, где этот способ включает введение пациенту ТАА–специфической Т–клетки и/или введение пациенту ингибитора контрольных точек иммунитета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения и/или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили вектор, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, который включает стадию введения пациенту ТАА–специфической Т–клетки и/или стадию введения пациенту ингибитора контрольных точек иммунитета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает введение HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированной клетки–предшественника, макрофага или моноцита, содержащих вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, нуждающемуся в этом пациенту, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с 1–метил–триптофаном (1–MT).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ

лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает введение вектора, содержащего, по меньшей мере, одну последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон I типа, нуждающемуся в этом пациенту, где вектор используют в комбинации с 1–метил–триптофаном (1–MT).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированную клетку–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит, по меньшей мере, одну последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон I типа, где этот способ включает введение пациенту 1–метил–триптофана (1–MT).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения и/или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили вектор, содержащий по меньшей мере одну последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон I типа, который включает стадию введения пациенту 1–метил–триптофана (1–MT).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены гемопоэтическая стволовая клетка (HSC), гемопоэтическая клетка–предшественник (НРС), миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон I типа, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон I типа, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации со специфической к связанному с опухолью антигену (ТАА) Т–клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с

нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета и ТАА–специфической Т–клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir*–130a и/или *mir*–126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с 1–метил–триптофаном (1–МТ).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен полинуклеотид, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir*–130a и/или *mir*–126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где полинуклеотид используется в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен полинуклеотид, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir*–130a и/или *mir*–126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где полинуклеотид используется в комбинации с ТАА–специфической Т–клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен полинуклеотид, содержащий по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir*–130a и/или *mir*–126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где полинуклеотид используется в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета и ТАА–специфической Т–клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен полинуклеотид, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir*–130a и/или *mir*–126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где полинуклеотид используется в комбинации в комбинации с 1–метил–триптофаном (1–МТ).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены ТАА–специфичные Т–клетки, экспрессирующие CAR и/или трансгенный TCR, для применения

при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон I типа.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена ТАА-специфическая Т-клетка для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили полинуклеотид, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон I типа.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен ингибитор контрольных точек иммунитета для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон I типа.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен ингибитор контрольных точек иммунитета для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили полинуклеотид, содержащий по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанная с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон I типа.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен 1-метил-триптофан (1-МТ) для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен 1-метил-триптофан (1-МТ) для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили полинуклеотид, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена комбинация ингибитора контрольных точек иммунитета и ТАА-специфической Т-клетки для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у

пациента, где пациенту ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированную клетку–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена комбинация ингибитора контрольных точек иммунитета и ТАА–специфической Т–клетки для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили полинуклеотид, содержащий по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанная с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает введение HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированной клетки–предшественника, макрофага или моноцита, содержащих полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, нуждающемуся в этом пациенту, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета и/или ТАА–специфической Т–клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает введение полинуклеотида, содержащего, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, нуждающемуся в этом пациенту, где полинуклеотид используют в комбинации с ингибитором иммунной контрольной точки и/или ТАА–специфической Т–клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированную клетку–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, где этот способ включает введение пациенту ТАА–специфической Т–клетки и/или введение пациенту ингибитора контрольных точек иммунитета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения и/или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили полинуклеотид, содержащий, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, который включает стадию

введения пациенту ТАА-специфической Т-клетки и/или стадию введения пациенту ингибитора контрольных точек иммунитета.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает введение HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированной клетки-предшественника, макрофага или моноцита, содержащих полинуклеотид, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон, нуждающемуся в этом пациенту, где HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с 1-метил-триптофаном (1-МТ).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает введение полинуклеотида, содержащего, по меньшей мере, одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон, нуждающемуся в этом пациенту, где полинуклеотид используют в комбинации с 1-метил-триптофаном (1-МТ).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие полинуклеотид, где полинуклеотид содержит, по меньшей мере, одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон, где этот способ включает введение пациенту 1-метил-триптофана (1-МТ).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения и/или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили полинуклеотид, содержащий по меньшей мере одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей интерферон 1 типа, который включает стадию введения пациенту 1-метил-триптофана (1-МТ).

В одном варианте осуществления ТАА-специфическая Т-клетка экспрессирует химерный антигенный рецептор (CAR) и/или трансгенный Т-клеточный рецептор (TCR). В одном варианте осуществления ТАА-специфическая Т-клетка экспрессирует CAR. В одном варианте осуществления ТАА-специфическая Т-клетка экспрессирует трансгенный TCR.

Таким образом, настоящее изобретение может использовать Т-клетку, сконструированную для экспрессии ТАА-специфического CAR или TCR.

В одном варианте осуществления цитокин представляет собой интерферон (IFN), IL-12 или гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

В одном варианте осуществления цитокин представляет собой интерферон (IFN).

Предпочтительно, цитокин представляет собой интерферон типа I или интерферон типа II.

В предпочтительном варианте осуществления цитокин представляет собой IFN α .

В другом предпочтительном варианте осуществления цитокин представляет собой интерферон–гамма (IFN γ).

В одном варианте осуществления интерферон типа I представляет собой интерферон–альфа (IFN α) или интерферон–бета (IFN β).

В одном варианте осуществления интерферон типа I представляет собой IFN α .

В одном варианте осуществления интерферон типа I представляет собой IFN β .

В одном варианте осуществления интерферон типа II представляет собой интерферон–гамма (IFN γ).

В одном варианте осуществления HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг, моноцит или вектор по настоящему изобретению предназначены для применения для предотвращения рецидива злокачественного новообразования у пациента.

В одном варианте осуществления HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг, моноцит или вектор по настоящему изобретению предназначены для применения в профилактике прогрессирования злокачественного новообразования у пациента.

В одном варианте осуществления ТАА выбран из одного из следующих: карциноэмбриональный антиген (CEA), рецептор эстрогена, рецептор прогестерона, ephrinB2, ROR1, мезотелин, c-Met, GD-2 и MAGE A3 TCR, 4-1BB, антиген аденокарциномы, альфа–фетопротеин BAFF, клетка В–лимфомы, антиген C242, карбоангидраза 9 (CA-IX), CCR4, CD152, CD200, CD22, CD19, CD22, CD123, CD221, CD23 (рецептор IgE), CD28, CD4, CD40, CD44, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CS-1, CNT0888, CTLA-4, DR5, EpCAM, CD3, дополнительный домен фибронектина–В, рецептор фолата 1, гликопротеин 75, GPNMB, HGF, рецептор–киназы фактор роста гепатоцитов человека, рецептор IGF-1, IGF-I, IgG1, L1-CAM, IL-13, IL-6, рецептор инсулиноподобного фактора роста I, интегрин $\alpha\beta$ 1, интегрин $\alpha\nu\beta$ 3, MORAb-009, MS4A1, муцин CanAg, N-гликолилнейраминовая кислота, NPC-1C, PDGF-R α , PDL192, фосфатидилсерин, клетки карциномы предстательной железы, RANKL, RON, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, тенасцин C, TGF бета 2, TGF- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевый антиген STAA16.88, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2, виментин, 5T4, CD5, CD19, CD20, CD21, CD25, CD37, CD30, CD33, CD45, CAMPATH-1 (CDw52), HLA-DR, антиидиотип, TAG-72, Ep-CAM, MUC1, фолат-связывающий белок, A33, G250, простатический специфический мембранный антиген (PSMA), простатический специфический антиген (PSA), ферритин, ганглиозиды (например, GD2, GD3, GM2), Le^y, CA-125, CA19-9, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), p185HER2, рецептор IL-2, de2-7 EGFR, белок активации фибробластов (FAP), тенасцин, металлопротеиназы, эндосиалин, карбоангидраза, галектин 9, альдолаза A, eIF γ 4, тирозиназа, галектин 4, HERKV-K10, p53, NY-LU-12, рестин, NY-CO-38,

MAGE-1, MAGE-4a, SSX2, NY-ESO-1, SCP-1, 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, b-катенин/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27m, CDK4/m, CT, Cyp-B, DAM-6 (MAGE-B2) и DAM-10 (MAGE-B1), ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT (hTRT), iCE, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/Melan-A, MC1R, миозин/m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-A, NY-ESO-1, P15, p190 минорный bcr-abl, Pml/RARa, PRAME, RAGE, RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-3, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, белок 1, gp75, TRP-2, TRP-2/INT2 или WT1.

В одном варианте осуществления ТАА представляет собой CD19.

В предпочтительном варианте осуществления ТАА-специфическая Т-клетка экспрессирует CD19-специфический CAR.

В одном варианте осуществления ТАА-специфическая Т-клетка получена из клетки, взятой от пациента.

В одном варианте осуществления ТАА-специфическая Т-клетка была разработана для разрушения по меньшей мере одного эндогенного гена, предпочтительно, где по меньшей мере один эндогенный ген выбран из эндогенного гена, кодирующего α -цепь TCR, β -цепь TCR и главный комплекс гистосовместимости (МНС).

В одном варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунитета представляет собой антитело, предпочтительно, где антитело ингибитор контрольных точек иммунитета выбрано из группы, состоящей из антитела против CTLA4, антитела против PD1, антитела против PDL1, антитела против PDL2 и антитела против LAG-3.

В одном варианте осуществления вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень mir-130a и по меньшей мере одну последовательность-мишень mir-126, предпочтительно, вектор содержит две последовательности-мишени mir-130a и две последовательности-мишени mir-126.

В одном варианте осуществления HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит, используемые в настоящем изобретении, содержат по меньшей мере одну последовательность-мишень mir-130a и по меньшей мере одну последовательность-мишень mir-126, предпочтительно, HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит, используемые в настоящем изобретении, содержат две последовательности-мишени mir-130a и две последовательности-мишени mir-126.

Вектор или полинуклеотид могут дополнительно содержать тканеспецифичный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, например, интерферон типа 1. Предпочтительным тканеспецифичным промотором является промотор ТЕК (Tie2).

В одном варианте осуществления изобретения злокачественное новообразование представляет собой гематологическое злокачественное образование или солидную опухоль, предпочтительно, где гематологическое злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), лимфобластного

лейкоза, острого лимфобластного лейкоза (ALL), миелодиспластических синдромов (MDS), миелопролиферативных новообразований (MPN), первичного миелофиброза, эссенциальной тромбоцитемии, истинной полицитемии, атипичного хронического миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза (CML), лимфомы, множественной миеломы, неходжкинской лимфомы и лимфомы Ходжкина; или, предпочтительно, где солидная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака легких, рака молочной железы, рака пищевода, рака желудка, рака толстой кишки, холангиокарциномы, рака поджелудочной железы, рака яичника, рака головы и шеи, синовиальной саркомы, ангиосаркомы, остеосаркомы, рака щитовидной железы, рака эндометрия, нейробластомы, рабдомиосаркомы, рака печени, меланомы, рака предстательной железы, рака почки, саркомы мягких тканей, рака уротелия, рака желчных путей, глиобластомы, рака шейки матки и колоректального рака.

В одном варианте осуществления злокачественное новообразование представляет собой метастазирование из первичной опухоли.

В одном варианте осуществления клетка, используемая в настоящем изобретении, представляет собой HSC, содержащую вектор или полинуклеотид, где вектор или полинуклеотид содержит, по меньшей мере, одну последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, например, интерферон типа 1.

В одном варианте осуществления клетка, используемая в настоящем изобретении, представляет собой HPC, содержащую вектор или полинуклеотид, где вектор или полинуклеотид содержит, по меньшей мере, одну последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, например, интерферон типа 1.

В одном варианте осуществления клетка, используемая в настоящем изобретении, представляет собой миелоид/моноцит–коммитированную клетку–предшественник, содержащую вектор или полинуклеотид, где вектор или полинуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательности, кодирующей цитокин, например, интерферон типа 1.

В одном варианте осуществления клетка, используемая в настоящем изобретении, представляет собой макрофаг, содержащий вектор или полинуклеотид, где вектор или полинуклеотид содержит, по меньшей мере, одну последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, например, интерферон типа 1.

В одном варианте осуществления клетка, используемая в настоящем изобретении, представляет собой моноцит, содержащий вектор или полинуклеотид, где вектор или полинуклеотид содержит, по меньшей мере, одну последовательность–мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, например, интерферон типа 1.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены гемопоэтическая стволовая клетка (HSC), гемопоэтическая клетка–предшественник (HPC), миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, содержащий по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый цитокин, и вектор, содержащий по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где первый и второй цитокины являются различными.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена популяция гемопоэтических стволовых клеток (HSC), гемопоэтических клеток–предшественников (HPC), миелоид/моноцит–коммитированных клеток–предшественников, макрофагов или моноцитов, популяция, трансдуцированная вектором, содержащим по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый цитокин, и вектором, содержащим по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй цитокин для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где первый и второй цитокины являются различными.

В одном варианте осуществления первый цитокин кодируется на первом векторе, а второй цитокин кодируется на втором векторе. В одном варианте осуществления первый и второй цитокины кодируются на одном и том же векторе.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена комбинация полинуклеотида, содержащего, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый цитокин, и полинуклеотида, содержащего, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где первый и второй цитокины являются различными.

В одном варианте осуществления первый цитокин кодируется на первом полинуклеотиде, а второй цитокин кодируется на втором полинуклеотиде. В одном варианте осуществления первый и второй цитокины кодируются на одном и том же полинуклеотиде. Полинуклеотиды могут быть, например, в форме вектора.

В одном варианте осуществления первый и второй цитокины, каждый, независимо, выбраны из интерферона (IFN) или фактора некроза опухоли альфа ($TNF\alpha$),

В одном варианте осуществления первый и второй цитокины, каждый, независимо, выбраны из группы, состоящей из IFN типа I (предпочтительно $IFN\alpha$ или $IFN\beta$), IFN типа II (предпочтительно $IFN\gamma$) и $TNF\alpha$.

В одном варианте осуществления первый и второй цитокины, каждый, независимо, выбраны из группы, состоящей из $IFN\alpha$, $IFN\beta$, $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$.

В одном варианте осуществления первый цитокин представляет собой $IFN\alpha$, а второй цитокин представляет собой $IFN\gamma$.

В одном варианте осуществления первый цитокин представляет собой $IFN\alpha$, а второй цитокин представляет собой $TNF\alpha$.

В предпочтительном варианте осуществления первый цитокин представляет собой $IFN\gamma$, а второй цитокин представляет собой $TNF\alpha$.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены гемопоэтическая стволовая клетка (HSC), гемопоэтическая клетка–предшественник (HPC), миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит в по меньшей мере, одну последовательность–мишень $mir-130a$ и/или $mir-126$, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где цитокин представляет собой интерферон (IFN) или фактор альфа некроза опухоли ($TNF\alpha$).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен вектор, содержащий в по меньшей мере одну последовательность–мишень $mir-130a$ и/или $mir-126$, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где цитокин представляет собой интерферон (IFN) или фактор некроза опухоли альфа ($TNF\alpha$).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен полинуклеотид, содержащий в по меньшей мере, одну последовательность–мишень $mir-130a$ и/или $mir-126$, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где цитокин представляет собой интерферон (IFN) или фактор некроза опухоли альфа ($TNF\alpha$).

В одном варианте осуществления IFN представляет собой IFN типа II (предпочтительно, $IFN\gamma$) или IFN типа I (предпочтительно, $IFN\alpha$ или $IFN\beta$).

В одном варианте осуществления цитокин представляет собой $IFN\gamma$. В одном варианте осуществления цитокин представляет собой $IFN\alpha$. В одном варианте осуществления цитокин представляет собой $IFN\beta$.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Ингибирование роста OVA–ALL у IFN мышей путем индукции OVA–специфических $CD8^+$ Т–клеток.

a, Схематическое представление лентивирусных векторов (LV), используемых для конструирования HSC, и генерирования спонтанного B–ALL. **b**, Экспериментальная разработка. **c**, Конкретные количества (среднее \pm SEM) исходного ALL в периферической крови (PB) за время CTRL ($n=10$, обработка антителом изотипического контроля), IFN

((n=10, обработка антителом изотипического контроля), CTRL+aCTLA4 (n=14) и IFN+aCTLA4 (n=13) мыши. Каждая точка представляет одну мышь. *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001, непараметрический ранговый метод для лонгитудинальных данных в факторных экспериментах. **d, e, f**, Конкретные количества (среднее±SEM) OVA-ALL (спроектировано с помощью двунаправленного LV NGFR/OVA, показанного вверху) в PB за время (**d**), а также в BM и селезенке (**e, f**; 14 дней после инъекции опухоли) IFN мышей (n=15) и CTRL (n=15) (показан один из 9 экспериментов). Каждая точка представляет одну мышь. ****p<0,0001, непараметрический ранговый метод для лонгитудинальных данных в факторных экспериментах (**d**); *p<0,05, **p<0,01, тест Манн-Уитни (**e, f**). **g**, CD8+ Т-клетки селезенки IFN мышей, через 13 дней после инъекции опухоли или от не несущих опухоли CTRL (наивные C57Bl/6, n=1) мышей, протестированных IFNg-ELISPOT против линии клеток-мишеней EL4, трансдуцированной NGFR-OVA или NGFR-CD20 BdLV. Каждая точка представляет одну мышь, среднее±SEM. Низкая опухолевая нагрузка (n=5): 5,2±4,9 (среднее±SEM)% OVA-ALL; средняя опухолевая нагрузка (n=1): 33% OVA-ALL; высокая опухолевая нагрузка (n=6): 51±4,9% OVA-ALL. **h**, Процентное содержание (среднее±SEM) OVA-специфических Т-клеток у PB IFN мышей (n=14-6) и CTRL (n=15-8). **p<0,01, тест Манн-Уитни выполнялся через 9 дней после инъекции OVA-ALL. Каждая точка представляет одну мышь. Т-клетки от трансгенных мышей OT-I используют в качестве положительного контроля (не показано). **i, j**, Конкретное число (среднее±SEM) OVA-специфических Т-клеток в BM (**i**) и селезенке (**j**), через 9 дней после инъекции опухоли, у IFN (n=23) и CTRL (n=26) мышей из 3 независимых экспериментов. **p<0,01, ***p<0,001, тест Манн-Уитни. Каждая точка представляет одну мышь. **k**, CD8+ Т-клетки селезенки от IFN (n=7) и CTRL (n=8) мышей через 9 дней после инъекции опухоли или от мышей, не имеющих опухоли, испытанных, как в (**g**). Стимуляция конканавалином А (ConA) и Т-клетками OT-I мышей (не показаны) используются в качестве положительных контролей. Каждая точка представляет одну мышь. **l, m**, Процентное содержание (**l**) и конкретное количество (**m**) (среднее±SEM) OVA-ALL в PB IFN (n=9), CD8-истощенных IFN (n=7) и CTRL (n=9) мышей. **p<0,01, ****p<0,0001, непараметрический ранговый метод для лонгитудинальных данных в факторных экспериментах (**l**); *p<0,05, ****p<0,0001, критерий Крускала-Уоллиса с откорректированным значением p по критерию Данна (**m**).

Фигура 2. Адоптивно перенесенные OT-I Т-клетки распространяются и содержат OVA-ALL у IFN мышей.

a, b, Схема эксперимента (**a**) и рост OVA-ALL за время (**b**, процентное содержание в PB; среднее±SEM) у IFN (n=7) или CTRL (n=7) мышей. **c**, Конкретное число (среднее±SEM) OTI Т-клеток в BM и селезенке IFN (n=7), CTRL (n=7) мышей и мышей без опухолей (C57Bl/6 без опухолей, n=3) 3 дня после OT-I адоптивного переноса. *p<0,05, **p<0,01, тест Манн-Уитни. Каждая точка представляет одну мышь. **d**, Процентное содержание (среднее±SEM) наивных (CD44-CD62L+), центральной памяти (CD44+CD62L+) и эффекторной памяти (CD44+CD62L-) клеток в OT-I Т-клетках в BM и

селезенке мышей за (с) 3 дня после адоптивного переноса. $**p < 0,01$, непараметрический комбинированный тест. **e, f**, Схема эксперимента (**e**) и кривая выживания (**f**) мышей CTRL ($n=12$), инъецированных OVA-ALL, IFN+OT-I ($n=9$) и мышей CTRL+OT-I ($n=10$), $*p < 0,05$, $****p < 0,0001$ критерий Мантеля-Хензеля, скорректированное значение p по критерию Бонферрони. **g**, Конкретное число (среднее \pm SEM) адоптивно перенесенных OT-I T-клеток в PB в течение времени у CTRL+OT-I и IFN+OT-I мышей из (**f**) и C57Bl/6 мышей, не имеющих опухоли ($n=3$). Длительно выжившие мыши показаны зеленым цветом. Каждая линия представляет одну мышь. **h**, Процентное содержание (среднее \pm SEM) экспрессии Lag3 на OT-I T-клетках в PB мышей из (**f, g**). Каждая точка представляет одну мышь.

Фигура 3. ISG/Th1-примированная генная сигнатура и увеличенные классические моноциты и M1-смещение у IFN мышей.

a, График рассеяния для большого массива данных показывает изменения в экспрессии панели иммунных генов злокачественного новообразования в BM и селезенке IFN и CTRL мышей до и после заражения OVA-ALL. Горизонтальные пунктирные линии показывают порог значимости ($FDR < 0,05$). Вертикальные пунктирные линии указывают на гены с 2-кратной повышенной/пониженной экспрессией по отношению к CTRL мышам. ISG показаны оранжевым цветом, гены активации Th1 и T-клеток светло-синим цветом, гены, общие для ответов IFN и Th1 зеленым цветом, гены активации макрофагов и DC красным цветом, гены активации NK-клеток фиолетовым цветом, гены процессинга антигенов синим цветом, гены, связанные с лейкемией, серым. Управляемые вставки показаны увеличенными справа. $n=3$ мышам для каждого образца, за исключением CTRL BM+ALL, $n=2$. **b**, Анализ экспрессии с помощью RT-qPCR указанных генов Th1 (среднее изменение кратности по сравнению с OVA-ALL-инъецированными мышами CTRL \pm SEM) в CD4+ T-клетках селезенки от OVA-ALL-инъецированных IFN ($n=6$) и CTRL ($n=5$) мышей через 9 дней после инъекции опухоли и от не содержащей опухоли C57Bl/6 мыши. Каждая точка представляет одну мышь. $*p < 0,05$, Манн-Уитни. **c**, Процентное содержание (среднее \pm SEM) указанных миелоидных популяций в PB IFN ($n=11$) и CTRL ($n=13$) мышей до и после (12 дней) инъекции OVA-ALL. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$, Kruskal-Wallis, с откорректированным значением p по критерию Данна. Статистический анализ проводится в каждой отдельной популяции миелоидных клеток.

Фигура 4. Клеточная и генная терапия IFN вызывает длительные противоопухолевые реакции, а в сочетании с иммунной контрольной точкой дополнительно улучшает выживаемость.

a, b, c, d, Кривые выживаемости IFN и CTRL мышей, которым инъецировали OVA-ALL, после первых (**a**; $n=11,13$; $*p < 0,05$, критерий Мантеля-Хензеля) и последующих опухолевых проблем с указанными клетками ALL (**b**: $n=3$ длительно выживающие IFN мыши из (**a**) в сравнении с 4 наивными мышами; **c**: те же 3 выжившие мыши из (**a, b**) в сравнении с 4 наивными мышами; **d**: 2 из 3 выживших мышей из (**a, b, c**) в сравнении с 4 наивными мышами. **e**, Экспериментальный дизайн. **f, g**, Кривые

выживаемости OVA–ALL–инъецированных (f) IFN (n=14), CTRL (n=14), IFN+αCTLA4 (n=14) и CTRL+αCTLA4 (n=15) мышей, *p<0,05, ***p<0,001, критерий Мантеля–Хензеля, скорректированное значение p по методу Бонферрони; и (g) IFN+αCTLA4 (n=10) и CTRL+αCTLA4 (n=12) мышей, *p<0,05, тест Mantel–Haenszel. h, PBMC от выживших мышей из (f) (IFN n=3, CTRL n=1, IFN+αCTLA4 n=4, CTRL+αCTLA4 n=3) через 51 день после инъекции опухоли и от мышей без опухоли (OT–I, n=1 и трансплантированные CTRL мыши, n=2), испытанные с помощью IFNγ–ELISPOT против линии клеток–мишеней EL4, трансдуцированной NGFR–OVA, или NGFR–CD20 BdLV, или PGK–OFP, или PGK–tTA LV. Пунктирная линия указывает на более высокий средний фоновый уровень, наблюдаемый в отношении клеток–мишеней EL4 NGFR. Каждая точка представляет собой одну мышь, протестированную по всем четырем ТАА. i, Клональность и сходство репертуара CDR TCR–бета выживших мышей (каждая стрелка представляет собой мышь) от (f) до инъекции OVA–ALL (начало стрелки, T0) и через 4 дня после второго повторного заражения опухолью (кончик стрелки, T2). j, PBMC от мышей из (g) (выжившие IFN+αCTLA–4, закрашенные синие символы, n=3; выжившие CTRL+αCTLA–4, закрашенные красные символы, n=1; IFN+αCTLA–4 не отвечающие, незакрашенные синие символы, n=7; CTRL+αCTLA–4, незакрашенный красный символ, n=8 из 12 контролей, не отвечающих на лечение), протестированные IFNγ–ELISPOT, как в (h), через 19 дней после инъекции опухоли. Каждая точка представляет собой одну мышь, протестированную по всем четырем ТАА. k, Кривая выживаемости мышей из (g), стратифицированных на основе их иммунной реактивности, как оценено анализом IFNγ–ELISPOT, показанным в (j). Мыши, показанные красным, реагируют против 2 или более антигенов; мыши, показанные черным, реагируют против 1 или без антигенов. Следует отметить, что реактивность в отношении OVA и NGFR принимается за 1, поскольку их экспрессия совместно регулируется двунаправленным промотором, присутствующим в BdLV.

Фигура 5. Сконструированный OVA–ALL показал повышенную иммуногенность по сравнению с исходным ALL.

a, Схематическое представление двунаправленного LV (BdLV), используемого для генерации OVA–ALL, с показательным графиком, показывающим экспрессию NGFR на очищенном OVA–ALL. b, Стратегия гейтирования, используемая для идентификации экспрессии B–ALL (CD19+OFP+) и NGFR на ALL в PB мышей, которым инъецировали опухоль. c, Вверху: Процентное содержание (среднее±SEM) OVA–ALL в PB иммунокомпетентных C57Bl/6 (n=5) и иммунодефицитных NSG (n=6) мышей и исходного ALL в PB иммуно–компетентных C57Bl/6 (n=5) мышей. Внизу: экспрессия маркера NGFR на ALL, присутствующем в PB иммунокомпетентных C57Bl/6 (n=5) и иммунодефицитных NSG (n=6) мышей. Следует отметить, что экспрессия антигенов NGFR и OVA совместно регулируется двунаправленным промотором, присутствующим в BdLV. d, e, Процентное содержание (среднее±SEM) OVA–ALL и экспрессия маркера NGFR на лейкозных клетках, присутствующих в BM иммунокомпетентного C57Bl/6 (n=6) (d) и иммунодефицитного

NSG (n=6) мыши (е) в процессе умерщвления подопытного животного.

Фигура 6. Ингибирование роста OVA-ALL у IFN мышей и индукция OVA-специфических T-клеток.

а, Стратегия гейтирования, используемая для идентификации OVA-специфических CD8⁺ T-клеток. **б, с, d**, Процентное содержание (**б**) и конкретное число (**с, d**) (среднее±SEM) OVA-ALL в PB (**б**) и в BM и селезенке (**с, d**) IFN (n=14-6) и CTRL (n=15-8) мышей через 9 дней после введения опухоли. ***p<0,001, Манн-Уитни. Каждая точка представляет одну мышшь. **е**, Процентное содержание OVA-ALL у PB IFN (n=9), CD8-истощенных IFN (n=7) и CTRL (n=9) мышей через 9 дней после заражения опухолью. Каждая точка представляет одну мышшь. *p<0,05, ***p<0,001, Крускал-Уоллис с откорректированным значением p по критерию Данна.

Фигура 7. Стратегия гейтирования использовалась для оценки апоптоза OVA-ALL, клеточного цикла и скорости пролиферации.

а, б, Стратегия гейтирования (**а**) и анализ (**б**) (процент, среднее±SEM) раннего апоптоза (аннексин+7-AAD-), позднего апоптоза (аннексин+7-ADD+), мертвых/некротических (аннексин-7AAD+) и живых (аннексин-7-AAD-) клеток OVA-ALL, присутствующих в BM и селезенке IFN (n=11) и CTRL (n=15) мышей через 9 дней после инъекции опухоли. *p<0,05, Манн-Уитни. **с, d**, стратегия гейтирования (**с**) и анализ (**d**: процентное содержание, среднее±SEM) распределения OVA-ALL в фазах G0 (Ki67-Hoechst^{low}), G1 (Ki67+Hoechst^{low}) и S-G2-M (Ki67+Hoechst^{high}) клеточного цикла в BM и селезенке IFN (n=11) и CTRL (n=15) мышей через 9 дней после введения опухоли. **е, f**, Стратегия гейтирования (**е**) и анализ (**f**: процентное содержание, среднее±SEM) пролиферирующих клеток EdU+ALL, присутствующих в BM и селезенке IFN (n=11) и CTRL (n=15) мышей через 9 дней после инъекции опухоли. **p<0,01, Манн-Уитни.

Фигура 8. Адоптивный перенос T-клеток OT-I у CTRL мышей, инъецированных OVA-ALL, IFN мышей и C57Bl/6 мышей, не имеющих опухолей.

а, Конкретное число (среднее±SEM) OVA-ALL в PB CTRL (n=7) и IFN (n=7) мышей в указанное время после адоптивного переноса OT-I. Каждая точка представляет одну мышшь. **б**, экспрессия Lag3 на OT-I T-клетках в BM и селезенке IFN (n=7), CTRL (n=7) мышей и мышей без опухолей (C57Bl/6 без опухолей, n=3) через 3 дня после адоптивного переноса OT-I T-клеток. Каждая точка представляет одну мышшь. **с**, Стратегия гейтирования, используемая для идентификации адоптивно перенесенных OT-I T-клеток (CD45.2+) и экспрессии Lag3 на OT-I T-клетках, присутствующих в BM и селезенке мышей из (**а, б**). Клетки OVA-ALL сначала исключаются путем гейтирования на OFP-CD8⁺ T-клетках. Маркеры CD45.1 и CD45.2 используются для различения радиоустойчивых CD8⁺ T-клеток реципиента (CD45.1+), донорных CD8⁺ T-клеток (CD45.1.2+) и адоптивно переносимых OT-I T-клеток (CD45.2+). У неопухолевых мышей адоптивно перенесенные OT-I T-клетки определяются как CD8⁺ T-клетки и отличаются от CD8⁺ реципиентных T-клеток (CD45.1+) путем гейтирования CD45.2+CD8⁺ T-клеток. **d**. Стратегия гейтирования, используемая для идентификации наивных (CD62L+CD44-),

центральной памяти (CD62L+CD44+) и эффекторной памяти (CD62L-CD44+) клеток, адоптивно переносимых OT-I T-клеток. OT-I T-клетки идентифицируются как описано в (с, OVA-ALL сначала исключаются путем гейтирования на CD19-CD8+ T-клетках). **e, f**, Конкретное число экспрессии маркера OVA-ALL (**e**) (среднее±SEM) и маркера NGFR (**f**) на ALL в ВМ и селезенке мышей, показанных на (**a, b**), через 3 дня после адоптивного переноса OT-I T-клеток. Каждая точка представляет одну мышь. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Манн-Уитни (**e**).

Фигура 9. Адоптивно перенесенные OT-I T-клетки распространяются и содержат OVA-ALL у IFN мышей.

a, b, c, d, Процентное содержание (среднее±SEM) клеток ALL и экспрессия маркера NGFR на клетках ALL в РВ (**a, b**) и ВМ (**c, d**) IFN+OT-I ($n=9$, **a, c**) и CTRL+OT-I ($n=10$, **b, d**) мышей. Длительно выжившие мыши показаны зеленым цветом. Следует обратить внимание, что экспрессия NGFR не показана для выживших мышей, у которых лейкоз уничтожен. Каждая отдельная мышь представлена одной точкой (**b, d**) или линией (**a, b**). **e, f**, Процентное содержание (среднее±SEM) наивных (CD62L+CD44-), центральной памяти (CD62L+CD44+) и эффекторной памяти (CD62LCD44+) OT-I T-клеток в ВМ, селезенке и лимфатических узлах усыпленных мышей, несущих опухоль, из (**a, b, c, d**, CTRL+OT-I, $n=8$; IFN+OT-I, $n=3$). **f**, Процентное содержание (среднее±SEM) экспрессии PD1 на OT-I T-клетках, присутствующих в ВМ, селезенке и лимфатических узлах мышей, показан в (**e**). Каждая точка представляет одну мышь.

Фигура 10. Анализ экспрессии генов прототипических генов Th2 и Treg в очищенных CD4+ T-клетках селезенки.

a, Анализ экспрессии с помощью RT-qPCR указанных генов Th2 и Treg (среднее кратное изменение по сравнению с CTRL мышами, инъецированными OVA-ALL, ±SEM) в CD4+ T-клетках селезенки, очищенных от IFN, инъецированной OVA-ALL ($n=6$), и с CTRL мышами ($n=5$) через 9 дней после инъекции опухоли и с C57Bl/6 мышами, не несущими опухоль. Каждая точка представляет одну мышь.

Фигура 11. Проточно-цитометрический анализ миелоидных клеток в РВ и селезенке у IFN и CTRL мышей с опухолями и без инъекций опухолей.

a, b, c, Стратегия гейтирования (**a**) и анализ (**b**, конкретное число, среднее±SEM) популяций миелоидных клеток в селезенке у IFN и CTRL мышей без опухолей и инъецированных OVA-ALL (CTRL: $n=3$), IFN $n=2$, CTRL+ALL: $n=9$, IFN+ALL: $n=7$), через 10 дней после инъекции опухоли. Макрофаги (MF) идентифицируются как клетки CD19-CD11c-Ly6G-F4/80+и далее различаются на МНС-II+MF и МНС-II-Mf с использованием маркера IAb (МНС-II). Различали CD19-F4/80-CD11c+МНСII-миелоидные клетки и CD19-F4/80-CD11c+МНСII+дендритные клетки. Определяли гранулоциты как CD19-F4/80-CD11c-CD11b+Ly6C+Ly6G+, классические моноциты как CD19-F4/80-CD11c-CD11b+Ly6ClowLy6G- и не классические моноциты как CD19-F4/80-CD11c-CD11b+Ly6C-Ly6G-. ** $p < 0,01$, Крускал-Уоллис с откорректированным значением p по критерию Данна. Статистика выполняется в каждой отдельной

миелоидной популяции. **d**, Процентное содержание макрофагов МНС-II, присутствующих у IFN и CTRL мышей без опухолей или имеющих опухоль, из (**e**). ** $p < 0,01$, Крускал-Уоллис с откорректированным значением p по критерию Данна.

Фигура 12. Проточно-цитометрический анализ миелоидных клеток в РВ и селезенке у IFN и CTRL мышей с опухолями и без инъекций опухолей.

a, b, Стратегия гейтирования и анализ (конкретное число, среднее \pm SEM) популяций миелоидных клеток в ВМ у IFN и CTRL мышей без опухолей и инъектированных OVA-ALL (CTRL: $n=3$), IFN $n=2$, CTRL+ALL: $n=9$, IFN+ALL: $n=7$), через 10 дней после инъекции опухоли. Каждая точка представляет одну мышь. Макрофаги (MF) идентифицированы как CD19-CD11c-Ly6G-F4/80+ клетки, дендритные клетки (DC) как CD19-F4/80-CD11c+MHCII+, гранулоциты как CD19-F4/80-CD11c-CD11b+Ly6C+Ly6G+, классические моноциты как CD19-F4/80-CD11c-CD11b+Ly6ClowLy6G- и неклассические моноциты как CD19-F4/80-CD11c-CD11b+Ly6CLy6G-. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Крускал-Уоллис с откорректированным значением p по критерию Данна. Статистика выполняется в каждой отдельной миелоидной популяции. **c, d**, Стратегия гейтирования (**c**) и анализ (**d**, конкретное число, среднее \pm SEM) Т-регуляторных клеток в ВМ и селезенке IFN и CTRL мышей без опухолей и с инъекцией OVA-ALL из (**b**). Каждая точка представляет одну мышь. Т-регуляторные клетки определяются как CD3+CD4+CD25+FoxP3+. ** $p < 0,01$, Крускал-Уоллис с откорректированным значением p по критерию Данна. Статистика выполняется внутри каждой отдельной ткани.

Фигура 13. Проточно-цитометрический анализ НК и НКТ клеток в селезенке IFN и CTRL мышей с опухолями и без инъекций опухолей.

a, b, c, Стратегия гейтирования (**a**) и анализ (**b**, конкретное число, среднее \pm SEM) НК и НКТ клеток в селезенке IFN и CTRL мышей без опухолей и с инъекцией OVA-ALL (CTRL: $n=3$), IFN $n=2$, CTRL+ALL: $n=9$, IFN+ALL: $n=7$), через 10 дней после инъекции опухоли. Каждая точка представляет одну мышь. НК-клетки были идентифицированы как CD19-CD3-NK1.1+, а НКТ-клетки как CD19-CD3+NK1.1+. Используя маркеры CD11b и CD27, дополнительно различались наиболее незрелые (CD11b-CD27+), зрелые и наиболее продуцирующие цитотоксические и цитокиновые (CD11b+CD27+) и зрелые и менее продуцирующие цитотоксические и цитокиновые (CD11b+CD27-) НК-клетки. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Крускал-Уоллис с откорректированным значением p по критерию Данна. Статистика выполняется в каждой отдельной популяции. **c**, Процентное содержание (среднее \pm SEM) указанных субпопуляций НК-клеток в селезенке (вверху) и ВМ (внизу) у IFN и CTRL мышей, не имеющих опухолей, из (**b**). Каждая точка представляет одну мышь. **d, e**, Процентное содержание (среднее \pm SEM) экспрессии NKG2D и NKp46 на CD11b+CD27+(**d**) и CD11b+CD27- (**d, e**) НК-клетках, присутствующих в селезенке (**d**) и ВМ (**e**) мышей от (**b**). Каждая точка представляет одну мышь. * $p < 0,05$, ** $p > 0,01$, Крускал-Уоллис с откорректированным значением p по критерию Данна. Статистика выполняется в каждой отдельной популяции.

Фигура 14. Иммунное давление, оказываемое OVA–специфическими T–клетками, приводит к иммунному отбору OVA–негативных ALL–клеток у мышей.

а, Процентное содержание (среднее±SEM) OVA–ALL в PB каждой отдельной IFN (n=11) и CTRL (n=13) мыши. Каждая строка представляет одну мышь. **б,** Экспрессия NGFR на BM–инфильтрирующем ALL (или PB, циркулирующем ALL для тех мышей, для которых недоступен анализ BM) и конкретное число (среднее±SEM) OVA–специфических T–клеток (каждая линия представляет одну мышь) в PB IFN (n=8) и CTRL (n=13) мышей с быстрым или отсроченным течением заболевания (быстрое течение заболевания: CTRL: 13–29 дней (диапазон), 20,4±1,3 (среднее±SEM), n=11; IFN): 16–27 дней, 20,8±1,8, n=5, отсроченное течение заболевания: CTRL: 34–44 дня, 39±5, n=2; IFN: 34–100 дней, 56±22, n=3). **с,** Конкретное число (среднее±SEM) OVA–специфических T–клеток у PB IFN мышей (n=3) с длительным выживанием. Каждая строка представляет одну мышь. **д,** Процентное содержание (среднее±SEM) OVA–специфических T–клеток у выживших IFN мышей (n=3) по сравнению с 4 наивными мышами на фигуре **4б** через 14 дней после второго заражения опухолью с помощью OVA–ALL. Каждая точка представляет одну мышь. **е,** Показательный график, показывающий клетки OVA–ALL и родительские ALL, смешанные в соотношении 1:1 перед инъекцией мышам.

Фигура 15. Кинетика лейкемического роста у отдельных мышей.

а, б, Процентное содержание (среднее±SEM) OVA–ALL в PB каждого индивидуума (а) IFN (n=14), CTRL (n=14), IFN+aCTLA4 (n=14) и CTRL+aCTLA4 (n=15) мыши и (б) мыши IFN+aCTLA4 (n=10) и CTRL+aCTLA4 (n=12). Каждая точка представляет одну мышь.

Фигура 16. Иммунный отбор OVA–негативных ALL–клеток усиливается как у IFN, так и у CTRL мышей, обработанных CTLA4.

а, Экспрессия NGFR на BM–инфильтрирующем ALL (или PB, циркулирующем ALL для тех мышей, для которых недоступен анализ BM) и конкретное число (среднее±SEM) OVA–специфических T–клеток (каждая линия представляет одну мышь) в PB IFN (n=14), CTRL (n=14), IFN+aCTLA4 (n=14) и CTRL+aCTLA4 (n=15) мышей, демонстрирующих быстрое, отсроченное течение заболевания или длительную выживаемость. Быстрое течение заболевания: CTRL: 14–21 день (диапазон), 15,66±0,8 (среднее±SEM), n=12; IFN: 17–25 дней, 21±1,3, n=8; CTRL+CTLA4: 14–21 день, 19±1,2, n=6; IFN+CTLA4: 25 дней, 25±0, n=2; отсроченное течение заболевания: CTRL: 36 дней, n=1; IFN: 30–36 дней, 34±2, n=3; CTRL+CTLA4, 30–64 дня, 42±7,4, n=5; IFN+CTLA4: 25–64 дня, 44±4,9, n=7). **б,** Процентное содержание OVA–специфических T–клеток в CD8+ T–клетках в PB мышей из (а). *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001, непараметрический ранговый метод для продольных данных в факторных экспериментах. **с,** Клональность и сходство репертуара TCR–бета CDR у длительно выживших мышей без опухолей (каждая стрелка представляет собой мышь) на фигуре **4ф** перед инъекцией OVA–ALL (начало стрелки, T0) и через 30 дней после заражения OVA–ALL (конец стрелки, T1).

Фигура 17. Генная терапия IFN ингибирует рост ALL путем активации

адаптивного иммунитета.

Конкретное число (среднее±SEM) исходного ALL в периферической крови (PB) с течением времени у CTRL (n=10, обработанного антителом изотипического контроля), IFN (n=10, обработанного антителом изотипического контроля), CTRL+αCTLA4 (n=14) и IFN+αCTLA4 (n=13) мышей. Каждая точка представляет одну мышь. *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001, непараметрический ранговый метод для продольных данных в факторных экспериментах.

Фигура 18. Генная терапия IFN накладывает иммуностимулирующую программу в TME.

Процент DC, представляющих иммунодоминантный пептид OVA (SINFEKL) на молекулах MHC-I в BM мышей от CTRL+ALL (n=7) и IFN+ALL (n=8). *p<0,05 критерий Манна–Уитни.

Фигура 19. Транскрипционное перепрограммирование лейкемии TME с помощью генной терапии IFN.

a, b, Вулканные диаграммы (левые панели), на которых показаны дифференциально экспрессированные гены (абс. $\log_2FC > 1,5$, $FDR < 0,05$) с повышенными (зеленым) или с пониженными (оранжевым) макрофагами селезенки мышей с опухолью (ALL) по сравнению с контрольными (CTRL) мышами (**a**) или ALL мышами, получавшими (IFN+ALL) или не получавшими (ALL) генную терапию IFN (**b**). Столбиковые диаграммы (правая панель) показывают GO-термины, обогащенные повышенными (зелеными) или пониженными (оранжевыми) генами из указанных сравнений. **c, d,** Избранные моментальные снимки РНК–Seq deregulированных генов в макрофагах мышей ALL (**c**) или ISG, индуцированные у IFN+ALL мышей (**d**). **e, f,** tSNE графики, включающие данные scРНК–Seq от 10821 CD11b⁺ клеток, отсортированных из селезенки CTRL или ALL мышей, обработанных или не обработанных генной терапией IFN. Кластеры, определенные транскрипцией, и связанные с ними типы (**e**) клеток обозначены цифрами и цветами в условных обозначениях. Данные одноклеточной РНК–Seq в клетках кластера 1 (неклассические моноциты), окрашенные в зависимости от условий эксперимента (**f**). **g,** термины GO, обогащенные в топ–100 генов (ранжированных по \log_2FC), повышенных (зеленый) или пониженных (оранжевый) в данных scРНК–Seq из кластера 1 (неклассические моноциты) в указанных сравнениях. **h,** Средняя экспрессия (\log трансформированные значения TPM, нормализованные по количеству клеток) в неклассических моноцитах выбранных генов для указанных условий. **i,** Анализ минимального остовного дерева (MST) данных scРНК–Seq из кластера 1 (неклассические моноциты) после субкластеризации. Каждый круг представляет подкластер и показывает его размер (количество клеток) и состав (условия эксперимента). Круги, отмеченные звездочками, представляют собой мелкие подгруппы с рассеянным составом.

Фигура 20. Генная терапия IFN усиливает активацию адаптивно перенесенных CAR19–трансдуцированных T–клеток и повышает выживаемость.

a, b, План эксперимента (**a**) и рост ALL во времени (**b**, конкретное число в PB;

среднее±SEM) в CTRL+CTRLT (n=5), IFN+CTRLT (n=5), CTRL+CART19 (n=7), IFN+CART19 (n=7). ****p<0,0001, непараметрический ранговый метод для продольных данных в факторных экспериментах. **с**, Процентное содержание (среднее±SEM) экспрессии Lag3 на клетках CD8+NGFR+CART19 в PB мышей из **(b)**. Длительно выжившие мыши показаны зеленым цветом. Каждая строка представляет одну мышь. **d, e**, План эксперимента **(d)** и рост ALL во времени **(e**, конкретное число в PB; среднее±SEM) в CTRL+CTRLT (n=7), IFN+CTRLT (n=6), CTRL+CART19 (n=7), IFN+CART19 (n=6), CTRL+iCART19 (n=7), IFN+iCART19 (n=6), IFN+CTRLT позднее (n=6, исследование с поздним вмешательством), IFN+iCART19 позднее (n=6, исследование с поздним вмешательством). ****p<0,0001, непараметрический ранговый метод для продольных данных в факторных экспериментах. Статистический анализ проводят для выбранных групп (см. дополнительные онлайн таблицы 9 и 10). **f**, Процент сверхурочной (среднее±SEM) экспрессии Lag3 на клетках CD8+NGFR+CART19 в PB мышей из **(b)**. Мыши CTRL+CART19 и CTRL+iCART19 нанесены на график вместе. Длительно выжившие мыши показаны зеленым цветом. Каждая строка представляет одну мышь. **g**, Кривая выживаемости мышей, обработанных клетками CART19 или iCART19 из **(b и e)**. CTRL мыши, обработанные CART19 и iCART19 на фигуре 20 **b, e** нанесены на график вместе (CTRL+i/CART19, n=21), IFN+CART19 (n=13), IFN+iCART19 (n=6), IFN+iCART19 позднее (n=6). ****p≤0,0001, критерий Мантеля–Хензеля, скорректированное значение p по методу Бонферрони.

Фигура 21. Сконструированный OVA–ALL показал повышенную иммуногенность по сравнению с исходным ALL.

Кривая выживания ALL–инъектированных CTRL (n=10, обработанных изотипным контрольным антителом), IFN (n=10, обработанных антителом изотипического контроля), CTRL+αCTLA4 (n=14) и IFN+αCTLA4 (n=13) мышей, **p<0,01, тест Мантеля–Хензеля.

Фигура 22. Объемный анализ РНК–Seq в макрофагах селезенки.

а, Ящичковые диаграммы, показывающие уровни экспрессии в указанных состояниях генов с повышенными (n=213) или пониженными (n=258) макрофагами от мышей ALL, получавших генную терапию IFN (IFN+ALL), по сравнению с контролями ALL. Числа представляют результаты знакового рангового теста Уилкоксона в указанных сравнениях. **б**, Тепловая карта корреляции между наборами данных РНК–Seq в макрофагах из указанных условий. Числа указывают рассчитанные коэффициенты определения (R²). Образцы упорядочены на основе неконтролируемой иерархической кластеризации.

Фигура 23. Идентификация типа клеток в данных scРНК–Seq из селезеночных CD11b⁺ клеток.

а, Графики tSNE, показывающие уровни экспрессии в отдельных клетках указанных сигнатур генов (GS). Неклассические моноциты: Cd300e, 1700011I03Rik, Tspan9, Dmpk, Fxyd2; классические моноциты: Ly6c2, Tarm, Tfec, Psrc1, Mmp8; нейтрофилы: Il1f9, Pglyrp4, Nlrp12, Mrgpra2b, Mmp8, Ltf, Amer2, Stfa2l1, Gm5483;

дендритные клетки: Adam23, Procr, Mab21l3, Sucnr1, Fndc5, Rnf186, Flt3, Cd207, Adam11, Apol7c, Htr7; макрофаги: Vcam1, Mertk, Actn1, Fcna, Crip2, Spic, Kcna2, Gfra2, Stab2, Jup; NK-клетки: Khdc1c, Khdc1b, Phactr3, Col8a2, Klra4, Adamts14, Gzma, Cma1, Gzmb, Clip4; Т-клетки: Cd3g, Cd3e, Bcl11b, Actn2, Camk4; В-клетки: Pax5, Cd79a, Cd19, Chst3, Scn4a, Casna1i, Ly6d, Klhl14, Mzb1. Цветовая шкала отражает среднюю экспрессию (log-трансформированный TPM) по генам в каждой сигнатуре. **b**, Тепловая карта, показывающая экспрессию (масштабированные log-трансформированные значения TPM) 20 лучших дискриминационных генов для каждого кластера. Выбранные характерные гены для каждого кластера показаны справа. Для каждого кластера показано до 200 отдельных клеток.

Фигура 24. Изменения, вызванные лейкемией и IFN в данных scPHK-Seq на клетках селезенки CD11b⁺.

Графики tSNE, показывающие данные scPHK-Seq из кластеров 2–11, окрашенные в зависимости от условий эксперимента.

Фигура 25. Субкластерный анализ данных scPHK-Seq из неклассических моноцитов и анализ экспрессии генов на CD4 Т-клетках.

a, Графики проточной цитометрии, показывающие клетки OVA-ALL (вверху) и OVA-специфические CD8 Т-клетки (внизу) в селезенке от 3 типичных ALL-инъектированных CTRL (CTRL+ALL), IFN без ответа (IFN+ALL NR) и IFN с ответом (IFN+ALL R) мышей. Клетки CD11b⁺ от этих мышей анализировали с помощью scPHK-seq. **b**, Графики tSNE, показывающие субкластер клеток в неклассической популяции моноцитов, окрашенных на основе кластеризации (верхний график) или экспериментальных условий (нижний график). Подкластеры, обведенные кружком, представляют собой второстепенные подкластеры с рассеянным составом и соответствуют тем, которые отмечены звездочками на фигуре 19i.

Фигура 26. Генная терапия IFN повышает активацию клеток CART19.

a, Схематическое представление двунаправленного LV (BdLV), используемого для трансдуцированных Т-клеток мыши, и процент экспрессии NGFR в нетрансдуцированных (UT) и трансдуцированных (CART19) CD4 и CD8 Т-клетках до инфузии мышам на фигуре 20b. **b**, Процент наивных (CD62L+CD44⁺), центральной памяти (CD62L+CD44⁺) и эффекторной памяти (CD62L-CD44⁺) UT или CART19 Т-клеток до инфузии мышам на фигуре 20b. **c**, Типичная проточная цитофлуориметрическая диаграмма выжившей IFN+CART19 мыши на фигуре 20b, показывающая аплазию В-клеток в PB. **d**, Процент сверхурочной (среднее±SEM) экспрессии PD1 на клетках CD8+NGFR+CART19 у мышей CTRL+CART19 (n=7) и IFN+CART19 (n=7). Длительно выжившие мыши показаны зеленым цветом. Каждая строка представляет одну мышь. **e**, **f**, Уровень (средняя интенсивность флуоресценции, MFI) экспрессии NGFR в течение времени на клетках CD4⁺ (**e**) и CD8⁺ (**f**) CART19 мышей из (**d**). Длительно выжившие мыши показаны зеленым цветом. Каждая точка представляет одну мышь.

Фигура 27. Генная терапия IFN повышает активацию клеток CART19.

a, Процент экспрессии NGFR в нетрансдуцированных (UT) и трансдуцированных (CART19) CD4 и CD8 T-клетках до инфузии мышам на фигуре **20e**. **b**, Процент наивных (CD62L+CD44+), центральной памяти (CD62L+CD44+) и эффекторной памяти (CD62L-CD44+) UT или CART19 T-клеток до инфузии мышам из фигуры **20e**. **c**, Конкретное число (среднее±SEM) CD4 (вверху) и CD8 (внизу) клеток NGFR+CART19 из CTRL+CART19 (n=7), IFN+CART19 (n=6), CTRL+iCART19 (n=7), IFN+iCART19 (n=6) и IFN+iCART19 позднее (n=6, исследование с поздним вмешательством) мышей. Длительно выжившие мыши показаны зеленым цветом. Каждая строка представляет одну мышь. **d**, Уровень (средняя интенсивность флуоресценции, MFI) экспрессии NGFR в течение времени на клетках CD4+ (вверху) и CD8+ (внизу) CART19 мышей из (c). Длительно выжившие мыши показаны зеленым цветом. Каждая точка представляет одну мышь.

Фигура 28

Структура конструкций NGFR контроля (вверху), Tig126/130a (в центре) и Tta126/130a (внизу)

Фигура 29

Оценка доставки IFN γ при лейкемическом росте и вызванной лейкемией микроокружении опухоли.

Фигура 30

Оценка одновременной доставки нескольких иммуностимулирующих цитокинов в микросреду лейкемии с использованием векторной цепи Tie2.

Фигура 31

Оценка синергизма между доставкой IFN γ на основе генной терапии с другими иммунотерапевтическими стратегиями, включая ингибиторы контрольных точек анти-CTLA-4 и анти-LAG-3, и ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), 1-метил-триптофан (1-MT).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

КЛЕТКИ

Стволовая клетка способна дифференцироваться во многие типы клеток. Клетка, которая способна дифференцироваться во все типы клеток, известна как тотипотент. У млекопитающих только зигота и ранние эмбриональные клетки являются тотипотентными. Стволовые клетки встречаются в большинстве, если не во всех многоклеточных организмах. Они характеризуются способностью обновляться посредством митотического деления клеток и дифференцироваться в широкий спектр специализированных типов клеток. Два широких типа стволовых клеток млекопитающих представляют собой эмбриональные стволовые клетки, которые выделены из внутренней клеточной массы бластоцист, и взрослые стволовые клетки, которые находятся во взрослых тканях. У развивающегося эмбриона стволовые клетки могут дифференцироваться во все специализированные эмбриональные ткани. У взрослых организмов стволовые клетки и клетки-предшественники действуют как система восстановления организма, пополняя специализированные клетки, а также поддерживая

нормальный обмен регенеративных органов, таких как кровь, кожа или кишечные ткани.

Гематопозитические стволовые клетки (HSC) являются мультипотентными стволовыми клетками, которые могут быть обнаружены, например, в периферической крови, костном мозге и пуповинной крови. HSC способны к самообновлению и дифференцировке в любую линию клеток крови. Они способны реколонизировать всю иммунную систему, а также эритроидные и миелоидные линии во всех кроветворных тканях (таких как костный мозг, селезенка и тимус). Они обеспечивают пожизненное производство всех линий кроветворных клеток.

Гематопозитические клетки–предшественники (ГПС) способны дифференцироваться в клетки определенного типа. Однако в отличие от стволовых клеток они уже более специфичны: они вынуждены дифференцироваться в свои «клетки–мишени». Разница между HSC и НРС заключается в том, что HSC могут реплицироваться бесконечно, тогда как НРС могут делиться только ограниченное количество раз.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение может использоваться смешанная популяция клеток, содержащая HSC и НРС (например, популяцию HSPC).

Дифференцированная клетка представляет собой клетку, которая стала более специализированной по сравнению со стволовыми клетками или клетками–предшественниками. Дифференциация происходит во время развития многоклеточного организма, когда организм переходит от одной зиготы к сложной системе тканей и типов клеток. Дифференциация также является распространенным процессом у взрослых: взрослые стволовые клетки делятся и создают полностью дифференцированные дочерние клетки во время восстановления тканей и нормального обмена клеток. Дифференциация резко меняет размер клетки, ее форму, мембранный потенциал, метаболическую активность и чувствительность к сигналам. Эти изменения в значительной степени обусловлены строго контролируемыми изменениями в экспрессии генов. Другими словами, дифференцированная клетка представляет собой клетку, которая имеет специфические структуры и выполняет определенные функции благодаря процессу развития, который включает активацию и дезактивацию определенных генов. При этом дифференцированная клетка включает дифференцированные клетки кроветворной линии, такие как моноциты, макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, эритроциты, мегакарициты/тромбоциты, дендритные клетки, Т–клетки, В–клетки и NK–клетки. Например, дифференцированные клетки кроветворной линии можно отличить от HSC и НРС путем обнаружения молекул клеточной поверхности, которые не экспрессируются или экспрессируются в меньшей степени на недифференцированных клетках (HSC и НРС). Примеры подходящих маркеров человеческой линии включают CD33, CD13, CD14, CD15 (миелоид), CD19, CD20, CD22, CD79a (В), CD36, CD71, CD235a (эритроид), CD2, CD3, CD4, CD8 (Т), CD56 (НК).

Источник клеток

В одном варианте осуществления HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированную клетку–предшественник, макрофаг или моноцит, используемые в настоящем изобретении,

получают из образца ткани.

Например, HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированную клетку–предшественник, макрофаг или моноцит могут быть получены из периферической крови взрослого и плода, пуповинной крови, костного мозга, печени или селезенки. Предпочтительно, эти клетки получают из периферической крови или костного мозга. Они могут быть получены после мобилизации клеток *in vivo* посредством обработки фактором роста.

Мобилизация HSC или НРС может быть осуществлена с использованием, например, G-CSF, плериксафора или их комбинаций. Другие агенты, такие как NSAID, лиганды CXCR2 (Grobeta) и ингибиторы дипептидилпептидазы, также могут быть использованы в качестве мобилизующих агентов.

Учитывая наличие факторов роста стволовых клеток GM-CSF и G-CSF, большинство процедур трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в настоящее время выполняется с использованием стволовых клеток, собранных из периферической крови, а не из костного мозга. Сбор стволовых клеток периферической крови обеспечивает больший трансплантат, не требует, чтобы донор подвергался общей анестезии для сбора трансплантата, приводит к более короткому времени приживания и может обеспечить более низкую частоту рецидивов в долгосрочной перспективе.

Костный мозг можно собирать стандартными методами аспирации (либо в стационарном режиме, либо после мобилизации), либо с использованием инструментов для сбора следующего поколения.

Кроме того, HSC также могут быть получены из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

Характеристики HSC

HSC обычно имеют низкий профиль прямого рассеяния и профиль бокового рассеяния с помощью проточной цитометрии. Некоторые из них метаболически неактивны, о чем свидетельствует мечение родамином, что позволяет определить активность митохондрий. HSC могут содержать определенные маркеры клеточной поверхности, такие как CD34, CD45, CD133, CD90 и CD49f. Их также можно определить как клетки, в которых отсутствует экспрессия маркеров клеточной поверхности CD38 и CD45RA. Однако экспрессия некоторых из этих маркеров зависит от стадии развития и тканеспецифического контекста HSC. Некоторые HSC, называемые «клетками боковой популяции», исключают краситель Hoechst 33342, обнаруживаемый методом проточной цитометрии. Таким образом, HSC имеют описательные характеристики, которые позволяют их идентифицировать и выделять.

Отрицательные маркеры

CD38 является наиболее общепринятым и используемым единственным отрицательным маркером для HSC человека.

Человеческие HSC также могут быть отрицательными в отношении маркеров линии, таких как CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD24, CD36, CD56, CD66b, CD271

и CD45RA. Однако эти маркеры, возможно, придется использовать в комбинации для обогащения HSC.

Под отрицательным маркером следует понимать, что человеческие HSC не имеют экспрессии этих маркеров.

Положительные маркеры

CD34 и CD133 являются наиболее используемыми положительными маркерами для HSC.

Некоторые HSC также являются положительными для маркеров линии, таких как CD90, CD49f и CD93. Однако эти маркеры, возможно, придется использовать в комбинации для обогащения HSC.

Под положительным маркером следует понимать, что человеческие HSC экспрессируют эти маркеры.

Соответственно, терапевтическая популяция клеток может представлять собой CD34⁺CD38⁻. Дальнейшее разделение может быть проведено для получения, например, CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺CD49f⁺ клеток.

Экспрессия микроРНК

Экспрессия микроРНК miR-126 и miR-130a в клетке указывает на то, что клетка представляет собой HSC или НРС. Более конкретно, экспрессия miR-126 указывает, что клетка представляет собой примитивную НРС. Экспрессия MiR-130a указывает на то, что клетка является более примитивной НРС.

ЦИТОКИНЫ

Цитокины представляют собой категорию небольших белков, обычно размером примерно 5–20 кДа, которые играют важную роль в системе клеточных сигналов. Цитокины могут включать интерфероны, хемокины, интерлейкины, лимфокины и факторы некроза опухолей, и они продуцируются широким спектром клеток, включая макрофаги, В-лимфоциты, Т-лимфоциты, тучные клетки, эндотелиальные клетки и фибробласты.

Цитокины действуют через рецепторы и играют особенно важную роль в иммунной системе, модулируя баланс между гуморальными и клеточными иммунными реакциями.

Цитокины включают интерфероны (IFN), IL-12 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

Интерфероны (IFN) представляют собой группу сигнальных белков, которые вырабатываются клетками-хозяевами в ответ на присутствие патогенов (например, вирусов, бактерий и паразитов) и опухолевых клеток.

IFN обычно делятся на три класса: тип I, тип II и тип III.

ИНТЕРФЕРОНЫ ТИПА I (IFN)

Интерфероны типа I (IFN) представляют собой класс цитокинов, продуцируемых иммунными клетками (лейкоцитами, например, НК-клетками, В-клетками, Т-клетками, макрофагами и т. д.). IFN типа I называют плейотропными цитокинами, поскольку они

могут оказывать специфическое действие IFN на несколько типов клеток.

В одном варианте осуществления IFN типа I представляет собой интерферон–альфа (IFN α). IFN α также известен как IFN–альфа, IFN α , INF α –1/13.

Примером аминокислотной последовательности IFN α является:

MALTFALLVALLVLSCKSSCSVGC_{DL}PQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKD
RHDFGFPQE_{EF}GNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQL
NDLEACVIQGVGV_TTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSF
SLSTNLQESLRSKE

(SEQ ID NO:6)

В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN типа I, кодирует белок IFN α , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6. В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN типа I, кодирует белок IFN α , включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% идентичности с SEQ ID NO:6, и где функциональность белка IFN α , имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID №:6, в основном сохраняется.

Примером нуклеотидной последовательности, кодирующей IFN α , является:

ATGGCCTTGACCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGTCTCAGCTGCAAGTC
AAGCTGCTCTGTGGGCTGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGA
CCTTGATGCTCCTGGCACAGATGAGGAGAATCTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACA
GACATGACTTTGGATTTCCCCAGGAGGAGTTTGGCAACCAGTTC_{AAA}AAGGCTGAA
ACCATCCCTGTCCTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAAG
GACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCTCCTAGACAAATTCTACACTGAACTCTAC
CAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGAGAC
TCCCCTGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATACTTCAAAGAATCAC
TCTCTATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTCTCAGAGCAG
AAATCATGAGATCTTTTCTTTGTCAACAACTTGCAAGAAAGTTTAAGAAGTAAGG
AATGA

(SEQ ID NO:7)

В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN α , содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:7. В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN α , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере

98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% идентичности с SEQ ID NO:7, где указанная нуклеотидная последовательность кодирует белок, имеющий по существу ту же функцию, что и белок SEQ ID NO:6.

В одном варианте осуществления IFN типа 1 представляет собой интерферон-бета (IFN β ; IFN β).

Примером аминокислотной последовательности IFN β является:

MTNKCLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLK
DRMNFDIPEEIKQLQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYH
QINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILR
NFYFINRLTGYLRLN

(SEQ ID NO:8)

В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN типа I, кодирует белок IFN β , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8. В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN типа I, кодирует белок IFN β , включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% идентичности с SEQ ID NO:8, и где функциональность белка IFN β , имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, в основном сохраняется.

Примером нуклеотидной последовательности, кодирующей IFN β , является:

gaatttcaggtcgtttgctttcctttgctttcctcccaagctgttttacattgcttttagtcattcactgaaactttaaaaaacattagaa
aacctcacagtttgtaaactttttccctattatataatataatagataggagcttaataaagagtttttagaaactactaaaatgtaaatgacatag
gaaaactgaaagggagaaagtgaagtggaattcctctgaatagagagaggaccatctcatataaataggccatacccacggagaaag
gacattctaactgcaacctttcgaagcctttgctctggcacaacaggtagtagggcactgttcgtgttgaacatgaccaacaagtgtctc
ctcaaattgctctcctgtgtgctttcactacagctctttccatgagctacaactgcttgattcctacaagaagcagcaattttcagtgctc
agaagctcctgtggcaattgaatgggaggctgaactgcctcaaggacaggatgaactttgacatccctgaggagattaagcagctgca
gcagttccagaaggaggacgccgattgaccatctatgagatgctccagaacatctttgctattttcagacaagattcatctagcactggctgg
aatgagactattgtgagaacctcctggctaagtctatcatcagataaacctctgaagacagctcctggaagaaaaactggagaaagaagat
ttcaccaggggaaaactcatgagcagctgacactgaaaagatattatgggaggattctgcattacctgaaggccaaggagtacagctactg
tgctggaccatagtcagagtggaatcctaaggaactttacttcattaacagacttacaggttacctccgaaactgaagatctcctagcctgt
gcctctgggactggacaattgctcaagcattctcaaccagcagatgctgttaagtactgactgatggctaagtactgcatatgaaaggacact
agaagattttgaaattttattaaattatgagttattttatttttaattttttggaaaataaattttttggtgcaaaagtcaacatggcagtttt
aatttcgatttgattatataaacctccatattataaaattgccaaagtacattagttgcttttttaaaatatacctgcaaagtagtatactttctggc
ccctgcctttaaggaaatttaaaattcaagaaagccatgatggaatataaggttaagagacaataaggggacctgaaccttatgggggaata
aatatggcatgaactgctgtgggattaaaagagaaaaggaagctggagggtctggaactaaacctgggggtccattctcctactgtgtgt
tccagattctctcatataaagttagaattgagctggccatcaggaatagccagaggaatgtcagctttgtgttccctaaccttccccagt
tattgggggatcactttgctcctcgaagatttttaataattatgtccccccaccatccctgcaagcttaagggtgagaagtccttacttc
catgacactattaagcagcaatctttattctgctcatcatgggacagccaagatgtgtgggtatcttaggggagctgtgggtcctgtctgct

ggcatggcacaggcatcagaggaagaagaacctttttataccctagccatctggtagttttctcctagttttcaaaaaactaagcctgcttcc
agtccccactgcctgttcatacagaattc

(SEQ ID NO:9)

В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN β , содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:9. В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN β , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% идентичности с SEQ ID NO:9, где указанная нуклеотидная последовательность кодирует белок, имеющий по существу ту же функцию, что и белок IFN β SEQ ID NO:8.

В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN типа I, оптимизирована по кодонам.

ИНТЕРФЕРОН ТИПА II– ИНТЕРФЕРОН– γ (IFN γ)

Интерферон– γ (IFN γ), также известный как иммунный интерферон, активируется интерлейкином–12 и играет важную роль в регуляции и активации иммунного ответа.

Примером аминокислотной последовательности IFN γ является:

MKYTSYILAFQLCIVLGLSLGCYQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLG
ILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLKFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRD
DFEKL TNYSVTDLNVQRKAIHEL IQVMAELSPA AKTGKRKRSQMLFRGRRASQ

(SEQ ID NO:12)

Аминокислоты 1–23 SEQ ID NO:12 могут действовать как сигнальный пептид и расщепляться с образованием зрелого белка, который представлен аминокислотами 24–161 SEQ ID NO:12. Примером зрелой аминокислотной последовательности IFN γ является:

QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYF
KLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRRDDFEKL TNYSVTDLNVQRKAIHEL
IQVMAELSPA AKTGKRKRSQMLFRGRRASQ

(SEQ ID NO:13)

В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN γ , кодирует белок IFN γ , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12 или 13. В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN γ , кодирует белок IFN γ , включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% идентичности с SEQ ID NO:12 или 13, и где функциональность белка IFN γ ,

имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12 или13, в основном сохраняется.

Еще одним примером аминокислотной последовательности IFN γ является:

MNATHCILALQLFLMAVSGCYCHGTVIESLESLNNYFNSSGIDVEEKSLFLDIWR
NWQKDGDMKILQSQIISFYLRRLFVLKDNQAISNNISVIESHLITFFSNSKAKKDAFMSI
AKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESSLRKRKRSRC

(SEQ ID NO:17)

В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN γ , кодирует белок IFN γ , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17. В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN γ , кодирует белок IFN γ , включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% идентичности с SEQ ID NO:17, и где функциональность белка IFN γ , имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, в основном сохраняется.

Примером нуклеотидной последовательности, кодирующей IFN γ , является:

ATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTTTCAGCTCTGCATCGTTTTGGGTCT
CTTGGCTGTTACTGCCAGGACCCATATGTAAAAGAAGCAGAAAACCTTAAGAAATA
TTTTAATGCAGGTCATTCAGATGTAGCGGATAATGGAACCTTTTTCTTAGGCATTTTG
AAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGACAGAAAAATAATGCAGAGCCAAATTGTCTCCTT
TACTTCAAACSTTTTTAAAAACTTTAAAGATGACCAGAGCATCCAAAAGAGTGTGGA
GACCATCAAGGAAGACATGAATGTCAAGTTTTTCAATAGCAACAAAAAGAAACGAG
ATGACTTCGAAAAGCTGACTAATTATTCGGTAACTGACTTGAATGTCCAACGCAAAG
CAATACATGAACTCATCCAAGTGATGGCTGAACTGTCGCCAGCAGCTAAAACAGGG
AAGCGAAAAAGGAGTCAGATGCTGTTTCGAGGTCGAAGAGCATCCCAGTAA

(SEQ ID NO:14)

Примером нуклеотидной последовательности, кодирующей зрелую форму IFN γ , является:

CAGGACCCATATGTAAAAGAAGCAGAAAACCTTAAGAAATATTTAATGCAG
GTCATTCAGATGTAGCGGATAATGGAACCTTTTTCTTAGGCATTTTGAAGAATTGGA
AAGAGGAGAGTGACAGAAAAATAATGCAGAGCCAAATTGTCTCCTTTTACTTCAA
STTTTTAAAAACTTTAAAGATGACCAGAGCATCCAAAAGAGTGTGGAGACCATCAA
GGAAGACATGAATGTCAAGTTTTTCAATAGCAACAAAAAGAAACGAGATGACTTCG
AAAAGCTGACTAATTATTCGGTAACTGACTTGAATGTCCAACGCAAAGCAATACAT
GAACTCATCCAAGTGATGGCTGAACTGTCGCCAGCAGCTAAAACAGGGAAGCGAAA
AAGGAGTCAGATGCTGTTTCGAGGT

(SEQ ID NO:15)

Дополнительным примером нуклеотидной последовательности, кодирующей IFN γ ,

является:

ATGAACGCTACACACTGCATCTTGGCTTTGCAGCTCTTCCTCATGGCTGTTTC
TGGCTGTTACTGCCACGGCACAGTCATTGAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAACTATTT
TAACTCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAAAAGAGTCTCTTCTTGGATATCTGGAGGA
ACTGGCAAAAAGGATGGTGACATGAAAATCCTGCAGAGCCAGATTATCTCTTTCTACC
TCAGACTCTTTGAAGTCTTGAAAGACAATCAGGCCATCAGCAACAACATAAGCGTC
ATTGAATCACACCTGATTACTACCTTCTTCAGCAACAGCAAGGCGAAAAAGGATGC
ATTCATGAGTATTGCCAAGTTTGAGGTCAACAACCCACAGGTCCAGCGCCAAGCATT
CAATGAGCTCATCCGAGTGGTCCACCAGCTGTTGCCGGAATCCAGCCTCAGGAAGC
GGAAAAGGAGTCGCTGCTGA

(SEQ ID NO:16)

В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN γ , содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:14, 15 или 16. В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN γ , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% идентичности с SEQ ID NO:14, 15 или 16, где указанная нуклеотидная последовательность кодирует белок, имеющий по существу ту же функцию, что и белок SEQ ID NO:12 или 13.

Дополнительным примером нуклеотидной последовательности, кодирующей IFN γ , является:

ATGAACGCTACACACTGCATCTTGGCTTTGCAGCTCTTCCTCATGGCTGTTTC
TGGCTGTTACTGCCACGGCACAGTCATTGAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAACTATTT
TAACTCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAAAAGAGTCTCTTCTTGGATATCTGGAGGA
ACTGGCAAAAAGGATGGTGACATGAAAATCCTGCAGAGCCAGATTATCTCTTTCTACC
TCAGACTCTTTGAAGTCTTGAAAGACAATCAGGCCATCAGCAACAACATAAGCGTC
ATTGAATCACACCTGATTACTACCTTCTTCAGCAACAGCAAGGCGAAAAAGGATGC
ATTCATGAGTATTGCCAAGTTTGAGGTCAACAACCCACAGGTCCAGCGCCAAGCATT
CAATGAGCTCATCCGAGTGGTCCACCAGCTGTTGCCGGAATCCAGCCTCAGGAAGC
GGAAAAGGAGTCGCTGCTGA

(SEQ ID NO:18)

В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN γ , содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:18. В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN γ , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по

меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% идентичности с SEQ ID NO:18, где указанная нуклеотидная последовательность кодирует белок, имеющий по существу ту же функцию, что и белок SEQ ID NO:17.

В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая IFN γ , оптимизирована по кодонам.

ФАКТОР НЕКРОЗА ОПУХОЛИ α (TNF α)

Фактор некроза опухоли α (TNF α) представляет собой цитокин, который участвует в системном воспалении. Его основная роль заключается в регуляции иммунных клеток.

TNF α в основном продуцируется активированными макрофагами, но также продуцируется другими типами клеток, такими как CD4⁺ лимфоциты, NK-клетки, нейтрофилы, тучные клетки, эозинофилы и нейроны.

Примером аминокислотной последовательности TNF α является:

MSTESMIRDVELAEEALPQKMGGFQNSRRCLCLSLFSFLLVAGATTLFCLLNFGV
IGPQRDEKFPNGLPLISSMAQTLTLRSSSQNSSDKPVAHVVANHQVEEQLEWLSQRANA
LLANGMDLKDNQLVVPADGLYLVYSQVLFKQGQCPDYVLLTHTVSRFAISYQEKVNLL
SAVKSPCPKDTPEGAELKPWYEPIYLGGVFQLEKGDQLSAEVNLPKYLDFAESGQVYFG
VIAL

(SEQ ID NO:19)

В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая TNF α , кодирует белок TNF α , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19. В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая TNF α , кодирует белок TNF α , включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% идентичности с SEQ ID NO:19, и где функциональность белка TNF α , имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, в основном сохраняется.

Примером нуклеотидной последовательности, кодирующей TNF α , является:

ATGAGCACAGAAAGCATGATCCGCGACGTGGAACCTGGCAGAAGAGGCACTC
CCCCAAAAGATGGGGGGCTTCCAGAACTCCAGGCGGTGCCTATGTCTCAGCCTCTTC
TCATTCCTGCTTGTGGCAGGGGCCACCACGCTCTTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTG
ATCGGTCCCCAAAGGGATGAGAAGTTCCCAAATGGCCTCCCTCTCATCAGTTCTATG
GCCAGACCCTCACACTCAGATCATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAAGCCTGTAGCC
CACGTCGTAGCAAACCACCAAGTGGAGGAGCAGCTGGAGTGGCTGAGCCAGCGCGC
CAACGCCCTCCTGGCCAACGGCATGGATCTCAAAGACAACCAACTAGTGGTGCCAG
CCGATGGGTTGTACCTTGTCTACTCCCAGGTTCTTCAAGGGACAAGGCTGCCCCG
ACTACGTGCTCCTCACCCACACCGTCAGCCGATTTGCTATCTCATACCAGGAGAAAG

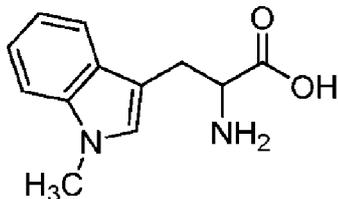
TCAACCTCCTCTCTGCCGTCAAGAGCCCCTGCCCAAGGACACCCCTGAGGGGGCTG
 AGCTCAAACCCTGGTATGAGCCCATATACCTGGGAGGAGTCTTCCAGCTGGAGAAG
 GGGGACCAACTCAGCGCTGAGGTCAATCTGCCCAAGTACTTAGACTTTGCGGAGTCC
 GGGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGCTCTG

(SEQ ID NO:20)

В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая TNF α , содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:20. В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая TNF α , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% идентичности с SEQ ID NO:20, где указанная нуклеотидная последовательность кодирует белок, имеющий по существу ту же функцию, что и белок SEQ ID NO:19.

1-МЕТИЛ-ТРИПТОФАН (1-МТ)

1-Метилтриптофан (1-МТ) является ингибитором триптофан катаболического фермента индоламина 2,3-диоксигеназы (IDO) и имеет структуру:



1-МТ по настоящему изобретению может присутствовать в виде соли или сложного эфира, в частности, фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира.

В одном варианте осуществления 1-МТ представляет собой D-1-МТ. В одном варианте осуществления 1-МТ представляет собой L-1-МТ. В одном варианте осуществления 1-МТ представляет собой рацемическую смесь.

Фармацевтически приемлемые соли агентов по изобретению включают подходящие соли присоединения кислоты или основания. Обзор подходящих фармацевтических солей можно найти в Berge et al. (1977) J Pharm Sci 66: 1-19.

Изобретение также включает, где необходимо, все энантиомеры и таутомеры агентов. Специалист в данной области определит соединения, которые обладают оптическими свойствами (например, одним или несколькими хиральными атомами углерода) или таутомерными характеристиками. Соответствующие энантиомеры и/или таутомеры могут быть выделены/получены способами, известными в данной области.

ЦЕЛЕВАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ-МИШЕНЬ МИКРО РНК

Гены микроРНК размещены по всем хромосомам человека, кроме Y-хромосомы. Они могут находиться либо в некодирующих областях генома, либо в интронах генов,

кодирующих белки. Около 50% микроРНК появляются в кластерах, которые транскрибируются как полицистронные первичные транскрипты. Подобно генам, кодирующим белок, микроРНК обычно транскрибируются с промоторов полимеразы-II, генерируя так называемый первичный транскрипт микроРНК (pri-микроРНК). Затем этот pri-микроРНК обрабатывается серией стадий эндонуклеолитического расщепления, выполняемых двумя ферментами, принадлежащими к семейству РНКаз типа III, Drosha и Dicer. Из pri-микроРНК створовая петля длиной около 60 нуклеотидов, называемая предшественником микроРНК (pre-микроРНК), иссекается специфическим ядерным комплексом, состоящим из гена критической области синдрома Дроша и ДиДжорджа (DGCR8), который обрезает обе цепи около основания первичной створовой петли и оставляет 5'фосфат и 2 bp в длину, 3' липкий конец ДНК. pre-микроРНК затем активно транспортируется из ядра в цитоплазму с помощью RAN-GTP и Exportin. Затем Dicer выполняет двунитевой разрез на конце стеблевой петли, не определяемой разрезом Дроша, генерируя дуплекс 19–24 bp, который состоит из зрелой микроРНК и противоположной нити дуплекса, называемой микроРНК*. В соответствии с правилом термодинамической асимметрии, только одна цепь дуплекса селективно загружается в индуцированный РНК комплекс сайленсинга (RISC) и накапливается в виде зрелой микроРНК. Эта цепь обычно является той, у которой 5'-конец менее плотно спарен с его комплементом, что было продемонстрировано однонуклеотидными несоответствиями, введенными в 5'-конец каждой цепи дуплексов микроРНК. Однако есть некоторые микроРНК, которые поддерживают накопление обеих дуплексных нитей в одинаковой степени.

МикроРНК запускают РНКi, очень похожие на малые интерферирующие РНК (миРНК), которые широко используются для экспериментального нокдауна генов. Основное различие между микроРНК и миРНК заключается в их биогенезе. После загрузки в RISC направляющая цепь малой молекулы РНК взаимодействует с последовательностями-мишенями мРНК, которые преимущественно находятся в 3'-нетранслируемой области (3'UTR) генов, кодирующих белок. Было показано, что нуклеотиды 2–8, подсчитанные от 5'-конца микроРНК, так называемая порождающая последовательность, необходимы для запуска РНКi. Если вся последовательность направляющей цепи идеально комплементарна мРНК-мишени, как это обычно имеет место в случае миРНК и микроРНК растений, мРНК эндонуклеолитически расщепляется с участием белка Argonaute (Ago), также называемого «слайсер» малого дуплекса РНК в индуцированном РНК комплексе сайленсинга (RISC). DGRC (ген критической области синдрома DiGeorge 8) и TRBP (TAR (HIV) РНК-связывающий белок 2) представляют собой двухцепочечные РНК-связывающие белки, которые способствуют биогенезу зрелой микроРНК ферментами Drosha и Dicer RNase III, соответственно. Направляющая цепь дуплекса микроРНК включается в эффекторный комплекс RISC, который распознает специфические мишени посредством несовершенного спаривания оснований и индуцирует посттранскрипционный сайленсинг гена. Для этого способа регуляции было

предложено несколько механизмов: микроРНК могут индуцировать репрессию инициации трансляции, маркировать мРНК–мишени для деградации путем деаденилирования или изолировать мишени в Р–теле цитоплазмы.

С другой стороны, если только порождающая последовательность идеально дополняет мРНК–мишень, но оставшиеся основания демонстрируют неполное спаривание, РНКі действует через множество механизмов, ведущих к трансляционной репрессии. Эукариотическая деградация мРНК в основном происходит за счет укорочения конца polyA на 3′–конце мРНК и расщепления на 5′–конце с последующим расщеплением 5′–3′–экзонуклеазой и накоплением микроРНК в отдельных цитоплазматических областях, так называемые Р–тела, обогащенные компонентами механизма распада мРНК.

Согласно настоящему изобретению экспрессия цитокина, такого как IFN типа 1, регулируется эндогенными микроРНК с использованием соответствующих последовательностей–мишеней микроРНК. Используя этот метод, микроРНК, эндогенно экспрессируемая в клетке, предотвращает или уменьшает экспрессию трансгена в этой клетке путем связывания с соответствующей последовательностью–мишенью микроРНК, расположенной в векторе или полинуклеотиде. Это имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием тканеспецифичных промоторов, не в последнюю очередь тот факт, что тканеспецифичные промоторы часто связаны с негерметичной экспрессией во фракции клеток, не являющихся мишенью.

Последовательности–мишени микроРНК, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, представляют собой последовательности–мишени микроРНК, которые экспрессируются в HSC, но которые не экспрессируются широко в дифференцированных клетках, например, миелоидных клетках (включая макрофаги, инфильтрирующие опухоль). Это особенно важно, поскольку известно, что экспрессия IFN α токсична для HSC.

Предпочтительными примерами последовательностей–мишеней микроРНК для применения в изобретении являются mir–130a и mir–126.

Связывание микроРНК mir–126 с последовательностью–мишенью mir–126 наиболее эффективно блокирует экспрессию в HSC и в клетках эритроидной линии. Таким образом, последовательность–мишень mir–126 особенно подходит для применений в генной терапии, основанной на надежной экспрессии трансгена в миелоидной и лимфоидной линии.

микроРНК mir–126 может иметь нуклеотидную последовательность: UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG (SEQ ID NO:1).

В одном варианте осуществления последовательность–мишень mir–126 содержит нуклеотидную последовательность GCATTATTACTCACGGTACGA (SEQ ID NO:2).

В одном варианте осуществления вектор или полинуклеотид, используемый в настоящем изобретении, содержит, по меньшей мере, одну, по меньшей мере, две или, по меньшей мере, три копии нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2. В

предпочтительном варианте осуществления последовательность–мишень mir-126 содержит две копии нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

В одном варианте осуществления HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит, используемые в настоящем изобретении, содержат по меньшей мере одну, по меньшей мере две или по меньшей мере три копии нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2. В предпочтительном варианте осуществления последовательность–мишень mir-126 содержит две копии нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

Копии последовательностей–мишеней 126 могут быть разделены спейсерной последовательностью. Спейсерная последовательность может содержать по меньшей мере одно, по меньшей мере два, по меньшей мере три или по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять нуклеотидных оснований.

Связывание микроРНК mir-130a с последовательностью–мишенью mir-130a наиболее эффективно блокирует экспрессию в HSC и в клетках эритроидной линии (аналогично miR-126). Таким образом, последовательность–мишень mir-130a особенно подходит для применений в генной терапии, основанной на надежной экспрессии трансгена в миелоидной и лимфоидной линии.

микроРНК mir-130a может иметь нуклеотидную последовательность: CAGUGCAAUGUAAAAGGGCAU (SEQ ID NO:3).

В одном варианте осуществления последовательность–мишень mir-130a содержит нуклеотидную последовательность ATGCCCTTTTAACATTGCACTG (SEQ ID NO:4).

В одном варианте осуществления последовательность–мишень mir-130a содержит по меньшей мере одну, по меньшей мере две или по меньшей мере три копии нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:4. В предпочтительном варианте осуществления последовательность–мишень mir-130a содержит две копии нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:4.

Копии целевых последовательностей mir-130a могут быть разделены спейсерной последовательностью. Спейсерная последовательность может содержать по меньшей мере одно, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять нуклеотидных оснований.

В одном варианте осуществления вектор содержит две копии целевой последовательности mir-126 и две копии целевой последовательности mir-130a.

В одном варианте осуществления две копии последовательности–мишени mir-126 и две копии последовательности–мишени mir-130a содержатся в нуклеотидной последовательности:

**GCATTATTACTCACGGTACGACGATGCATTATTACTCACGGTACGAACGC
GTATGCCCTTTTAACATTGCACTGATGCATATGCCCTTTTAACATTGCACTG**
(SEQ ID NO:5).

Комбинированная целевая последовательность, например, целевая последовательность, содержащая две копии целевой последовательности mir-126 и две

копии целевой последовательности miR-130a, является особенно предпочтительной для использования в настоящем изобретении, поскольку использование этой комбинации максимизирует репрессию вектора в HSC и экспрессию в миелоидном потомстве.

Кроме того, при использовании комбинации–мишени подавление трансгена в HSC обеспечивается двумя независимыми микроРНК, и риск вмешательства в эндогенную регуляцию микроРНК снижается, что повышает безопасность и эффективность последовательности–мишени.

ВЕКТОР

Вектор представляет собой инструмент, который позволяет или облегчает перенос объекта из одной среды в другую. В соответствии с настоящим изобретением и в качестве примера, некоторые векторы, используемые в технологиях рекомбинантных нуклеиновых кислот, позволяют переносить объекты, такие как сегмент нуклеиновой кислоты (например, гетерологичный сегмент ДНК, такой как гетерологичный сегмент С_дна), в клетку–мишень. Вектор может служить для поддержания гетерологичной нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) внутри клетки, облегчения репликации вектора, содержащего сегмент нуклеиновой кислоты, или облегчения экспрессии белка, кодируемого сегментом нуклеиновой кислоты. Векторы могут быть не вирусными или вирусными. Примеры векторов, используемых в технологиях рекомбинантных нуклеиновых кислот, включают, но не ограничиваются ими, плазмиды, хромосомы, искусственные хромосомы и вирусы. Вектором также может быть, например, простая нуклеиновая кислота (например, ДНК). В своей простейшей форме вектор может представлять собой интересующий нуклеотид.

Векторы, используемые в изобретении, могут быть, например, плазмидными или вирусными векторами и могут включать в себя промотор для экспрессии полинуклеотида и, необязательно, регулятор промотора. В предпочтительном варианте осуществления вектор представляет собой вирусный вектор.

Векторы, содержащие полинуклеотиды, используемые в изобретении, могут быть введены в клетки с использованием различных методик, известных в данной области, таких как трансформация, трансфекция и трансдукция. В данной области известно несколько методик, например, трансдукция рекомбинантными вирусными векторами, такими как ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные, аденоассоциированные вирусные, бакуловирусные и вирус простого герпеса, векторы Sleeping Beauty; прямая инъекция нуклеиновых кислот и биолистическая трансформация.

Невирусные системы доставки включают, но не ограничиваются ими, способы трансфекции ДНК. В данной работе трансфекция включает процесс с использованием невирусного вектора для доставки гена в клетку–мишень. Типичные способы трансфекции включают электропорацию, биолистику ДНК, липид–опосредованную трансфекцию, компактную ДНК–опосредованную трансфекцию, липосомы, иммунолипосомы, липофектин, опосредованную катионными агентами трансфекцию, катионные амфилилы лица (CFA) (Nature Biotechnology 1996 14; 556) и их комбинации.

Термин «трансфекция» следует понимать как охватывающий доставку

полинуклеотидов в клетки посредством как вирусной, так и невирусной доставки.

Кроме того, изобретение может использовать протоколы направленного воздействия на гены, например, доставку ДНК–модифицирующих агентов.

Вирусные системы доставки включают, но не ограничиваются ими, аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор, вектор вируса герпеса, ретровирусный вектор, лентивирусный вектор и бакуловирусный вектор.

Ретровирусы представляют собой РНК–вирусы с жизненным циклом, отличным от жизненного цикла литических вирусов. В этом отношении ретровирус представляет собой инфекционную сущность, которая реплицируется через промежуточную ДНК. Когда ретровирус заражает клетку, ее геном превращается в форму ДНК с помощью фермента обратной транскриптазы. Копия ДНК служит шаблоном для производства новых геномов РНК и кодируемых вирусом белков, необходимых для сборки инфекционных вирусных частиц.

Существует множество ретровирусов, например, вирус мышинной лейкемии (MLV), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус инфекционной анемии лошади (EIAV), вирус опухоли молочной железы мыши (MMTV), вирус саркомы Рауса (RSV), вирус саркомы Фуджинами (FuSV), вирус мышинового лейкоза Молони (Mo–MLV), вирус мышинной остеосаркомы FBR (FBR MSV), вирус мышинной саркомы Молони (Mo–MSV), вирус мышинового лейкоза Абельсона (A–MLV), вирус птичьего миелоцитоматоза–29 (MC29) и вирус птичьего эритробластоза (AEV) и все другие ретровиридии, включая лентивирусы.

Подробный перечень ретровирусов можно найти у Coffin *et al.* Coffin *et al* («Retroviruses» 1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 758–763).

Лентивирусы также принадлежат к семейству ретровирусов, но они могут инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки (Lewis *et al.* (1992) EMBO J. 3053–3058).

В одном варианте осуществления вектор представляет собой лентивирусный вектор.

ПРОМОТОР

В одном варианте осуществления вектор содержит тканеспецифичный промотор. Предпочтительно, тканеспецифичный промотор вызывает специфическую экспрессию в подмножестве инфильтрующих опухоль миелоидных клеток, таких как моноциты, экспрессирующие Tie2, (TEM) или M2–поляризованные макрофаги.

В предпочтительном варианте осуществления тканеспецифичным промотором является промотор ТЕК (Tie2).

Примером нуклеотидной последовательности промотора ТЕК является:

```
gatcacgagactagcctcgagtcacacctgcaactggaaacattaattggttctaagatcatcatcgacgtgataaacctggg
acagaattagtcaagactagctgcattctctctggtggtaggaaaaggaggagtataatgatttctcaggcatgaaggtcgat
gatgagcaaaagtgtatactctctaattcattcgcataattcatattgtggagtaattatctggataagtgtagggtctctgacctcattctagatatt
```

gtacattccatggctattttcattttgggtccatgaactctctttgctctcatgagcaccattttatcccaatctaactctgtatgtttgtttttacaca
gattagtttttaaatgttatataataatgtcttctgaaacaccattgctcaatgactaccaaatctttctcattacaaaatccttctatgccaaacttctt
caagaaattgatcaccttttagatgaattgtaataaaaatgaaagctatagccggcaacatgggtatctttgggctaagggccaaccaacagg
ccatctgtgtgaaagaaaacaggctaacaatgggactctggctcttggggctacattgagcattgacctcaccgggtgctcactgaaattaat
tgcttttcagggtgtattttctcatcacggaaaccttcttctcccaattcaaacatgtgggttaaaatgagaaaaaaaagccaaaacggcttcc
cacacccaaaagctccttctgtcagagatcccagtagccccgggagagctgttagaagtctgagaaggattggatcatcatgcataccatac
ataggtggagggtgttatttctcagtttcccgcctatgagaggatacccctattgtttctgaaaatgctgaccgggaccacacttccaaca
aatctctctgcccctacagcagcagcaaaagcagcagcagaagcaacagcaacagataagtgtttgatgaattgagatggataggg
cttgagtccccagcctgtgataccaatgcctttaagatacagccttccatcctaatactaaaagaaacaggaaaaaggaacttaa
aactcctgtgctcagacagaaatgagactgttacagcctgcttctgtgctgttcttctgctcctaactgtaaacaagacgtagtaggacga
tgctaattgaaagtcacaaaccgtgggttttgaaaggatcctagactcgagcggccgcca

(SEQ ID NO:10)

В одном варианте осуществления промотор ТЕК содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:10. В одном варианте осуществления промотор ТЕК содержит нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5% идентичности с SEQ ID NO:10.

Промотор ТЕК (Tie2) можно комбинировать с последовательностью–мишенью mir-126 и/или последовательностью–мишенью mir-130a. Это обеспечивает специфическую экспрессию транскрипта в подмножестве инфильтрирующих опухоль миелоидных клеток, например, инфильтрирующих опухоль макрофагов.

В одном варианте осуществления вектор может дополнительно содержать последовательность энхансера ТЕК (Tie2).

Пример последовательности энхансера ТЕК (Tie2):

cttcagacctggaggaggagatagaggaccaattgtggccagacgattcctaactcgtgttacacctgcagaatgagtttag
atctagctgtgaccttccccagccccaccaccattgtcccctgtgtgcttccaggaatctgatcattcttctctctgctccttccaaagg
ctgcaggagcagggtgtgaagacgtggatgtccagatgcagagctctgacactttcaacacatctgcatattagaggaagtacataccatt
gcttgggtgtttcatgtctaattgtggtatgagtggtgacaaagagagggagaaaattggactagccaaagaagccagtcaggcgtgggggtt
gaagggcatcgtgggcggctgtcatttgctctctgctgtcacagcccctgcccagggtgaccagtgaggtgtatgtgctgtgtcacacc
atctcagcagatctgtcagcttccccgctttgttaaagggtgatcatgcttctggggggagcactggaagacaatgctcggccacttctc
ccagatacaataggcggagtcaggaaggcagattgacattgctggggctggggaggcactcactgctctgcccgtcagatgggtgaac
cagctaaccttggcacacaggcctgggtgtgcaaggcgtctggctgcagagccaaaggggactccacctggggacaggagtgtt
agacatctgggaatctgggatgggttcaaattctgatccctgtgtcagaacaaccacaaaacaataagagtaccagtaatacaaaaatg
actaccctagggtgaatgcctttatgtccaagtgtcaattg

(SEQ ID NO:11)

В одном варианте осуществления последовательность энхансера ТЕК содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:11. В одном варианте осуществления

энхансер ТЕК содержит нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5% идентичности с SEQ ID NO:11.

ОПТИМИЗАЦИЯ КОДОНОВ

Полинуклеотиды, используемые в настоящем изобретении, могут быть оптимизированы по кодонам. Оптимизация кодонов ранее была описана в WO 1999/41397 и WO 2001/79518. Разные клетки различаются использованием определенных кодонов. Это предпочтение кодонов соответствует предпочтению в относительном избытии определенных tРНК в типе клеток. Изменяя кодоны в последовательности так, чтобы они были адаптированы к относительному количеству соответствующих tРНК, можно увеличить экспрессию. Аналогичным образом, можно уменьшить экспрессию путем преднамеренного выбора кодонов, для которых известно, что соответствующие tРНК редки в конкретном типе клеток. Таким образом, доступна дополнительная степень контроля на уровне трансляции.

Многие вирусы, включая ВИЧ и другие лентивирусы, используют большое количество редких кодонов, и, изменяя их в соответствии с обычно используемыми кодонами млекопитающих, можно добиться повышенной экспрессии компонентов упаковки в клетках–продуцентах млекопитающих. Таблицы использования кодонов известны в данной области для клеток млекопитающих, а также для ряда других организмов.

Оптимизация кодонов может также включать удаление мотивов нестабильности мРНК и скрытых участков скрытого сплайсинга.

ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫЙ АНТИГЕН (ТАА)

Как используется в настоящем документе, термин «опухолеассоциированный антиген» (ТАА; также известный как опухолевый антиген) относится к антигенной молекуле, экспрессируемой злокачественной клеткой, например опухолевой клеткой. ТАА может распознаваться иммунной клеткой, которая экспрессирует иммунный рецептор (например, TCR, трансгенный TCR или CAR), который способен специфически связываться с частью (например, эпитопом) молекулы ТАА.

Как используется в настоящем документе, термин «ТАА–специфическая Т–клетка» относится к Т–клетке, которая экспрессирует TCR или CAR, специфичную для ТАА.

Т–клетка, экспрессирующая ТАА–специфический TCR или ТАА–специфический CAR, может быть способна специфически нацеливаться и убивать опухолевые клетки, экспрессирующие ТАА. ТАА–специфический TCR может представлять собой трансгенный TCR.

В одном варианте осуществления ТАА–специфическая Т–клетка не может быть

генетически модифицирована. Т-клетки могут быть природно индуцированными опухолеспецифическими Т-клетками. Например, Т-клетки, используемые в настоящем изобретении, могут распространяться от опухоли или лимфатического узла.

Конкретный ТАА может экспрессироваться при высокой относительной распространенности в опухолевых клетках определенного типа по сравнению с неопухолевыми клетками (например, здоровыми клетками).

Примеры ТАА включают карциноэмбриональный антиген (CEA), рецептор эстрогена, рецептор прогестерона, ephrinB2, ROR1, мезотелин, c-Met, GD-2 и MAGE A3 TCR, 4-1BB, антиген аденокарциномы, альфа-фетопротеин, BAFF, клетку В-лимфомы, антиген C242, карбоангидразу 9 (CA-IX), CCR4, CD152, CD200, CD22, CD19, CD22, CD123, CD221, CD23 (IgE receptor), CD28, CD4, CD40, CD44, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CS-1, CNT0888, CTLA-4, DR5, EpCAM, CD3, дополнительный домен фибронектина-B, рецептор фолата 1, гликопротеин 75, GPNMB, HGF, рецептор-киназы фактор роста гепатоцитов человека, рецептор IGF-1, IGF-I, IgG1, L1-CAM, IL-13, IL-6, рецептор инсулиноподобного фактора роста I, интегрин $\alpha 5\beta 1$, интегрин $\alpha \nu\beta 3$, MORAb-009, MS4A1, муцин CanAg, N-гликолилнейраминую кислоту, NPC-1C, PDGF-R α , PDL192, фосфатидилсерин, клетки карциномы предстательной железы, RANKL, RON, SCH1105 S5 9005, тенасцин C, TGF бета 2, TGF- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевый антиген СТАА16.88, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2, виментин, 5T4, CD5, CD19, CD20, CD21, CD25, CD37, CD30, CD33, CD45, CAMPATH-1 (CDw52), HLA-DR, антиидиотип, TAG-72, Ep-CAM, MUC1, фолат-связывающий белок, A33, G250, простатический специфический мембранный антиген (PSMA), простатический специфический антиген (PSA), ферритин, ганглиозиды (например, GD2, GD3, GM2), Le^y, CA-125, CA19-9, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), p185HER2, рецептор IL-2, de2-7 EGFR, белок активации фибробластов (FAP), тенасцин, металлопротеиназы, эндосиалин, карбоаноангидразу, галектин 9, альдолазу А, eIF γ 4, тирозиназу, галектин 4, HERKV-K10, p53, NY-LU-12, рестин, NY-CO-38, MAGE-1, MAGE-4a, SSX2, NY-ESO-1, SCP-1, 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, b-катенин/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27m, CDK4/m, CT, Cyp-B, DAM-6 (MAGE-B2) и DAM-10 (MAGE-B1), ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT (hTRT), iCE, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/мелан-А, MC1R, миозин/m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-A, NY-ESO-1, P15, p190 минорный bcr-abl, Pml/RAR α , PRAME, RAGE, RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-3, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, белок 1, gp75, TRP-2, TRP-2/INT2 или WT1.

Дополнительные ТАА могут быть идентифицированы с использованием методов, известных в данной области техники – см., например, обзорную статью Zilberberg et al. 2015 (Biology of Blood and Marrow Transplantation, Volume 21, Issue 6, June 2015, Pages 1000–1007), содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Т-КЛЕТКИ

Как используется в настоящем документе, термин «Т–клетки» может относиться к CD8⁺ Т–клеткам, CD4⁺ Т–клеткам, наивным Т–клеткам, стволовым Т–клеткам памяти, центральным Т–клеткам памяти, дважды негативным Т–клеткам, эффекторным Т–клеткам памяти, эффекторным Т–клеткам, Th0 клеткам, Tc0 клеткам, Th1 клеткам, Tc1 клеткам, Th2 клеткам, Tc2 клеткам, Th17 клеткам, Th22 клеткам, гамма/дельта Т–клеткам.

Т–клетка, используемая в настоящем изобретении, может использоваться для адоптивного переноса Т–клетки. Настоящее изобретение также охватывает адоптивный перенос противоопухолевых эффекторных лимфоцитов (TIL) и/или инфильтрирующих костный мозг лимфоцитов (MIL).

Как используется в настоящем документе, термин «адоптивный перенос Т–клеток» относится к введению популяции Т–клеток пациенту. Т–клетка может быть выделена из индивида, а затем генетически модифицирована и культивирована *in vitro* (*ex vivo*) для экспрессии TAA–специфического TCR или CAR перед введением пациенту.

Адоптивный перенос клеток может быть аллогенным или аутологичным.

Под «переносом аутологичных клеток» следует понимать, что исходную популяцию клеток получают от того же индивида, которому вводится трансдуцированная популяция Т–клеток. Аутологичный перенос является предпочтительным, поскольку он позволяет избежать проблем, связанных с иммунологической несовместимостью, и доступен индивидам независимо от наличия генетически подобранного донора.

Под «переносом аллогенных клеток» следует понимать, что исходная популяция клеток получена от другого индивида, чем тот, которому вводится популяция трансдуцированных клеток. Предпочтительно, чтобы донор был генетически подобран субъекту, которому вводят клетки, чтобы минимизировать риск иммунологической несовместимости. Альтернативно, донор может не соответствовать и не иметь отношения к пациенту.

Подходящие дозы популяций трансдуцированных клеток таковы, что они являются терапевтически и/или профилактически эффективными. Вводимая доза может зависеть от индивида и состояния, подлежащего лечению, и может быть легко определена специалистом в данной области.

Т–клетка может быть получена из Т–клетки, выделенной от пациента. Т–клетка может быть частью популяции смешанных клеток, выделенной у индивида, такой как популяция лимфоцитов периферической крови (PBL). Т–клетки в популяции PBL могут быть активированы способами, известными в данной области, такими как использование антител против CD3 и/или против CD28 или гранул клеточного размера, конъюгированных с антителами против CD3 и/или против CD28.

Т–клетка может быть CD4⁺ хелперной Т–клеткой или CD8⁺ цитотоксической Т–клеткой. Т–клетка может находиться в смешанной популяции CD4⁺ хелперных Т–клеток/CD8⁺ цитотоксических Т–клеток. Поликлональная активация, например, с использованием антител против CD3, необязательно в комбинации с антителами против CD28, будет запускать пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т–клеток.

T–клетка может быть выделена у индивида, которому должна быть осуществлена адоптивная передача генетически модифицированной клетки. В этом отношении клетка может быть получена путем выделения T–клетки у индивида, необязательно, активации T–клетки, переноса гена TCR в клетку *ex vivo*. Последующая иммунотерапия индивида может затем осуществляться путем адоптивного переноса TCR–трансдуцированных клеток. В настоящем описании этот процесс относится к аутологичному переносу T–клеток – то есть TCR–трансдуцированные клетки вводятся тому же самому субъекту, от которого T–клетки были первоначально получены.

Альтернативно, T–клетка может быть выделена у другого индивида, так что она является аллогенной. T–клетка может быть выделена у донорского индивида. Например, если субъект подвергается аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (Allo–HSCT) или трансплантации солидных органов, или трансплантации клеток, или терапии стволовыми клетками, клетка может быть получена от донора, у которого получены органы, ткани или клетки. Донором и субъектом, подвергающимся лечению, могут быть братья и сестры.

Альтернативно, T–клетка может быть получена из стволовой клетки, такой как гемопоэтическая стволовая клетка (HSC). Перенос гена в HSC не приводит к экспрессии TCR на клеточной поверхности, поскольку стволовые клетки не экспрессируют молекулы CD3. Однако, когда стволовые клетки дифференцируются в лимфоидные предшественники, которые мигрируют в тимус, инициация экспрессии CD3 приводит к поверхностной экспрессии введенного TCR в тимоцитах.

Преимущество этого подхода состоит в том, что зрелые T–клетки, как только они получены, экспрессируют только введенный TCR и мало имеют или вообще не имеют эндогенных цепей TCR, потому что экспрессия введенных цепей TCR подавляет перестройку эндогенных сегментов гена TCR с образованием функциональных альфа TCR и бета–генов. Дополнительным преимуществом является то, что генно–модифицированные стволовые клетки являются постоянным источником зрелых T–клеток с желаемой специфичностью к антигену. Соответственно, HSC, HPC или вектор, как определено в настоящем документе, можно использовать в комбинации с генно–модифицированной стволовой клеткой, предпочтительно, с генно–модифицированной гемопоэтической стволовой клеткой, которая при дифференцировке продуцирует T–клетку, экспрессирующую TAA–специфический TCR.

Другие подходы, известные в данной области, могут использоваться для уменьшения, ограничения, предотвращения, сайленсинга или отмены экспрессии эндогенных генов в клетках по настоящему изобретению или клетках, полученных способами по настоящему изобретению.

Как используется в настоящем документе, термин «нарушение» относится к уменьшению, ограничению, предотвращению, сайленсингу или отмене экспрессии гена. Специалист в данной области может использовать любой метод, известный в данной области, для нарушения эндогенного гена, например, любой подходящий метод для

редактирования генома, сайленсинга гена, нокдауна гена или нокаута гена.

Например, эндогенный ген может быть нарушен с помощью искусственной нуклеазы. Искусственная нуклеаза представляет собой, например, искусственный рестрикционный фермент, сконструированный для селективного нацеливания на специфическую полинуклеотидную последовательность (например, кодирующий интересующий ген) и индуцирования двухцепочечного разрыва в указанной полинуклеотидной последовательности. Как правило, разрыв двухцепочечной цепи (DSB) будет устранен с помощью подверженного ошибкам негомологичного присоединения конца (NHEJ), что приведет к образованию нефункциональной полинуклеотидной последовательности, которая может быть неспособна экспрессировать эндогенный ген.

В некоторых вариантах осуществления искусственная нуклеаза выбрана из группы, состоящей из нуклеаз цинкового пальца (ZFN), эффекторных нуклеаз, подобных активатору транскрипции (TALEN) и CRISPR/Cas (например, CRISPR/Cas9).

Т-КЛЕТОЧНЫЙ РЕЦЕПТОР (TCR)

Во время процессинга антигена антигены разлагаются внутри клеток, а затем переносятся на поверхность клетки молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Т-клетки способны распознавать этот пептид: комплекс МНС на поверхности антигенпрезентирующей клетки. Существует два разных класса молекул МНС: МНС I и МНС II, каждый класс доставляет пептиды из разных клеточных компартментов на клеточную поверхность.

АТ-клеточный рецептор (TCR) представляет собой молекулу, обнаруженную на поверхности Т-клеток, которая отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами МНС. Гетеродимер TCR состоит из альфа (α) и бета (β) цепи примерно в 95% Т-клеток, в то время как около 5% Т-клеток имеют TCR, состоящие из гамма (γ) и дельта (δ) цепей.

Взаимодействие TCR с антигеном и МНС приводит к активации Т-лимфоцита, на котором TCR экспрессируется через серию биохимических событий, опосредованных ассоциированными ферментами, корецепторами и специализированными вспомогательными молекулами.

Каждая цепь TCR является членом суперсемейства иммуноглобулинов и имеет один N-концевой иммуноглобулин (Ig)-вариабельный (V) домен, один Ig-константный (C) домен, область, охватывающая трансмембранную/клеточную мембрану, и короткий цитоплазматический хвост на C-терминальном конце.

Вариабельный домен как α -цепи TCR, так и β -цепи имеет три гипервариабельных или определяющих комплементарность области (CDR). CDR3 представляет собой основную CDR, ответственную за распознавание процессированного антигена, хотя было также показано, что CDR1 альфа-цепи взаимодействует с N-концевой частью антигенного пептида, тогда как CDR1 бета-цепи взаимодействует с C-концевой частью пептида. Полагают, что CDR2 распознает молекулу МНС.

Константный домен домена TCR состоит из коротких соединительных

последовательностей, в которых остаток цистеина образует дисульфидную связь, создавая связь между двумя цепями.

TCR, используемый в настоящем изобретении, может иметь один или несколько дополнительных остатков цистеина в каждой из α и β цепей, так что TCR может содержать две или более дисульфидных связей в константных доменах.

Структура позволяет TCR связываться с другими молекулами, такими как CD3, которые обладают тремя различными цепями (γ , δ и ϵ) у млекопитающих и ζ -цепью. Эти вспомогательные молекулы имеют отрицательно заряженные трансмембранные области и играют роль в распространении сигнала от TCR в клетку. CD3- и ζ -цепи вместе с TCR образуют так называемый T-клеточный рецепторный комплекс.

Сигнал от комплекса T-клеток усиливается одновременным связыванием молекул МНС специфическим корецептором. Для хелперных T-клеток этот корецептор представляет собой CD4 (специфичный для МНС класса II); тогда как для цитотоксических T-клеток этот корецептор представляет собой CD8 (специфичный для МНС класса I). Ко-рецептор обеспечивает длительное взаимодействие между антигенпрезентирующей клеткой и T-клеткой и рекрутирует важные молекулы (например, LCK) внутри клетки, участвующие в передаче сигналов активированного T-лимфоцита.

Соответственно, как используется в настоящем документе, термин «рецептор T-клеток» (TCR) относится к молекуле, способной распознавать пептид, когда он представлен молекулой МНС. Молекула может представлять собой гетеродимер с двумя цепями α и β (или, необязательно, γ и δ), или он может представлять собой одноцепочечную конструкцию TCR.

TCR, используемый в настоящем изобретении, может представлять собой гибридный TCR, содержащий последовательности, полученные из более чем одного вида. Например, неожиданно было обнаружено, что мышинные TCR более эффективно экспрессируются в T-клетках человека, чем TCR человека. Следовательно, TCR может содержать переменные области человека и константные области мыши.

Недостатком этого подхода является то, что мышинные константные последовательности могут вызывать иммунный ответ, что приводит к отторжению перенесенных T-клеток. Однако схемы кондиционирования, используемые для подготовки пациентов к адоптивной T-клеточной терапии, могут привести к достаточной иммуносупрессии, чтобы позволить приживление T-клеток, экспрессирующих мышинные последовательности.

Часть TCR, которая устанавливает большую часть контактов с антигенным пептидом, связанным с основным комплексом гистосовместимости (МНС), представляет собой определяющую комплементарность область 3 (CDR3), которая является уникальной для каждого клона T-клеток. Область CDR3 генерируется при событиях соматической перестройки, происходящих в тимусе и вовлекающих несмежные гены, принадлежащие к переменным (V), разнообразным (D, для β и δ -цепям) и присоединяющимся (J) генам.

Кроме того, случайные нуклеотиды, встроенные/удаленные в перестраивающихся локусах каждого гена цепи TCR, значительно увеличивают разнообразие высоко вариабельной последовательности CDR3. Таким образом, частота конкретной последовательности CDR3 в биологическом образце указывает на численность конкретной популяции T-клеток. Большое разнообразие репертуара TCR у здоровых людей обеспечивает широкий спектр защиты от различных чужеродных антигенов, представленных молекулами МНС на поверхности антигенпрезентирующих клеток. В связи с этим следует отметить, что теоретически в тимусе может генерироваться до 10^{15} различных TCR.

Разнообразие рецепторов T-клеток сфокусировано на CDR3, и эта область в первую очередь ответственна за распознавание антигена.

CDR могут, например, содержать одну, две или три замены, добавления или делеции из данной последовательности, при условии, что TCR сохраняет способность связывать производный от ТАА пептид, когда он представлен молекулой МНС.

Специалисты в данной области могут легко генерировать TCR, специфичные для ТАА, используя любой способ, известный в данной области.

Например, ТАА-специфичные TCR могут быть идентифицированы методом захвата гена TCR, описанного Linnemann et al (*Nature Medicine* 19, 1534–1541 (2013)). Вкратце, в этом методе используется высокопроизводительная стратегия на основе ДНК для идентификации последовательностей TCR путем захвата и секвенирования фрагментов геномной ДНК, кодирующих гены TCR, и может использоваться для идентификации ТАА-специфических TCR.

УЛУЧШЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ TCR И УМЕНЬШЕННОЕ ОШИБОЧНОЕ СПАРИВАНИЕ TCR

Увеличение количества молекул CD3 может увеличить экспрессию TCR, например, в клетке, которая была модифицирована для экспрессии TCR по настоящему изобретению. Соответственно, T-клетка может быть модифицирована (например, с использованием вектора) для включения одного или нескольких генов, кодирующих CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон и/или CD3-дзета. В одном варианте осуществления T-клетка содержит ген, кодирующий CD3-дзета. T-клетка может содержать ген, кодирующий CD8. Вектор, кодирующий такие гены, может кодировать селективируемый маркер или ген "самоубийства", чтобы увеличить профиль безопасности генетически сконструированной клетки. Гены могут быть связаны с помощью саморасщепляющихся последовательностей, таких как саморасщепляющаяся последовательность 2A.

Альтернативно, один или несколько отдельных векторов, кодирующих ген CD3, могут быть предоставлены для совместного переноса в T-клетку одновременно, последовательно или раздельно с одним или несколькими векторами, кодирующими TCR.

Трансгенный TCR может быть экспрессирован в T-клетке, используемой в настоящем изобретении, для изменения антигенной специфичности T-клетки. TCR-трансдуцированные TCR-клетки экспрессируют по меньшей мере две альфа-цепи TCR и две бета-цепи TCR. В то время как эндогенные альфа/бета-цепи TCR образуют рецептор,

который является самодостаточным, введенные альфа/бета–цепи TCR образуют рецептор с определенной специфичностью для данного антигена–мишени.

Однако генная терапия TCR требует достаточной экспрессии перенесенных (то есть трансгенных) TCR, поскольку перенесенный TCR может быть разбавлен присутствием эндогенного TCR, что приводит к субоптимальной экспрессии специфичного для опухоли TCR. Кроме того, может происходить неправильное связывание между эндогенными и введенными цепями с образованием новых рецепторов, которые могут проявлять неожиданную специфичность для аутоантигенов и вызывать аутоиммунное повреждение при передаче пациентам.

Следовательно, было разработано несколько стратегий для снижения риска ошибочного связывания между эндогенными и введенными цепями TCR. Мутации в альфа/бета–интерфейсе TCR – одна из стратегий, используемых в настоящее время для уменьшения нежелательного ошибочного спаривания. Например, введение цистеина в константные домены альфа– и бета–цепи позволяет образовывать дисульфидную связь и улучшает спаривание введенных цепей, уменьшая при этом ошибочное связывание с цепями дикого типа.

Соответственно, TCR, используемые в настоящем изобретении, могут содержать одну или несколько мутаций на границе α –цепи/ β –цепи, так что, когда α –цепь и β –цепь экспрессируются в T–клетке, частота ошибочного спаривания между указанными цепями и эндогенные TCR α и β цепи снижена. В одном варианте осуществления одна или несколько мутаций вводят остаток цистеина в домен константной области каждой из α –цепи и β –цепи, где остатки цистеина способны образовывать дисульфидную связь между α –цепью и β –цепью.

Другая стратегия уменьшения количества ошибочных связываний основана на введении полинуклеотидных последовательностей, кодирующих миРНК, добавленных к генам, кодирующим специфичные для опухоли α – или β –цепи TCR, и предназначенных для ограничения экспрессии эндогенных генов TCR (Okamoto S. *Cancer research* 69, 9003–9011, 2009).

Соответственно, вектор или полинуклеотид, кодирующий TCR, используемые в настоящем изобретении, могут включать одну или несколько миРНК или других агентов, направленных на ограничение или отмену экспрессии эндогенных генов TCR.

Также можно комбинировать искусственные нуклеазы, такие как винковопальцевые нуклеазы (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN) или системы CRISPR/Cas, предназначенные для нацеливания на константные области эндогенных генов TCR (TRAC и/или TRBC), чтобы получить постоянное разрушение эндогенных генов альфа– и/или бета–цепей TCR, что обеспечивает полную экспрессию специфичного для опухоли TCR и, таким образом, снижает или устраняет риск ошибочного связывания TCR. Этот процесс, известный как редактирование гена TCR, оказался лучше передачи гена TCR *in vitro* and *in vivo* (Provasi E., Genovese P., *Nature Medicine* May; 18(5):807–15; 2012).

Кроме того, технология редактирования генома позволяет целенаправленно интегрировать кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, кодирующий TCR, используемый в настоящем изобретении, и, необязательно, одну или несколько областей промотора и/или других последовательностей контроля экспрессии, в эндогенный ген, нарушенный искусственными нуклеазами (Lombardo A., *Nature biotechnology* 25, 1298–1306; 2007).

Другая стратегия, разработанная для увеличения экспрессии трансгенных TCR и уменьшения ошибочного связывания TCR, заключается в «муринизировании», при котором константные области TCR α и TCR человека (например, области TRAC, TRBC1 и TRBC2) заменяются их мышинными аналогами. Муринизирование константных областей TCR описана, например, в Sommermeyer и Uckert J. *Immunol*; 2010 (184: 6223–6231). Соответственно, TCR, используемый в настоящем изобретении, может быть муринизирован.

ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР (CAR)

CAR содержат внеклеточный связывающий лиганд домен, чаще всего одноцепочечный вариабельный фрагмент моноклонального антитела (scFv), связанный с внутриклеточными сигнальными компонентами, чаще всего CD3 ζ отдельно или в сочетании с одним или несколькими костимуляторными доменами. Спейсер часто добавляют между внеклеточным антигенсвязывающим доменом и трансмембранным фрагментом для оптимизации взаимодействия с мишенью.

CAR для использования в настоящем изобретении может содержать:

- антиген–специфический нацеливающий домен;
- трансмембранный домен;
- необязательно, по меньшей мере, один костимуляторный домен; а также
- внутриклеточный сигнальный домен.

Предпочтительно антиген–специфический нацеливающий домен содержит антитело или его фрагмент, более предпочтительно, вариабельный фрагмент с одной цепью.

Предпочтительно антиген–специфический нацеливающий домен нацеливается на ТАА.

В одном варианте осуществления антиген–специфический нацеливающий домен нацеливается на CD19.

Примеры трансмембранных доменов включают трансмембранный домен дзета–цепи Т–клеточного рецепторного комплекса, CD28 и CD8a.

Примеры костимулирующих доменов включают в себя костимулирующий домен из CD28, CD137 (4–1BB), CD134 (OX40), Dap10, CD27, CD2, CD5, ICAM–1, LFA–1, Lck, TNFR–I, TNFR–II, Fas, CD30 и CD40.

В одном варианте осуществления костимуляторный домен представляет собой костимулирующий домен из CD28.

Примеры внутриклеточных сигнальных доменов включают дзета–цепь CD3

человека, FcγRIII, FcγRI, цитоплазматический хвост Fc-рецептора и иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина (ITAM), несущий цитоплазматические рецепторы.

Химерные антигенные рецепторы

Термин «химерный антигенный рецептор» или «CAR» или «CAR» в контексте настоящего описания относится к сконструированным рецепторам, которые могут придавать антигенную специфичность клеткам (например, Т-клеткам, таким как наивные Т-клетки, Т-клетки центральной памяти, эффекторные Т-клетки памяти или их комбинации). CAR также известны как искусственные Т-клеточные рецепторы, химерные Т-клеточные рецепторы или химерные иммунорецепторы. Предпочтительно, CAR по изобретению содержат антиген-специфическую нацеливающую область, внеклеточный домен, трансмембранный домен, необязательно, один или несколько костимуляторных доменов и внутриклеточный сигнальный домен.

Антиген-специфический нацеливающий домен

Антиген-специфический нацеливающий домен обеспечивает CAR способностью связываться с целевым антигеном, представляющим интерес. Антиген-специфический нацеливающий домен, предпочтительно, направлен на антиген, представляющий клинический интерес, против которого было бы желательно инициировать эффекторный иммунный ответ, который приводит к уничтожению опухоли.

Антиген-специфический направляющий домен может представлять собой любой белок или пептид, который обладает способностью специфически распознавать и связываться с биологической молекулой (например, рецептором клеточной поверхности или опухолевым белком или его компонентом). Антиген-специфический направляющий домен включает природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантно полученного связывающего партнера для представляющей интерес биологической молекулы.

Иллюстративные антиген-специфичные нацеливающие домены включают антитела или фрагменты или производные антител, внеклеточные домены рецепторов, лиганды для молекул/рецепторов клеточной поверхности или их связывающие рецептор домены и связывающие опухоль белки.

В предпочтительном варианте осуществления антиген-специфический нацеливающий домен представляет собой антитело или происходит от него. Нацеливающий домен антитела может представлять собой фрагмент антитела или генно-инженерный продукт одного или нескольких фрагментов антитела, причем этот фрагмент участвует в связывании с антигеном. Примеры включают переменную область (Fv), определяющую комплементарность область (CDR), Fab, одноцепочечное антитело (scFv), переменную область тяжелой цепи (VH), переменную область легкой цепи (VL) и антитело верблюда (VHH).

В предпочтительном варианте осуществления связывающий домен представляет собой одноцепочечное антитело (scFv). ScFv может быть мышинным, человеческим или гуманизированным scFv.

«Область, определяющая комплементарность» или «CDR» в отношении антитела или его антигенсвязывающего фрагмента относится к высоко вариабельной петле в вариабельной области тяжелой цепи или легкой цепи антитела. CDR могут взаимодействовать с конформацией антигена и в значительной степени определять связывание с антигеном (хотя известно, что некоторые каркасные области участвуют в связывании). Вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи содержат по 3 CDR.

«Вариабельная область тяжелой цепи» или «VH» относится к фрагменту тяжелой цепи антитела, который содержит три CDR, расположенные между фланкирующими участками, известными как каркасные области, которые являются более консервативными, чем CDR, и образуют каркас для поддержки CDR.

«Вариабельная область легкой цепи» или «VL» относится к фрагменту легкой цепи антитела, который содержит три CDR, вставленных между каркасными областями.

«Fv» относится к наименьшему фрагменту антитела, который несет полный сайт связывания антигена. Fv-фрагмент состоит из вариабельной области одной легкой цепи, связанной с вариабельной областью одной тяжелой цепи.

«Одноцепочечное Fv-антитело» или «scFv» относится к сконструированному антителу, состоящему из вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, соединенных друг с другом напрямую или через последовательность пептидного линкера.

Антитела, которые специфически связывают молекулу поверхности опухолевой клетки, могут быть получены с использованием способов, хорошо известных в данной области. Такие способы включают фаговый дисплей, способы получения человеческих или гуманизированных антител или способы с использованием трансгенного животного или растения, сконструированного для получения человеческих антител. Доступны библиотеки фагового дисплея частично или полностью синтетических антител, которые можно подвергать скринингу на наличие антитела или его фрагмента, которые могут связываться с молекулой-мишенью. Также доступны библиотеки фагового дисплея человеческих антител. После идентификации аминокислотную последовательность или полинуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, можно выделить и/или определить.

Что касается нацеливающих доменов, которые нацелены на раковые антигены, выбор нацеливающего домена будет зависеть от типа злокачественного новообразования, подлежащего лечению, и может нацеливаться на опухолевые антигены. Образец опухоли от индивида может быть охарактеризован на наличие определенных биомаркеров или маркеров клеточной поверхности. Например, клетки злокачественного новообразования молочной железы от индивида могут быть положительными или отрицательными для каждого из Her2Neu, рецептора эстрогена и/или рецептора прогестерона. Выбирают опухолевый антиген или молекулу клеточной поверхности, которая обнаруживается в опухолевых клетках индивидуума. Предпочтительно, антиген-специфический

нацеливающий домен направлен на молекулу клеточной поверхности, которая обнаружена в опухолевых клетках и по существу не обнаружена в нормальных тканях или ограничена по своей экспрессии в неживых нормальных тканях.

ТАА, на который может быть нацелен CAR, используемый в настоящем изобретении, включает, но не ограничивается этим, один или несколько из следующих: гематопозитическую стволовую клетку (HSC), гематопозитическую клетку–предшественник (HPC), миелоид/моноцит–коммитированную клетку–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащий вектор, в котором вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, предпочтительно, где ТАА выбран из группы, включающей карциноэмбриональный антиген (CEA), рецептор эстрогена, рецептор прогестерона, *ephrinB2*, *ROR1*, мезотелин, *c-Met*, *GD-2* и *MAGE A3* TCR, *4-1BB*, антиген аденокарциномы, альфа–фетопротеин *BAFF*, клетку В–лимфомы, антиген *C242*, карбоангидразу 9 (*CA-IX*), *CCR4*, *CD152*, *CD200*, *CD22*, *CD19*, *CD22*, *CD123*, *CD221*, *CD23* (рецептор *IgE*), *CD28*, *CD4*, *CD40*, *CD44*, *CD44 v6*, *CD51*, *CD52*, *CD56*, *CD74*, *CD80*, *CS-1*, *CNT0888*, *CTLA-4*, *DR5*, *EpCAM*, *CD3*, дополнительный домен фибронектина–В, рецептор фолата 1, гликопротеин 75, *GPNMB*, *HGF*, рецептор–киназы фактор роста гепатоцитов человека, рецептор *IGF-1*, *IGF-I*, *IgG1*, *L1-CAM*, *IL-13*, *IL-6*, рецептор инсулиноподобного фактора роста I, интегрин $\alpha5\beta1$, интегрин $\alpha\beta3$, *MORAb-009*, *MS4A1*, муцин *CanAg*, N–гликолилнейраминую кислоту, *NPC-1C*, *PDGF-R α* , *PDL192*, фосфатидилсерин, клетки карциномы предстательной железы, *RANKL*, *RON*, *SCH 900105*, *SDC1*, *SLAMF7*, тенасцин С, *TGF бета 2*, *TGF- β* , *TRAIL-R1*, *TRAIL-R2*, опухолевый антиген *CTAA16.88*, фактор роста эндотелия сосудов (*VEGF*), *VEGF-A*, *VEGFR-1*, *VEGFR2*, виментин, *5T4*, *CD5*, *CD19*, *CD20*, *CD21*, *CD25*, *CD37*, *CD30*, *CD33*, *CD45*, *CAMPATH-1 (CDw52)*, *HLA-DR*, антиидиотип, *TAG-72*, *Ep-CAM*, *MUC1*, фолат-связывающий белок, *A33*, *G250*, простатический специфический мембранный антиген, (*PSMA*), простатический специфический антиген (*PSA*), ферритин, ганглиозиды (например, *GD2*, *GD3*, *GM2*), *Ley*, *CA-125*, *CA19-9*, рецептор эпидермального фактора роста (*EGFR*), *p185HER2*, рецептор *IL-2*, *de2-7 EGFR*, белок активации фибробластов (*FAP*), тенасцин, металлопротеиназы, эндосиалин, карбоаноангидразу, галектин 9, альдолазу А, *eIF γ 4*, тирозиназа, галектин 4, *HERKV-K10*, *p53*, *NY-LU-12*, рестин, *NY-CO-38*, *MAGE-1*, *MAGE-4a*, *SSX2*, *NY-ESO-1*, *SCP-1*, *707-AP*, *AFP*, *ART-4*, *BAGE*, *b-катенин/m*, *Bcr-abl*, *CAMEL*, *CAP-1*, *CASP-8*, *CDC27m*, *CDK4/m*, *CT*, *Cyp-B*, *DAM-6 (MAGE-B2)* and *DAM-10 (MAGE-B1)*, *ELF2M*, *ETV6-AML1*, *G250*, *GAGE*, *GnT-V*, *Gp100*, *HAGE*, *HER-2/neu*, *HLA-A*0201-R170I*, *HPV-E7*, *HSP70-2M*, *HST-2*, *hTERT (hTRT)*, *iCE*, *KIAA0205*, *LAGE*, *LDLR/FUT*, *MAGE*, *MART-1/мелан-А*, *MC1R*, миозин/m, *MUC1*, *MUM-1*, *MUM-2*, *MUM-3*, *NA88-A*, *NY-ESO-1*, *P15*, *p190* минорный *bcr-abl*, *Pml/RAR α* , *PRAME*, *RAGE*, *RU1*, *RU2*, *SAGE*, *SART-1*, *SART-3*, *TEL/AML1*, *TPI/m*, *TRP-1*, белок 1, *gp75*, *TRP-2*, *TRP-2/INT2* и *WT1*.

Костимуляторный домен

CAR, используемый в настоящем изобретении, также может содержать один или несколько костимуляторных доменов. Этот домен может усиливать пролиферацию клеток, выживание клеток и развитие клеток памяти.

Каждый костимуляторный домен содержит костимуляторный домен любого одного или нескольких, например, членов суперсемейства TNFR, CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), Dap10, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-1, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 или их комбинации. Костимулирующие домены из других белков также могут быть использованы с CAR, используемым в настоящем изобретении. Дополнительные костимулирующие домены будут очевидны для специалистов в данной области.

Внутриклеточный сигнальный домен

CAR, используемый в настоящем изобретении, также может содержать внутриклеточный сигнальный домен. Этот домен может быть цитоплазматическим и может преобразовывать сигнал эффекторной функции и направлять клетку на выполнение своей специализированной функции. Примеры внутриклеточных сигнальных доменов включают, но не ограничиваются ими, ζ цепь рецептора T-клетки или любой из его гомологов (например, η -цепь, Fc ϵ R1 γ и β -цепи, цепь MB1 (Ig α), цепь B29 (Ig β) и т.д.), полипептиды CD3 (Δ , δ и ϵ), тирозинкиназы семейства syk (Syk, ZAP 70 и т.д.), тирозинкиназы семейства src (Lck, Fyn, Lyn и др.) и другие молекулы, участвующие в трансдукции T-клеток, такие как CD2, CD5 и CD28. Внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой дзета-цепь CD3 человека, Fc γ RIII, Fc ϵ RI, цитоплазматические хвосты Fc-рецепторов, иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина (ITAM), несущий цитоплазматические рецепторы, или их комбинации.

Трансмембранный домен

CAR, используемый в настоящем изобретении, также может содержать трансмембранный домен. Трансмембранный домен может содержать трансмембранную последовательность из любого белка, который имеет трансмембранный домен, включая любой из трансмембранных белков типа I, типа II или типа III. Трансмембранный домен CAR, используемый в настоящем изобретении, также может содержать искусственную гидрофобную последовательность. Трансмембранные домены CAR, используемых в настоящем изобретении, могут быть выбраны так, чтобы не димеризоваться. Дополнительные трансмембранные домены будут очевидны для специалистов в данной области. Примерами трансмембранных (TM) областей, используемых в конструкциях CAR, являются: 1) область CD28 TM (Pule et al, *Mol Ther*, 2005, Nov;12(5):933-41; Brentjens et al, *CCR*, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35; Casucci et al, *Blood*, 2013, Nov 14;122(20):3461-72.); 2) область TM OX40 (Pule et al., *Mol Ther*, 2005, ноябрь; 12 (5): 933-41); 3) область TM 41BB (Brentjens et al, *CCR*, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35); 4) область CD3 zeta TM (Pule et al, *Mol Ther*, 2005, Nov;12(5):933-41; Savoldo B, *Blood*, 2009, Jun 18;113(25):6392-402); 5) область TM CD8a (Maher et al., *Nat Biotechnol*, 2002, Jan; 20 (1): 70-5.; Imai C, *Leukemia*, 2004, Apr;18(4):676-84; Brentjens et al, *CCR*, 2007, Sep 15;13(18 Pt

1):5426–35; Milone et al, *Mol Ther*, 2009, Aug;17(8):1453–64.).

ИНГИБИТОР КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ИММУНИТЕТА

Как используется в настоящем документе, термин «ингибитор контрольных точек иммунитета» относится к молекуле, соединению, антителу или лекарственному средству, которые ингибируют, блокируют, предотвращают, уменьшают или подавляют экспрессию или иным образом антагонистичны молекуле ингибитора контрольных точек иммунитета. При экспрессии на клеточной поверхности ингибирующая контрольные точки молекула ингибирует или ослабляет опосредованный Т-клетками иммунный ответ на указанную клетку. Например, экспрессия ингибирующих контрольные точки молекул может препятствовать гибели клетки от ответа Т-клеток. Этот механизм особенно вреден, когда раковая клетка экспрессирует ингибирующие контрольные точки молекулы, поскольку это может позволить злокачественной клетке избежать ответа Т-клеток хозяина. Соответственно, когда ингибирующие контрольные точки молекулы на опухолевых клетках ингибируются ингибитором контрольных точек иммунитета, должен происходить усиленный ответ Т-клеток хозяина против опухолевой клетки.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунитета ингибирует ингибирующую контрольной точки молекулу, выбранную из группы, состоящей из A2AR (рецептор аденозина A2A), B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA (аттенюатор В- и Т-лимфоцитов; CD272), HVEM (медиатор проникновения вируса герпеса), CTLA-4 (цитотоксический белок, ассоциированный с Т-лимфоцитами 4; CD152), IDO (индоламин-2,3-диоксигеназа), TDO (триптофан-2,3-диоксигеназа), KIR (киллерный иммуноглобулиноподобный рецептор), LAG3 (ген активации лимфоцитов 3), PD-1 (рецептор запрограммированной смерти 1), PD-L1 (лиганд 1 PD-1), PD-L2 (лиганд 2 PD-1), TIM-3 (Т-клеточный домен иммуноглобулина и домен муцина-3), VISTA (Ig-супрессор V-домена активации Т-клеток), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86). Комбинации ингибиторов контрольных точек иммунитета также могут быть использованы.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунитета представляет собой ингибитор PD-1; предпочтительно, ингибитор PD-1 представляет собой анти-PD-1 антитело.

В другом варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунитета представляет собой ингибитор PD-L1; предпочтительно, ингибитор PD-L1 представляет собой анти-PD-L1 антитело.

В другом варианте осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-L2, предпочтительно, ингибитор PD-L2 представляет собой анти-PD-L2 антитело.

В другом варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунитета представляет собой ингибитор CTLA4, предпочтительно, ингибитор CTLA4 представляет собой анти-CTLA4 антитело.

В другом варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунитета представляет собой ингибитор LAG-3; предпочтительно, ингибитор LAG-3 представляет

собой анти-LAG-3 антитело.

Как используется в настоящем документе, термин «антитело» понимается как полипептид, в значительной степени кодируемый геном иммуноглобулина или генами иммуноглобулина или их фрагментами, которые специфически связывают и распознают антиген (например, маркер клеточной поверхности). Как используется в настоящем документе, термин «антитело» относится к цельной или интактной молекуле антитела (например, IgM, IgG (включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA, IgD или IgE) или любому их антигенсвязывающему фрагменту.

Антитело может представлять собой поликлональное антитело или моноклональное антитело. Моноклональные антитела продуцируются идентичными иммунными клетками (например, гибридомами, которые могут быть получены в результате слияния линии В-клеток, продуцирующих антитела, и линии раковых В-клеток). Моноклональное антитело, направленное на конкретный антиген, распознает один специфический эпитоп на указанном антигене. Напротив, поликлональные антитела продуцируются из множества неидентичных клеточных линий и поэтому распознают несколько разных эпитопов на конкретном антигене.

Антиген-связывающие фрагменты антитела включают, например, одноцепочечное антитело, одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv), Fd-фрагмент, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или F(ab')₂-фрагмент. scFv-фрагмент представляет собой одну полипептидную цепь, которая включает переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, из которого получен scFv. Кроме того, интратела, миниантитела, триатела и диатела (см., например, Todorovska et al. (2001) J Immunol Methods 248(1):47-66; Hudson and Kortt (1999) J Immunol Methods 231(1):177-189; Poljak 25 (1994) Structure 2(12): 1121-1123; Rondon and Marasco (1997) Annual Review of Microbiology 21:257-283, также включены в определение антител и совместимы для использования в описанных здесь способах. Термин «антитело», как используется в настоящем документе, также включает фрагменты антител, полученные либо путем модификации целых антител, либо фрагментов, синтезированных *de novo* с использованием рекомбинантных методов.

Подходящие способы получения антитела или его антигенсвязывающих фрагментов, направленных на конкретный антиген, известны в данной области (см., например, Greenfield (2014) Antibodies: A Laboratory Manual, Second Edition 201-221).

ВАРИАНТЫ, ПРОИЗВОДНЫЕ, АНАЛОГИ, ГОМОЛОГИ И ФРАГМЕНТЫ

В дополнение к конкретным белкам и полинуклеотидам, упомянутым в настоящем документе, настоящее изобретение также охватывает использование вариантов, производных, аналогов, гомологов и их фрагментов.

В контексте настоящего изобретения вариант любой данной последовательности представляет собой последовательность, в которой конкретная последовательность остатков (остатков аминокислот или нуклеиновых кислот) была модифицирована таким образом, что рассматриваемый полипептид или полинуклеотид по существу сохраняет хотя бы одну из его эндогенных функций. Вариантная последовательность может быть

получена путем добавления, делеции, замены, модификации, замены и/или изменения по меньшей мере одного остатка, присутствующего в природном белке.

Термин «производное», как используется в настоящем документе, в отношении белков или полипептидов по настоящему изобретению включает любое замещение, изменение, модификацию, замену, делецию и/или добавление одного (или нескольких) аминокислотных остатков из или к последовательности, при условии, что полученный белок или полипептид по существу сохраняет по меньшей мере одну из своих эндогенных функций.

Термин «аналог», как используется в настоящем документе в отношении полипептидов или полинуклеотидов включает любой миметик, то есть химическое соединение, которое обладает по меньшей мере одной из эндогенных функций полипептидов или полинуклеотидов, которые он имитирует.

Белки, используемые по настоящему изобретению, также могут иметь делеции, вставки или замены аминокислотных остатков, которые вызывают молчащие изменения и приводят к функционально эквивалентному белку. Преднамеренные аминокислотные замены могут быть сделаны на основе сходства в полярности, заряде, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природе остатков до той степени, пока сохраняется эндогенная функция. Например, отрицательно заряженные аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту; положительно заряженные аминокислоты включают лизин и аргинин; и аминокислоты с незаряженными полярными головными группами, имеющие сходные значения гидрофильности, включают аспарагин, глутамин, серин, треонин и тирозин.

Замена может включать замену аминокислоты на аналогичную аминокислоту (консервативная замена). Сходная аминокислота представляет собой аминокислоту, которая имеет фрагмент боковой цепи с соответствующими свойствами, сгруппированными вместе, например, как показано ниже:

- (i) основные боковые цепи: лизин (K), аргинин (R), гистидин (H);
- (ii) кислотные боковые цепи: аспарагиновая кислота (D) и глутаминовая кислота (E);
- (iii) незаряженные полярные боковые цепи: аспарагин (N), глутамин (Q), серин (S), треонин (T) и тирозин (Y); или
- (iv) неполярные боковые цепи: глицин (G), аланин (A), валин (V), лейцин (L), изолейцин (I), пролин (P), фенилаланин (F), метионин (M), триптофан (W) и цистеин (C).

Вариантные последовательности могут содержать аминокислотные замены, добавления, делеции и/или вставки.

Консервативные замены, добавления или делеции могут быть сделаны, например, согласно таблице ниже. Аминокислоты в одном и том же блоке во втором столбце и предпочтительно в одной и той же строке в третьем столбце могут заменять друг друга:

АЛИФАТИЧЕСКИЕ	Неполярные	G A P
		I L V
	Полярный – незаряженный	C S T M
		N Q
	Полярный – заряженный	D E
K R		
АРОМАТИЧЕСКИЙ		H F W Y

Настоящее изобретение также охватывает гомологичное замещение (замещение и замена, оба используются в настоящем документе для обозначения взаимной замены существующего аминокислотного остатка с альтернативным остатком), например аналогичное замещение, такое как основное для основного, кислотное для кислотного, полярное для полярного и т. д. Негомологичное замещение также может происходить, например, от одного класса остатка к другому или, альтернативно, включать включение неприродных аминокислот, таких как орнитин.

Термин «вариант», как используется в настоящем документе, может означать объект, имеющий определенную гомологию с аминокислотной последовательностью дикого типа или нуклеотидной последовательностью дикого типа. Термин «гомология» можно отождествить с «идентичностью».

Вариантная последовательность может включать аминокислотную последовательность, которая может быть по меньшей мере на 50%, 55%, 65%, 75%, 85% или 90% идентичной, предпочтительно, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичной интересующей последовательности. Обычно варианты будут содержать те же активные участки и т. д., что и рассматриваемая аминокислотная последовательность. Хотя гомологию также можно рассматривать с точки зрения сходства (т.е. аминокислотные остатки, обладающие сходными химическими свойствами/функциями), в контексте настоящего изобретения предпочтительно выражать гомологию с точки зрения идентичности последовательности.

Вариантная последовательность может включать аминокислотную последовательность, которая может быть по меньшей мере на 50%, 55%, 65%, 75%, 85% или 90% идентичной, предпочтительно, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичной интересующей последовательности. Хотя гомологию также можно рассматривать с точки зрения сходства, в контексте настоящего изобретения предпочтительно выражать гомологию с точки зрения идентичности последовательности.

Предпочтительно, ссылка на последовательность, которая имеет процентную идентичность к любой из SEQ ID №№, подробно описанных в данном документе, относится к последовательности, которая имеет указанную процентную идентичность по всей длине указанной SEQ ID №.

Сравнение идентичности может проводиться визуально или, чаще, с помощью легко доступных программ для сравнения последовательностей. Эти коммерчески доступные компьютерные программы могут вычислять процент гомологии или идентичности между двумя или более последовательностями.

Процент гомологии можно вычислять для смежных последовательностей, то есть где одну последовательность выравнивают с другой последовательностью, и каждую аминокислоту в одной последовательности непосредственно сравнивают с соответствующей аминокислотой в другой последовательности, по одному остатку за раз. Это называется выравниванием «без пропусков». Обычно такие выравнивания без пропусков проводят только для относительно небольшого числа остатков.

Хотя это представляет собой очень простой и последовательный способ, он не может учитывать того, что, например, в паре последовательностей в остальном идентичной, одна вставка или делеция будет вызывать выпадение из выравнивания следующих аминокислотных остатков, таким образом потенциально приводя к большому уменьшению процента гомологии при проведении общего выравнивания. Поэтому большинство способов сравнения последовательностей разрабатывают для получения оптимальных выравниваний, которые учитывают возможные вставки и делеции без чрезмерных штрафов для общего показателя гомологии. Это достигается путем вставки «пропусков» в выравнивание последовательности, чтобы попытаться максимизировать локальную гомологию.

Однако в этих более сложных способах назначают «штрафы за пропуски» для каждого пропуска, встретившегося в выравнивании, так что для одинакового числа идентичных аминокислот, выравнивание последовательности с наименее возможным числом пропусков – отражающее более сильное родство между двумя сравниваемыми последовательностями – будет достигать более высокого показателя гомологии, чем выравнивание со многими пропусками. Обычно используют «аффинную стоимость пропусков», где начисляют относительно высокую стоимость за наличие пропуска и меньший штраф за каждый последующий остаток в пропуске. Это представляет собой наиболее широко применяемую систему оценки пропусков. С высокими штрафами за пропуски получают оптимизированные выравнивания с меньшими пропусками. Большинство программ выравнивания позволяют модифицировать штрафы за пропуски. Однако при использовании такого программного обеспечения для сравнений последовательностей предпочтительно применять значения по умолчанию. Например, при использовании пакета GCG Wisconsin Bestfit штраф за пропуск для аминокислотных последовательностей по умолчанию составляет -12 для пропуска и -4 для каждого продолжения.

Поэтому вычисление максимальной процентной гомологии сначала требует получения оптимального выравнивания с учетом штрафов за пропуски. Подходящей компьютерной программой для проведения такого выравнивания является пакет GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux *et al.* (1984) *Nucleic Acids Res.*

12: 387). Примеры другого программного обеспечения, которое может проводить сравнение последовательностей, включают, но не ограничиваются этим, пакет BLAST (см. Ausubel *et al.* (1999), *там же* – Ch. 18), FASTA (Atschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 403–410) и набор инструментов для сравнения GENWORKS. Как BLAST, так и FASTA доступны для автономного и онлайн-поиска (см. Ausubel *et al.* (1999), *там же*, страницы с 7–58 по 7–60). Однако для некоторых применений предпочтительно использовать программу GCG Bestfit. Другой инструмент, называемый BLAST 2 Sequence, также доступен для сравнения белковых и нуклеотидных последовательностей (см. *FEMS Microbiol. Lett.* (1999) 174: 247–50; *FEMS Microbiol. Lett.* (1999) 177: 187–8).

Хотя конечный процент гомологии может быть измерен с точки зрения идентичности, сам процесс выравнивания обычно не основан на сравнении пар «все или ничего». Вместо этого обычно используют масштабированную матрицу оценки сходства, назначающую баллы для каждого парного сравнения на основе химического сходства или эволюционного расстояния. Примером такой широко используемой матрицы является матрица BLOSUM62 – матрица по умолчанию для набора программ BLAST. Программы GCG Wisconsin обычно используют либо общедоступные значения по умолчанию, либо пользовательскую таблицу сравнения символов, если она имеется (см. Руководство пользователя для получения дополнительной информации). Для некоторых применений предпочтительно использовать общедоступные значения по умолчанию для пакета GCG или, в случае другого программного обеспечения, матрицу по умолчанию, такую как BLOSUM62.

Как только программное обеспечение произведет оптимальное выравнивание, можно вычислить процент гомологии, предпочтительно, процент идентичности последовательности. Программное обеспечение обычно производит это как часть сравнения последовательности и выводит числовой результат.

«Фрагменты» также являются вариантами, и этот термин обычно относится к выбранной области полипептида или полинуклеотида, которая представляет интерес либо функционально, либо, например, в анализе. «Фрагмент», таким образом, относится к последовательности аминокислоты или нуклеиновой кислоты, которая является частью полноразмерного полипептида или полинуклеотида.

Такие варианты могут быть получены с использованием стандартных методов рекомбинантной ДНК, таких как сайт-направленный мутагенез. Там, где должны быть сделаны вставки, может быть получена синтетическая ДНК, кодирующая вставку вместе с 5' и 3' фланкирующими областями, соответствующими природной последовательности по обе стороны от участка вставки. Фланкирующие области будут содержать удобные сайты рестрикции, соответствующие сайтам природной последовательности, так что последовательность может быть разрезана с помощью подходящего фермента(ов) и синтетическая ДНК лигирована в разрезанную часть. Затем ДНК экспрессируется в соответствии с изобретением для получения кодируемого белка. Эти способы являются только иллюстрацией многочисленных стандартных методов, известных в данной области

для манипулирования последовательностями ДНК, и также могут быть использованы другие известные методы.

КОМБИНАЦИЯ

HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированные клетки–предшественники, макрофаги, моноциты или векторы по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с ингибитором контрольных точки иммунитета.

Альтернативно, HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированные клетки–предшественники, макрофаги, моноциты или векторы по настоящему изобретению могут использоваться в комбинации со ТАА–специфической Т–клеткой.

Альтернативно, HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированные клетки–предшественники, макрофаги, моноциты или векторы по настоящему изобретению могут быть использованы в комбинации со ТАА–специфической Т–клеткой, экспрессирующей CAR.

Альтернативно, HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированные клетки–предшественники, макрофаги, моноциты или векторы по настоящему изобретению можно использовать в комбинации со ТАА–специфической Т–клеткой, экспрессирующей трансгенный TCR.

Альтернативно, HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированные клетки–предшественники, макрофаги, моноциты или векторы по настоящему изобретению могут использоваться в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета и ТАА–специфической Т–клеткой, экспрессирующей трансгенный TCR.

Альтернативно, HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированные клетки–предшественники, макрофаги, моноциты или векторы по настоящему изобретению могут быть использованы в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета и ТАА–специфической Т–клеткой, экспрессирующей CAR.

Альтернативно, HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированные клетки–предшественники, макрофаги, моноциты или векторы по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с 1–метил–триптофаном (1–MT).

Как используется в настоящем документе, фраза «используется в комбинации с» охватывает введение HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированных клеток–предшественников, макрофагов, моноцитов или векторов по настоящему изобретению, последовательно, отдельно или одновременно с ингибитором контрольных точек иммунитета и/или ТАА–специфической Т–клеткой.

HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированные клетки–предшественники, макрофаги, моноциты или вектор по настоящему изобретению можно вводить, по меньшей мере за 5 минут, по меньшей мере за 10 минут, по меньшей мере за 15 минут, по меньшей мере за 30 минут, по меньшей мере за 45 минут, по меньшей мере за 60 минут до ТАА–специфической Т–клетки и/или ингибитора контрольных точек иммунитета.

HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированные клетки–предшественники, макрофаги, моноциты или вектор по настоящему изобретению можно вводить, по

меньшей мере за 1 час, по меньшей мере за 2 часа, по меньшей мере за 3 часа, по меньшей мере за 4 часа, по меньшей мере за 5 часов по меньшей мере, 6 часов, по меньшей мере, 12 часов, по меньшей мере за 24 часа, по меньшей мере за 48 часов, по меньшей мере за 72 часа до ТАА-специфической Т-клетки и/или ингибитора контрольных точек иммунитета.

HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированные клетки-предшественники, макрофаги, моноциты или вектор по настоящему изобретению можно вводить, по меньшей мере за один день, по меньшей мере за два дня, по меньшей мере за три дня, по меньшей мере за четыре дня, по меньшей мере за пять дней, по меньшей мере за шесть дней, по меньшей мере за семь дней или по меньшей мере за 14 дней до ТАА-специфической Т-клетки и/или ингибитора контрольных точек иммунитета.

HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированные клетки-предшественники, макрофаги, моноциты или вектор по настоящему изобретению можно вводить, по меньшей мере за одну неделю, по меньшей мере за две недели, по меньшей мере за три недели, по меньшей мере за четыре недели, по меньшей мере за пять недель, по меньшей мере за шесть недель, по меньшей мере за семь недель, по меньшей мере за восемь недель, по меньшей мере за девять недель, по меньшей мере за 10 недель, по меньшей мере за 11 недель или по меньшей мере за 12 недель до ТАА-специфической Т-клетки и/или ингибитора контрольных точек иммунитета.

HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированные клетки-предшественники, макрофаги, моноциты или вектор по настоящему изобретению можно вводить, по меньшей мере за один месяц, по меньшей мере за два месяца, по меньшей мере за три месяца, по меньшей мере за четыре месяца, по меньшей мере за пять месяцев, по меньшей мере за шесть месяцев, по меньшей мере за семь месяцев, по меньшей мере за восемь месяцев, по меньшей мере за девять месяцев, по меньшей мере за 10 месяцев, по меньшей мере за 11 месяцев или по меньшей мере за 12 месяцев до ТАА-специфической Т-клетки и/или ингибитора контрольных точек иммунитета.

HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированные клетки-предшественники, макрофаги, моноциты или вектор по настоящему изобретению можно вводить, по меньшей мере за один месяц, по меньшей мере за два месяца, по меньшей мере за три месяца, по меньшей мере за четыре месяца, по меньшей мере за пять месяцев, по меньшей мере за шесть месяцев, по меньшей мере за семь месяцев, по меньшей мере за восемь месяцев, по меньшей мере за девять месяцев, по меньшей мере за 10 месяцев, по меньшей мере за 11 месяцев или по меньшей мере за 12 месяцев до ТАА-специфической Т-клетки и/или ингибитора контрольных точек иммунитета.

Как используется в настоящем документе, выражение «используется в комбинации с» охватывает введение HSC, НРС, клеток-предшественников, миелоид/моноцит-коммитированных клеток-предшественников, макрофагов, моноцитов или векторов по настоящему изобретению, последовательно, отдельно или одновременно с 1-метил-триптофаном (1-МТ).

HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированные клетки-предшественники,

макрофаги, моноциты или вектор по настоящему изобретению можно вводить, по меньшей мере за 5 минут, по меньшей мере за 10 минут, по меньшей мере за 15 минут, по меньшей мере за 30 минут, по меньшей мере за 45 минут, по меньшей мере за 60 минут до 1-метил-триптофана (1-МТ).

HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированные клетки-предшественники, макрофаги, моноциты или вектор по настоящему изобретению можно вводить, по меньшей мере за 1 час, по меньшей мере за 2 часа, по меньшей мере за 3 часа, по меньшей мере за 4 часа, по меньшей мере за 5 часов по меньшей мере, 6 часов, по меньшей мере, 12 часов, по меньшей мере за 24 часа, по меньшей мере за 48 часов, по меньшей мере за 72 часа до 1-метил-триптофана (1-МТ).

HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированные клетки-предшественники, макрофаги, моноциты или вектор по настоящему изобретению можно вводить, по меньшей мере за один день, по меньшей мере за два дня, по меньшей мере за три дня, по меньшей мере за четыре дня, по меньшей мере за пять дней, по меньшей мере за шесть дней, по меньшей мере за семь дней или по меньшей мере за 14 дней до 1-метил-триптофана (1-МТ).

HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированные клетки-предшественники, макрофаги, моноциты или вектор по настоящему изобретению можно вводить, по меньшей мере за одну неделю, по меньшей мере за две недели, по меньшей мере за три недели, по меньшей мере за четыре недели, по меньшей мере за пять недель, по меньшей мере за шесть недель, по меньшей мере за семь недель, по меньшей мере за восемь недель, по меньшей мере за девять недель, по меньшей мере за 10 недель, по меньшей мере за 11 недель или по меньшей мере за 12 недель до 1-метил-триптофана (1-МТ).

HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированные клетки-предшественники, макрофаги, моноциты или вектор по настоящему изобретению можно вводить, по меньшей мере за один месяц, по меньшей мере за два месяца, по меньшей мере за три месяца, по меньшей мере за четыре месяца, по меньшей мере за пять месяцев, по меньшей мере за шесть месяцев, по меньшей мере за семь месяцев, по меньшей мере за восемь месяцев, по меньшей мере за девять месяцев, по меньшей мере за 10 месяцев, по меньшей мере за 11 месяцев или по меньшей мере за 12 месяцев до 1-метил-триптофана (1-МТ).

HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированные клетки-предшественники, макрофаги, моноциты или вектор по настоящему изобретению можно вводить, по меньшей мере за один месяц, по меньшей мере за два месяца, по меньшей мере за три месяца, по меньшей мере за четыре месяца, по меньшей мере за пять месяцев, по меньшей мере за шесть месяцев, по меньшей мере за семь месяцев, по меньшей мере за восемь месяцев, по меньшей мере за девять месяцев, по меньшей мере за 10 месяцев, по меньшей мере за 11 месяцев или по меньшей мере за 12 месяцев до 1-метил-триптофана (1-МТ).

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ

HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированные клетки-предшественники, макрофаги, моноциты, ингибиторы иммунной контрольной точки, ТАА-специфические

T-клетки, векторы, 1-метил-триптофан (1-MT) и их комбинации для применения в соответствии с настоящим изобретением быть составленным с фармацевтически приемлемыми носителем, разбавителем или вспомогательным веществом.

ПАЦИЕНТ

Пациентом может быть человек. Пациентом может быть животное, не человек.

Пациент может быть поражен раком. Альтернативно, пациент может подвергаться риску развития злокачественного новообразования.

Пациент, возможно, ранее был определен как обладающий риском развития злокачественного новообразования. Повышенный риск может быть определен путем генетического скрининга и/или анализа семейного анамнеза пациента. У пациента, возможно, была определена экспрессия одного или нескольких генетических маркеров, указывающих на повышенный риск развития злокачественного новообразования.

Соответственно, специалист в данной области должен знать о генетических факторах риска (например, генетических маркерах), связанных с повышенным риском развития злокачественного новообразования. Специалист в данной области может использовать любой подходящий способ или метод, известные в данной области, чтобы определить, имеет ли субъект повышенный риск развития злокачественного новообразования.

Субъект, возможно, ранее получал лечение от злокачественного новообразования. У индивида может быть ремиссия от злокачественного новообразования. Субъект может быть устойчивым к химиотерапии.

В некоторых аспектах настоящего изобретения пациенту ранее вводили гематопоэтическую стволовую клетку (HSC), гемопоэтическую прогениторную клетку (HPC), миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит по изобретению, до введения TAA-специфической T-клетки и/или ингибитора контрольных точек иммунитета.

В одном варианте осуществления HSC, HPC, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаги или моноциты по настоящему изобретению вводят пациенту по меньшей мере за 6 часов, по меньшей мере за 12 часов, по меньшей мере за 24 часа, по меньшей мере за 48 часов, по крайней мере, за 72 часа до TAA-специфической T-клетки и/или ингибитора контрольных точек иммунитета.

В одном варианте осуществления HSC, HPC, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит по настоящему изобретению можно вводить пациенту по меньшей мере за один день, по меньшей мере за два дня, по меньшей мере за три дня, по меньшей мере за четыре дня, по меньшей мере за пять дней, по меньшей мере за шесть дней, по меньшей мере за семь дней или по меньшей мере за 14 дней до TAA-специфической T-клетки и/или ингибитора контрольных точек иммунитета.

HSC, HPC, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит по настоящему изобретению можно вводить пациенту, по меньшей мере за одну неделю, по меньшей мере за две недели, по меньшей мере за три недели, по

меньшей мере за четыре недели, по меньшей мере за пять недели, по меньшей мере за шесть недель, по меньшей мере за семь недель, по меньшей мере за восемь недель, по меньшей мере за девять недель, по меньшей мере за 10 недель, по меньшей мере за 11 недель или по меньшей мере за 12 недель до ТАА-специфической Т-клетки и/или ингибитора контрольных точек иммунитета.

HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит по настоящему изобретению можно вводить пациенту по меньшей мере за один месяц, по меньшей мере за два месяца, по меньшей мере за три месяца, по меньшей мере за четыре месяца, по меньшей мере за пять месяцев, по меньшей мере за шесть месяцев, по меньшей мере за семь месяцев, по меньшей мере за восемь месяцев, по меньшей мере за девять месяцев, по меньшей мере за 10 месяцев, по меньшей мере за 11 месяцев или по меньшей мере за 12 месяцев до ТАА-специфической Т-клетки и/или ингибитора контрольных точек иммунитета.

В некоторых аспектах настоящего изобретения пациенту перед введением ранее вводили гематопоэтическую стволовую клетку (HSC), гемопоэтическую клетку-предшественник (НРС), миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит по изобретению, до введения 1-метил-триптофана (1-МТ).

В одном варианте осуществления HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит по настоящему изобретению вводят пациенту по меньшей мере за 6 часов, по меньшей мере за 12 часов, по меньшей мере за 24 часа, по меньшей мере за 48 часов, по крайней мере за 72 часа до введения 1-метил-триптофана (1-МТ).

В одном варианте осуществления HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит по настоящему изобретению вводят пациенту по меньшей мере за один день, по меньшей мере за два дня, по меньшей мере за три дня, по меньшей мере за четыре дня, по крайней мере за пять дней, по крайней мере за шесть дней, по крайней мере за семь дней или, по крайней мере за 14 дней до введения 1-метил-триптофана (1-МТ).

В одном варианте осуществления HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит по настоящему изобретению можно вводить пациенту, по меньшей мере за одну неделю, по меньшей мере за две недели, по меньшей мере за три недели, по меньшей мере за четыре недели, по меньшей мере за пять недель, по меньшей мере за шесть недель, по меньшей мере за семь недель, по меньшей мере за восемь недель, по меньшей мере за девять недель, по меньшей мере за 10 недель, по меньшей мере за 11 недель или по меньшей мере за 12 недель до введения 1-метил-триптофана (1-МТ).

В одном HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит по настоящему изобретению можно вводить пациенту по меньшей мере за один месяц, по меньшей мере за два месяца, по меньшей мере за три месяца, по меньшей мере за четыре месяца, по меньшей мере за пять месяцев, по меньшей мере за

шесть месяцев, по меньшей мере за семь месяцев, по меньшей мере за восемь месяцев, по меньшей мере за девять месяцев, по меньшей мере за 10 месяцев, по меньшей мере за 11 месяцев или по меньшей мере за 12 месяцев до введения 1-метил-триптофана (1-МТ).

Как человеческое, так и ветеринарное лечение входят в объем настоящего изобретения.

Термины «содержащий», «содержит» и «состоящий из», используемые в настоящем документе, являются синонимами «включающий» или «включает»; или «содержащий» или «содержит», и являются включающими или открытыми и не исключают дополнительных, не перечисленных элементов, элементов или стадий. Термины «содержащий», «содержит» и «состоящий из» также включают в себя термин «состоящий из».

Практика настоящего изобретения будет использовать, если не указано иное, общепринятые методы клеточной биологии, молекулярной биологии, гистологии, иммунологии, онкологии, которые находятся в пределах возможностей специалиста в данной области. Эти методы в полной мере описаны в литературе.

См., например, Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. et al. (1995 and periodic supplements) *Current Protocols in Molecular Biology*, Ch. 9, 13 and 16, John Wiley & Sons; Roe, B., Crabtree, J. and Kahn, A. (1996) *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; Polak, J.M. and McGee, J.O'D. (1990) *In Situ Hybridization: Principles and Practice*, Oxford University Press; Gait, M.J. (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; and Lilley, D.M. and Dahlberg, J.E. (1992) *Methods in Enzymology: DNA Structures Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA*, Academic Press. Каждый из этих общих текстов включен в настоящий документ посредством ссылки.

Различные предпочтительные признаки и варианты осуществления настоящего изобретения теперь будут описаны с помощью неограничивающих примеров.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 – IFN α , нацеленный на опухоль, усиливает T-клеточные противоопухолевые ответы в модели ALL

Мышам C57Bl/6 трансплантировали HSC, трансдуцированные либо *mTie2-IFN-mirT* LV (IFN mice), либо *mTie2-GFP-mirT* LV, или Mock-трансдуцированные (обе использовали в качестве контрольных мышей), чтобы нацелить экспрессию IFN/GFP на дифференцированное TIE2⁺ потомство моноцитов, которое сильно обогащено в опухолях^{15,16}. Как было показано ранее, реконструкция с помощью клеток, трансдуцированных *mTie2-IFN-mirT* LV, приводит к функциональному многолинейному трансплантату без явных побочных эффектов⁸⁻¹⁰. Затем реконструированных мышей с ранее описанной авторами изобретения моделью B-ALL (фиг. 1a) стимулировали антигеном и обнаружили ингибирование роста лейкемии у IFN по сравнению с контрольными мышами (фиг. 1b, c). Введение анти-CTLA4-блокирующего антитела

(α CTLA4) не оказывало влияния на контрольных мышей, но дополнительно и значительно улучшало ингибирование ALL у IFN мышей, что указывает на иммунный вклад в наблюдаемый ответ у IFN мышей. Комбинация генной терапии IFN и α CTLA4 значительно улучшила выживаемость мышей (фигура 21). Чтобы исследовать индукцию противоопухолевого иммунитета, были разработаны клетки ALL с лентивирусным вектором (LV), позволяющим координировать экспрессию модельного антигена овальбумина (OVA) и усеченной формы рецептора фактора роста нервов (NGFR) на поверхности клеток, маркера из двунаправленного промотора (OVA-ALL, фиг. 5a, b).

При введении иммунокомпетентным мышам C57Bl/6 OVA-ALL демонстрирует у части мышей более медленную кинетику роста и отсроченное начало по сравнению с исходным ALL. При вскрытии у всех мышей наблюдалась массивная инфильтрация BM клетками ALL с ростом NGFR негативных властных клеток у мышей с отсроченным заболеванием (фиг. 5c, d). Когда клетки OVA ALL инъецировали мышам с иммунодефицитом NOD-SCID-IL2Rg^{-/-} (NSG), наблюдался сравнимый рост опухоли в качестве родительских клеток и отсутствие потери экспрессии NGFR (фиг. 5c, e). В целом эти результаты указывают на повышенную иммуногенность варианта OVA-ALL, что приводит к иммунному редактированию и отбору редких не трансдуцированных или сайленсированных (OVA/NGFR-негативных) клонов ALL, вероятно присутствующих в продукте для инфузии. Однако ни одна из мышей не выжила ни в одном из испытаний. Таким образом была исследована способность переноса IFN клеток и генов в опухоль для усиления противоопухолевого иммунного ответа против OVA-ALL. Поскольку ALL быстро разрастались у контрольных мышей (фиг. 1d-f), отмечалось замедленное появление и

накопление властных клеток в крови и снижение инфильтрации в BM и селезенке IFN мышей. Следует отметить, что фракция IFN мышей показала отсутствие лейкемии во всех анализируемых органах.

Стимулированные *in vitro* очищенные CD8⁺ T-клетки селезенки от IFN мышей показали индукцию специфического ответа против OVA с помощью g-IFN-ELISPOT, при этом у мышей наблюдается увеличение числа клеток-с ответом, демонстрирующих наименьшую опухолевую нагрузку (фиг. 1g). OVA-специфичные CD8⁺ T-клетки были обнаружены окрашиванием OVA₂₅₇₋₂₆₄-H-2Kb-пентамером как у IFN, так и у контрольных мышей с более высоким процентом и количеством в крови и BM в первой группе (фиг. 1h-j и фиг. 6a). Более того, CD8⁺ T-клетки контрольных мышей не высвобождали IFN-g при повторной стимуляции *ex-vivo* OVA, как и T-клетки IFN мышей (Fig. 1k), что указывает на дисфункцию, что согласуется с отсутствием ингибирования опухоли в контроле против IFN мышей (фиг. 6b-d). Поразительно, что истощение CD8⁺ T-клеток у IFN мышей отменяет противоопухолевый ответ (фиг. 1l, m). В целом эти результаты указывают на индукцию CTL, способных вызывать эффективный ответ против опухолевого неоантигена у IFN мышей.

Отмечалось также начальная более низкая опухолевая нагрузка у IFN мышей,

истощенных по CD8, по сравнению с контролем, предполагая, что дополнительные механизмы помимо CD8–опосредованного контроля могут

способствовать, по крайней мере, первоначально и временно, ингибированию опухоли (фиг. 6е). Принимая во внимание, что не было различий во фракции апоптотических клеток и распределении клеточного цикла ВМ и клеток ALL селезенки между IFN и контрольными мышами (фиг. 7а–d), скорость пролиферации, измеренная путем включения EdU, была ниже в ВМ, но не в селезенке IFN мышей (фиг. 7е, f). Задержка пролиферации, которая может быть вызвана непосредственно IFN, может способствовать накоплению специфичных для опухоли CTL при эффективном соотношении эффектор и мишень для подавления роста опухолевых клеток.

Пример 2 – Адоптивно перенесенные трансгенные Т–клетки OT–I только размножаются и катализируют лейкоз у IFN мышей

Чтобы исследовать влияние IFN типа I на рекрутирование и активацию Т–клеток, были адоптивно перенесены наивные трансгенные OVA–специфические Т–клетки (OT–I) у IFN и контрольных мышей (фиг. 2а). Было скорректировано время инфузии между двумя группами для инфузии клеток OT–I с сопоставимым бременем лейкемии (фиг. 2b и фиг. 8а) и мышей анализировали через 3 дня. Наблюдалось значительно большее количество клеток OT–I в селезенке и ВМ у IFN мышей, которым инъецировали лейкемию, чем у контрольных мышей, у которых клетки OT–I были получены в небольшом количестве, аналогично контрольным клеткам, не имеющим опухоли (фиг. 2с). Цитофлуориметрический анализ показал, что большинство клеток OT–I активировали рецептор активирования LAG3 и приобретали фенотип центральной памяти или эффекторной памяти у лейкемических IFN и контрольных мышей с увеличением активации в первой группе.

Эти результаты резко контрастировали с контрольными мышами без опухолей, у которых клетки OT–I сохраняли наивный фенотип собранного продукта (фиг. 2d и фиг. 8b–d). Лейкемический груз был значительно снижен у IFN по сравнению с контрольными мышами уже на начальном этапе после адоптивного переноса Т–клеток (фиг. 8е). В то время как почти все лейкозные клетки контрольных мышей экспрессировали маркер NGFR, наблюдалось увеличение доли NGFR–негативных клеток у IFN мышей, что предполагает селективное давление против OVA–ALL (фиг. 8f).

Затем был исследован синергизм клеточной терапии IFN и адоптивный перенос Т–клеток OT–I в содействии выживанию (фиг. 2е). Принимая во внимание, что инфузия Т–клеток OT–I приводила к выживанию мышей на 20% по сравнению с отсутствием в контрольной группе, комбинированное лечение значительно улучшало выживаемость, до 67% (фиг. 2f). Продольный анализ IFN мышей+OT–I выявил расширение OT–I, достигающее пика через 6 дней после инфузии, сопровождаемое переходящей активацией LAG3 и клиренсом OVA–ALL (фиг. 2g, h и фиг. 9а). Следует отметить, что у тех IFN мышей+OT–I, которые скончались от заболевания (показано черным на фиг. 2g, h и фиг. 9а), наблюдался рост отрицательных по NGFR клеток ALL в крови и ВМ, что

подтверждает, что OVA–экспрессирующие лейкозные клетки были уничтожены инфузировавшими клетками OT–I (фиг. 9а, с). Наоборот, клетки OT–I у большинства контрольных мышей не смогли размножиться и показали конститутивно высокие уровни экспрессии LAG3, признак истощения Т–клеток (фиг. 2g, h). Соответственно, инфузировавшие клетки OT–I не смогли уничтожить OVA–экспрессирующие клетки В–ALL у этих мышей, о чем свидетельствует первоначальное, но временное снижение циркулирующих NGFR–экспрессирующих лейкозных клеток с последующим их ростом в крови и ВМ (фиг. 9b, d).

При вскрытии, в то время как хорошая фракция Т–клеток OT–I в ВМ, селезенке и лимфатических узлах IFN мышей+OT–I оставалась в качестве пула памяти и имела пониженную регуляцию ингибиторного PD1, большинство Т–клеток OT–I у мышей CTRL+ OT–I были обнаружены признаки истощения эффекторов, так как все они экспрессировали маркер PD1 (фиг. 9e, f). Как и ожидалось, Т–клетки OT–I, введенные контрольным мышам, которым не вводили опухоли, не расширялись и не повышали экспрессию Lag3 (фиг. 2g, h). В целом эти данные показывают, что, хотя клетки OT–I подвергались сильной активации и размножению у IFN мышей, что приводило к клиренсу опухоли, эти клетки были гипofункциональны у контрольных мышей, не могли размножаться и демонстрировали фенотипические признаки истощения.

Пример 3 – сигнатура праймированного иммунного гена в отношении ответов M1 и Th1 у IFN мышей; и генная терапия IFN компенсирует вызванные лейкемией изменения в микроокружении опухоли (TME) и налагает иммуностимулирующую программу

Чтобы выяснить, изменяет ли предложенная стратегия доставки генов IFN лейкемическую микросреду, способствующую индукции эффективных иммунных ответов, было проведено мультиплексное измерение экспрессии генов на панели генов 750, используемой для профилирования иммунитета при раке на селезенке и ВМ у контрольных и IFN мышей, до и после заражения лейкемией. Почти все активированные гены в обеих тканях IFN по сравнению с контрольными мышами были генами, стимулированными IFN (ISG), и в селезенке активация Т–клеток, процессинг антигена, активация макрофагов/DC, активация NK и врожденный иммунитет подтверждают, что предложенное лечение заставляет производить ответную реакцию IFN/Th1 в этих тканях. Эти изменения оставались очевидными после стимуляции антигеном опухоли и сопровождалась отрицательной негативной модуляцией лейкозно–ассоциированных генов (фиг. 3а). Затем были очищены CD4+ Т–клетки селезенки, чтобы детально исследовать выбранные гены, и была показана значительная положительная регуляция Tbx21, кодирующего фактор транскрипции Th1 TBET, и никаких изменений в прототипических генах Th2 и Treg у IFN по сравнению с контрольными мышами–опухоленосителями. Также наблюдалась активацию гена Il17 у IFN мышей, но это изменение не сопровождалось активацией других прототипных генов Il22 и Rorc Th17 (фиг. 3b и фиг. 10a).

Затем был охарактеризован фенотип миелоидных клеток в крови, селезенке и ВМ. Был обнаружен повышенный процент классических (Ly6C+Ly6Glow) и сниженный процент неклассических (Ly6C–Ly6G–) моноцитов в крови IFN по сравнению с контрольными мышами, и такие различия еще более усиливались при заражении лейкемией (фиг. 3с и фиг. 11а). Было также обнаружено увеличение циркулирующих гранулоцитов (Ly6Cint Ly6G+) у IFN мышей. Рост лейкемии в селезенке контрольных мышей сопровождался экспансией незрелых миелоидных клеток (CD11cint MHCII–F4/80–) и повышенным процентом MHC–II негативных макрофагов M2, тогда как ни одно из этих изменений не наблюдалось у IFN мышей (фиг. 11b–d). Связанные с лейкемией изменения также отсутствовали в миелоидных клетках ВМ IFN мышей, которые вместо этого показали увеличение DC и фракции DC, представляющей иммунодоминантный пептид OVA257–264 на MHC–I (фиг. 12а, b и фигура 18). Аналогично, изменения в клетках NK и NKT, наблюдаемые в селезенке и ВМ лейкозных мышей, включая снижение экспрессии активирующего рецептора NKG2D, у IFN мышей отсутствовали (фиг. 13а–е).

Анализ РНК–секвенирования (РНК–Seq) выявил лейкемические индуцированные транскрипционные изменения в макрофагах, которые были существенно нейтрализованы генной терапией IFN (фигура 22а, b). Макрофаги селезенки от ALL против контрольных мышей активировали гены, кодирующие иммуносупрессивный цитокин IL–10, ингибиторную контрольную точку иммунитета PD–1, а также гены, связанные с делением клеток и ответом на термины генной онтологии (GO) иммунных стимулов. Гены с пониженной регуляцией были обогащены в терминах GO, связанных с метаболизмом жирных кислот, активацией лейкоцитов и презентацией антигена (фигура 19а, с). IFN генная терапия у ALL мышей вызвала иммуностимулирующую программу, характеризующуюся повышенной активацией IFN–стимулированных генов (ISG), обогащенных защитным ответом, миграцией лейкоцитов и ответом на условия интерферона GO, и отмененной вызванной лейкемией повышенной регуляцией P10 и снижением регуляция генов MHC II (фигура 19b–d). Генная терапия IFN у ALL мышей индуцировала ISG на уровнях выше, чем у контрольной группы (фигура 19d и фигура 22а), и транскриптомы макрофагов от контрольных мышей и без IFN опухолевых мышей показали высокую корреляцию, хотя они были четко отличны от ALL и IFN+ALL группы (фигура 22b). Эти данные подтверждают и расширяют предыдущие сообщения о том, что предложенная моноцитарно–опосредованная генная терапия преимущественно направляет IFN на TME (De Palma, M. et al. (2008) *Cancer Cell* 14: 299–311; Escobar, G. et al. (2014) *Sci. Transl. Med.* 6: 217ra3; Catarinella, M. et al. (2016) *EMBO Mol. Med.* 8: 155–170).

Чтобы проанализировать влияние лейкемии и генной терапии IFN на TME более непредвзято, была проведена одноклеточная (sc)РНК–Seq на клетках CD11b+, выделенных из селезенки контрольных и мышей с опухолями, которых лечили или не лечили IFN генной терапией. Используя капельный метод (Zheng, G.X. et al. (2017) *Nat. Commun.* 8: 14049), были получены данные scРНК–Seq из 10 821 клеток, определив

среднее значение 1338 генов/клетку. Кластеризацией на основе графиков и анализом сигнатур генов с использованием опубликованных наборов данных (Lavin, Y. et al. (2014) *Cell* 159: 1312–1326; Varol, D. et al. (2017) *Immunity* 46: 1030–1044; ImmGen) идентифицировали 11 кластеров, соответствующих моноцитам (кл. 1–3), нейтрофилы (кл. 4–6), дендритные клетки (кл. 7), макрофаги (кл. 8), природные киллеры и Т–клетки (кл. 9) тучные клетки (кл. 10) и В–клетки (кл. 11). Гетерогенность наблюдалась в популяциях моноцитов и нейтрофилов, охватывающих неклассические (кл. 1) и классические (кл. 2) моноциты, кластер, совместно экспрессирующий гены моноцитов и нейтрофилов (кл. 3) (Yáñez, A. et al. (2017) *Immunity* 47: 890–902) и промежуточные звенья созревания нейтрофилов (фигура 19e и фигура 23a, b). Лейкемия оказала значительное влияние на транскрипционный ландшафт неклассических моноцитов (фигура 19f), которые были расширены в селезенке мышей с опухолями (см. фигура 11c). Другие популяции миелоидных клеток, в том числе макрофаги и DC, показали сравнительно меньше изменений, вызванных лейкемией (фигура 24). Связанные с опухолью неклассические моноциты, активировали гены, обогащенные терминами GO, такими как активация комплемента и отрицательная регуляция воспаления, в то время как они подавляют гены, связанные с процессингом и презентацией антигена (фигура 19g). Генная терапия IFN наложила управляемую ISG иммуностимулирующую программу на неклассические моноциты от ALL мышей, о чем свидетельствует активация генов, обогащенных терминами GO, связанных с защитой и врожденным иммунным ответом, а также генов МНС II (фигура 19g, h). Транскрипционное перепрограммирование TME с помощью генной терапии IFN было менее эффективным у неклассических моноцитов от мышей, которые не реагировали на генную терапию IFN (фигура 25a), что было выявлено с помощью кластеризации на основе графиков и дифференциальной экспрессии генов (фигура 19f, h). Субкластеризация данных scRNA–Seq по неклассическим моноцитам позволила идентифицировать четыре основных субкластера (от 1A до 1D; фигура 25b). Подкластер 1A состоял из клеток мышей, не страдающих заболеваниями, как у контрольных, так и у IFN мышей, тогда как остальные три субкластера в значительной степени перекрывались клетками от с ответом IFN+ALL (1B), не реагирующих IFN+ALL (1C) и ALL (1D). Анализ минимального остовного дерева (MST) выявил траекторию от 1A до 1D, подтверждая частичное и эффективное перепрограммирование в клетках не реагирующих в сравнении и с ответом IFN мышей (фигура 19i).

Неожиданно также было обнаружено увеличение количества FOXP3+CD25+CD4+ Т–клеток в ВМ у IFN мышей с инъекцией опухоли (фиг. 12c, d). В целом эти изменения согласуются с примированием к активации ответов M1 и Th1 у IFN мышей, что может способствовать, при заражении лейкемией, индукции защитного иммунного ответа.

Пример 4 – Обработка IFN индуцирует длительные противоопухолевые ответы, нацеленные на множественные опухолевые антигены

Далее было исследовано, может ли лечение IFN α , нацеленное на опухоль, также способствовать долгосрочным длительным ответам у мышей. Поразительно, но в среднем

24% (в среднем в 5 различных экспериментах, n=11, 14, 8, 16, 12) IFN мышей выжили в течение длительного времени и были эффективно излечены от заболевания, тогда как только 2% контрольных мышей (n=13, 14, 8, 16, 13) до него дожили (один показательный эксперимент показан на фиг. 4а и фиг. 14а). Следует отметить, что при распределении мышей по времени выживания мы обнаружили, что у мышей, подвергнутых эвтаназии в ранние сроки после инъекции опухоли, наблюдался низкий процент циркулирующих OVA–специфических Т–клеток и отсутствие появления NGFR негативных ALL (фиг. 14b). Напротив, мыши, подвергнутые эвтаназии в более поздние моменты времени, продемонстрировали индукцию переменного процента циркулирующих OVA–специфических Т–клеток и появление NGFR–негативных клонов ALL (фиг. 14b). Эти результаты позволяют предположить, что мыши, ставшие жертвой этой болезни, либо не смогли вызвать иммунный ответ и умерли очень рано, либо выработали анти–OVA–ответы, но в конечном итоге умерли из–за неспособности этих клеток защитить мышей, либо из–за истощения, либо из–за появления иммунно–отобранных OVA–негативных ALL клонов. Выжившие длительное время показали стабильные циркулирующие OVA–специфические Т–клетки и, после повторного заражения OVA–ALL, оставались без заболевания (фиг. 4b и фиг. 14c). Клиренс опухоли был связан с экспансией циркулирующих OVA–специфических Т–клеток, что позволяет предположить, что развитие ответов Т–клеток памяти играет ключевую роль в защите мышей от последующего заражения опухолью (фиг. 14d). Удивительно, но выжившие в течение длительного времени мыши IFN эффективно очищались как от OVA–экспрессирующих, так и родительских OVA–негативных ALL–клеток при повторном заражении этими клетками при соотношении 1: 1 или только родительскими клетками, что предполагает, что имело место распространение ответа на дополнительные опухолеспецифические антигены (ТАА), и могло быть необходимым для достижения долгосрочной долговременной защиты (фиг. 4c, d и фиг. 14e).

Пример 5 – Комбинация IFN лечения и блокады CTLA–4 повышает выживаемость при лейкозе

Затем была исследована комбинация терапии блокадой CTLA–4 с направленным на опухоль IFN α лечением в предложенной экспериментальной модели OVA–ALL (фиг. 4е). Принимая во внимание, что все группы лечения – генная терапия IFN или лечение одним α CTLA4 или их комбинацией – значительно увеличивали выживаемость мышей по сравнению с контролем, комбинированная терапия была более эффективной (IFN 21%; α CTLA4 20%; CTRL+антитело изотипического контроля 7%; IFN+ α CTLA4 36%; фиг. 4f и фиг. 15а), что было подтверждено во втором эксперименте (IFN+ α CTLA4 30% против α CTLA4 8%; фиг. 4g и фиг. 15b). Обработка IFN или α CTLA–4 увеличивала процент специфических для OVA207 Т–клеток в РВ, который дополнительно увеличивался в комбинированной группе (фиг. 16b). Соответственно, иммунный отбор NGFR–негативных ALL был более явным в группах IFN+ α CTLA4 и α CTLA4, хотя он не всегда сопровождался отсроченным течением заболевания (фиг. 16а), что позволяет

предположить, что иммунный ответ на один нео-антиген может не дает защиту от опухолей. Помимо доминантного антигена OVA, предложенная модель ALL также экспрессирует OFP (который коэкспрессируется с miR-126) и прокариотический транс-активатор tTA (который активирует экспрессию miR-126) в качестве потенциальных нео-антигенов, которые помогают управлять трансформированным фенотип (см. фиг. 1a). Были стимулированы мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) долгоживущих выживших мышей (из эксперимента, показанного на фиг. 4f) клетками-мишенями, трансдуцированными LV, экспрессирующими tTA, OFP, NGFR или OVA, и измерена продукция γ -IFN с помощью ELISPOT. Большинство из этих мышей показали способность к ответу против одного или нескольких нео-антигенов в дополнение к OVA, причем самый сильный ответ наблюдался против tTA и самый слабый против NGFR (фиг. 4h).

Эти данные показывают, что распространение иммунного ответа на дополнительные нео-антигены происходило у большинства выживших мышей. Затем эти мыши были повторно заражены при соотношении 1:1 OVA-позитивной и негативной ALL и было обнаружено, что большинство из них пережили повторное заражение. Интересно отметить, что анализ отдельных мышей показал, что у тех, которые не выжили, не удалось вызвать широкий ответ против опухолевых антигенов и/или погибли от набора клонов ALL, в которых отсутствует более одного неоантигена (дополнительная таблица 1). В качестве еще одного признака адаптивного иммунного ответа, лежащего в основе выживания мышей, было проведено сравнение репертуара TCR- β комплементарной определяющей области (CDR) PBMC до и после заражения лейкемией. Как продуктивная клональность (мера разнообразия в диапазоне от 0=поликлональная до 1=моноклональная у каждой мыши), так и сходство репертуара среди разных мышей увеличивались при повторном заражении лейкемией, что указывает на расширение клонов T-клеток, реагирующих на опухоль в сравнении с общим набором ТАА среди выживших мышей (фиг. 4i и фиг. 16c).

Чтобы дополнительно оценить, является ли генерация ответов на множественные нео-антигены прогностическим фактором длительного выживания, был проведен новый эксперимент и были собраны PBMC сразу после заражения OVA-ALL, чтобы исследовать реактивность T-клеток против всех известных ТАА с помощью анализа IFNg-ELISPOT. У мышей с противоопухолевым репертуаром, включающим в себя несколько ТАА, вероятность длительной выживаемости была гораздо выше, чем у мышей, реагирующих на единственный ТАА или без него, которые все умерли от болезни (фиг. 4j, k).

В целом эти данные показывают, что как генная терапия IFN, так и блокада CTLA4 увеличивают примирование T-клеток и расширяют репертуар ответа против неоантигенов опухоли, и что эти ответы могут быть аддитивными и длительно защищать от опухоли.

Пример 6 – Генная терапия IFN ускоряет активацию и расширение адаптивно перенесенных CAR19-трансдуцированных T-клеток и повышает выживаемость

Для дальнейшего изучения синергизма между генной терапией IFN и адаптивным

переносом Т-клеток в клинически релевантной модели были созданы Т-клетки, экспрессирующие ранее описанный CAR второго поколения (2G), нацеленный на CD19 мыши (клетки CART19) и включающий эндокостимулирующий домен CD28 (Kochenderfer, J.N. et al. (2010) *Blood* 116: 3875–3886), и обработанным мышам вводили родительский (OVA–негативный) ALL. Для переноса гена CAR был использован LV, который координирует экспрессию CAR и маркера NGFR от двунаправленного промотора (Casucci, M. et al. (2013) *Blood* 122: 3461–3472) (фигура 26а, b). Чтобы осуществить приживание клеток CART19 (Davila, ML et al. (2013) *PLoS One* 8: 1–14), перед инфузией мышей кондиционировали циклофосфамидом (фиг. 20а). Принимая во внимание, что одни клетки CART19 практически не влияли на быстро растущий ALL у контрольных мышей в представленных экспериментальных условиях, они значительно ингибировали бремя лейкемии и истощали нормальные В-клетки у IFN мышей (фигура 20b и фигура 26с). Напоминающий обнаружение Т-клеток OT-I, клетки CART19 выявили раннюю и преходящую активацию LAG3 и PD1 у IFN, но не у контрольных мышей, достигнув самого высокого пика в долгосрочной выжившей IFN (фигура 20с и фигура 26d, длительное выживание IFN показано зеленым цветом). Интересно отметить, что экспрессия NGFR также была положительно активирована на клетках CART19 IFN мышей, вероятно, отражая повышенную активность промотора фосфолипидкиназы (PGK) в ответ на более высокую метаболическую активацию клеток CART у IFN мышей (фигура 26е, f). Поскольку в рассматриваемом LV экспрессия NGFR и CAR19 совместно регулируется промотором PGK, более высокая экспрессия последнего, возможно, также способствовала более эффективному уничтожению CD19+ ALL у IFN мышей. Мы также протестировали улучшенную версию CD19 CAR (iCAR19), которая содержит инактивирующие мутации в первом и третьем доменах ITAM CD3zeta и, как сообщалось, улучшает эффективность уничтожения и повышает жизнеспособность Т-клеток по сравнению со стандартным CAR19 (Kochenderfer, J.N. et al. (2010) *Blood* 116: 3875–3886). Обработывали контрольных или IFN–мышей Т-клетками, экспрессирующими либо CAR19, либо контрольными Т-клетками с низким или высоким бременем лейкемии (фигура 20d и фигура 27а, b). В то время как клетки CART19 и iCAR19 оказывали заметное, но не значимое влияние на опухолевую нагрузку у контрольных мышей, они значительно ингибировали ALL у IFN мышей как в ранних, так и в поздних вмешательствах (фигура 20е). Также была подтверждена раннюю активацию LAG3 в обеих клетках CART19 IFN мышей (фигура 20f). Продольные анализы выявили пики экспансии iCAR19 у IFN мышей, сопутствующие ингибированию роста или клиренсу ALL, и раннюю активацию экспрессии NGFR/CAR19 у IFN мышей (фигура 27с, d). В целом значительная часть IFN мышей, обработанных клетками CART19, была еще жива при последнем наблюдении (фигура 20g).

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

План эксперимента

Размер выборки был выбран в соответствии с предыдущим опытом

экспериментальных моделей и анализов. Ни один образец или животное не были исключены из анализа. Мыши были случайным образом распределены в каждую экспериментальную группу. Исследователи были в «неслепом» исследовании.

Плазмидная конструкция и продуцирование LV

Ранее были описаны *mTie2*-IFN-mirT, *mTie2*-GFP-mirT, PGK-OFP, PGK-tTA LV^{9,10,14}. Передача NGFR-OVA BdLV была получена путем клонирования кДНК OVA (AgeI-SalI), амплифицированной из PGK-OVA LV37 с помощью PCR вместо cDNA GFP (AgeI-SalI) в NGFR-GFP BdLV38. Были использованы следующие праймеры: праймер Fw: 5'-CGACCGGTCCACAAAGACAGCACCATGACA; праймер Rv: 5'-ATTGTCGACTTAAGGGGAAACACATCTGCCAAAGA. NGFR-CD20 перенос BdLV был получен путем клонирования оптимизированной в отношении кодонов CD20 cDNA человека из синтезированной плазмиды (KpnI blunt-SalI) вместо GFP cDNA (AgeI blunt-SalI) в NGFR-GFP BdLV. NGFR-CAR19 и NGFR-iCAR19 перенос BdLV были получены путем клонирования последовательностей CAR19 и неактивных CAR19, описанных ранее (Kochenderfer, J.N. et al. (2010) Blood 116: 3875-3886) методом PCR вместо кДНК GFP (AgeI-SalI) в BDLV NGFR-GFP, используя следующие праймеры: праймер Rv (неактивный CAR19): 5'-AAACAGCTCCTCGAGTTATCTAGGGGCCA; праймер Rv (CAR19): 5'-AAACAGCTCCCTCGAGTCATCTAGGGGCCAGT; праймер Fw (CAR19 и неактивный CAR19): 5'-AACACCGGTGTACCGAATTCATGGGCGTG. Концентрированные VSV-G-псевдотипированные LV получали и титровали, как описано ранее (Follenzi, A. et al. (2000) Nat. Genet. 25: 217-222).

Мыши

Мыши C57Bl/6 Ly45.2 и Ly45.1 были приобретены в лаборатории Charles River. C57Bl/6 Ly45.1/Ly45.2 были получены скрещиванием мышей C57Bl/6 Ly45.2 и C57Bl/6 Ly45.1 в исследовательском центре на животных в Научном институте Сан-Раффаэле и использовались в качестве доноров для трансплантации НРС. Трансгенных мышей OT-I C57Bl/6 Ly45.2 содержали в виде колонии в исследовательском центре животных Научного института Сан-Раффаэле. Все процедуры на животных выполнялись в соответствии с протоколами, утвержденными Комитетом по уходу за животными и их использованию Научного института Сан Раффаэле (IACUC 600), и представлялись Министерству здравоохранения и местным органам власти в соответствии с итальянским законодательством.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (HSPC)

Трансплантация HSPC у мышей C57Bl/6

Шестинедельных мышей C57Bl/6 Ly45.2/Ly45.1 подвергали эвтаназии с помощью CO₂, а BM собирали путем промывки бедренных костей и голеней. Клетки негативной линии дифференцировки, обогащенные HS/PC, выделяли из общего BM с использованием системы очистки клеток на основе иммуномагнитной колонки (набор для истощения клеточной линии мышей, Miltenyi, № 130-090-858). 10⁶ клеток негативной линии/мл затем предварительно стимулировали в течение 3-4 часов в бессывороточной среде

StemSpan (StemCell Technologies), содержащей смесь цитокинов (20 нг/мл IL-3, 100 нг/мл SCF, 100 нг/мл FLT-3L, 50 нг/мл TPO (все от компании Peprotech) и затем трансдуцировали указанными лентивирусными векторами в дозе 10^8 трансдуцирующих единиц/мл в течение 12 часов в той же среде, содержащей цитокин. После трансдукции клетки промывали и 10^6 клеток вводили в хвостовую вену смертельно облученных 6-недельных самок C57Bl/Ly45.1. Дозы облучения были разделены по 935 сГр в двух дозах. Трансдуцированные клетки также культивировали *in vitro* в течение 15 дней в IMDM с добавлением 10% FBS, SCF (100 нг/мл), FLT3L (100 нг/мл), пенициллина (100 МЕ/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и 2% глутамина и затем тестировали вместе с клетками РВМС, выделенными от пересаженных мышей при стабильном гемопозитическом восстановлении (6 недель), для количественного определения VCN с помощью qPCR, как описано ранее (De Palma et al., Blood 2005).

Исследования опухолей

Мышь OVA-ALL

Субклон OVA-ALL был создан путем трансформации исходного клона ALL #1114 с NGFR-OVA BdLV. Вкратце, ALL содержали в культуре при концентрации 2×10^6 клеток/мл в Stem Span с добавлением 10% FBS, пенициллина (100 МЕ/мл), стрептомицина (100 мкг/мл), 2% глутамина, IL3 (20 нг/мл), SCF (100 нг/мл), FLT3L (100 нг/мл), TPO (50 нг/мл) и трансдуцировали при 2×10^7 TU/мл с NGFR-OVA BdLV. После 6 часов воздействия LV, трансдуцированный ALL был отмыт и внутривенно введен мышам C57Bl/6 Ly45.2, получавшим сублетальное облучение (450 сГр). Мышей с лейкемией умерщвляли через 14 дней, когда ALL достигал 90% от общего количества клеток РВ, и ВМ собирали путем промывки бедренных костей и голеней.

Клетки, трансдуцированные NGFR+, выделяли путем иммуно-магнитной маркировки клеток (CD271 MicroBead Kit, Miltenyi, #130-099-023). Чистоту выделенного ALL определяли анализом с помощью проточного цитометра путем мечения клеток антителом против NGFR и оценивали как 98% (NGFR+ ALL; см. фиг. 5a). Затем партию OVA-ALL замораживали в нескольких аликвотах, хранили в жидком азоте и использовали для всех экспериментов. Для заражения опухолями мышам внутривенно вводили дозу 10^5 OVA-ALL или 3×10^4 родительских ALL, ресуспендированных в 200 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS). Для экспериментов повторного заражения смешивали OVA-ALL и родительский (OVA-негативный) ALL в соотношении 1:1 (всего 10^5 ALL). Состав продукта для инфузии проверяли анализом с помощью проточного цитометра перед инъекцией *in vivo* путем мечения смешанных клеток антителом против NGFR. Кинетику роста опухоли определяли цитофлуориметрическим анализом при периодическом отборе образцов из РВ. Для исследований выживаемости мышей ежедневно осматривали, а при обнаружении признаков страдания оценивали состояние заболевания и затем подвергали эвтаназии, а ВМ и селезенку собирали в стерильных условиях для дальнейшего анализа. В экспериментах по блокированию CTLA-4 мышиное анти-мышиное моноклональное антитело к CTLA4 (mAb-клон 9D9 BioXCell, #BE0164)

или контрольное антитело изотипа мыши (mAb–клон MCP–11 BioXCell, #BE0086) вводили внутривенно со дня 3 после инъекции исходного ALL или OVA–ALL в начальной дозе 200 мкг/мышь и последующие дозы 100 мкг/мышь каждые 3–4 дня для всего пяти инфузий антител.

***In vivo* истощение CD8 T–клеток**

Для истощения T–клеток *in vivo* анти CD8 истощающее моноклональное антитело (mAb 53–6.72 BioXCell, #BE0004–1) вводили мышам внутривенно в дозе 200 мкг/мышь за день до инъекции OVA–ALL и затем каждые 3 дня в течение всей продолжительности эксперимента.

Адоптивный перенос T–клеток OT–I

Для экспериментов по адоптивным T–клеткам T–клетки OT–I очищали от селезенки 8–недельных трансгенных самок мышей OT–I C57Bl/6 Ly45.2 с помощью иммуно–магнитного отбора (набор для выделения CD8+ T–клеток, Miltenyi, #130–104–075). Чистоту отобранных OT–I T–клеток оценивали цитофлуориметрическим анализом с использованием панели анти–CD8, CD4 и CD3–антител. 1×10^6 наивных T–клеток OT–I инъецировали внутривенно трансплантированным мышам IFN или CTRL в указанное время после инъекции OVA–ALL.

Генерация клеток CART19

Сначала T–клетки очищали от селезенки самок мышей C57Bl/6 CD45.2+ в возрасте 8 недель иммунным магнитным отбором (набор для выделения T–клеток Pan, Miltenyi, #130–095–130) и затем активировали анти–CD3/CD28 бусинами Dyna (ThermoFisher #11452D) в соответствии с инструкциями производителя. T–клетки культивировали в RPMI с добавлением 10% FBS, пенициллина (100 Ед/мл), стрептомицина (100 мкг/мл), 1% глутамина, IL2 (30 ед/мл), IL7 (5 нг/мл), IL15 (5 нг/мл), Na пирувата (1 мМ), Hepes (20 мМ), NEAA (1 мМ) и бета–меркаптоэтанола (0,05 мМ). Через один день после активации T–клетки трансдуцировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл с 10^8 TU/мл BdLV NGFR–CAR19 или NGFR–iCAR19. Через 12 часов после воздействия LV T–клетки промывали и размножали в культуре в течение 8 дней перед инфузией мышам в дозе 7×10^6 (эксперимент на фигуре 20b) и 10^7 (эксперимент на фигуре 20e) NGFR+ T–клеток.

***In vivo* анализ пролиферации Edu**

Анализ пролиферации *in vivo* проводили с использованием 5–этинил–2′–дезоксинуридина (EdU, Invitrogen), аналога тимидина, используемого в качестве альтернативы BrdU. EdU растворяли в стерильном 1x PBS в концентрации 10 мг/мл. Мышам вводили внутривенно 100 мкг EdU за 24 часа до анализа. ВМ и селезенку собирали и обрабатывали в соответствии с инструкциями производителя (набор для анализа проточной цитометрии Click–iT® EdU, Invitrogen, #C10636), и процент включения EdU в лейкозную клетку измеряли анализом проточной цитометрией.

Клеточная культура и трансдукция

Линия клеток лимфомы, полученная от мыши EL4 C57Bl/6, содержалась в IMDM с добавлением 10% FBS, пенициллина (100 МЕ/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и 2%

глутамин. Трансдукцию проводили при концентрации 10⁶ клеток/мл при дозе 108 TU/мл указанного векторного ресурса. Клетки инкубировали в течение 12 часов и затем промывали для удаления вектора. OFP на трансдуцированных клетках оценивали через 7 дней культивирования методом проточной цитометрии. Экспрессию NGFR и CD20 оценивали путем окрашивания клеток анти-NGFR или анти-CD20 антителом через 7 дней после трансдукции (см. раздел проточной цитометрии). VCN трансдуцированных клеток определяли с помощью qPCR в реальном времени через 15 дней культивирования, как описано ранее (De Palma et al., Blood 2005).

Проточная цитометрия

Все цитометрические анализы были выполнены с использованием инструментов FACSCanto II и LSRFortessa (BD Bioscience) и проанализированы с помощью программного обеспечения FlowJo (v. 9.3, Tree Star Inc.).

Культивируемые клетки

Клетки EL4 промывали и ресуспендировали в PBS, содержащем 2% FBS. Для иммуноокрашивания клетки инкубировали с антителами, блокирующими Fc-рецептор мыши, в течение 15 минут при 4°C, а затем окрашивали в течение 20 минут при 4°C антителами против NGFR или против CD20 (антитела см. в дополнительной таблице 1). Чтобы исключить мертвые клетки из анализа, клетки промывали и ресуспендировали в PBS, содержащем 10 нг/мл 7-аминоактиномицина D (7-AAD).

Периферическая кровь

Для каждой мыши 250 мкл периферической крови добавляли к 10 мкл PBS, содержащего 45 мг/мл EDTA. Для иммуноокрашивания известный объем цельной крови (100 мкл) сначала инкубировали с антителами против мышинового рецептора FcγIII/II (Cd16/Cd32) в течение 10 минут при комнатной температуре, а затем инкубировали в присутствии моноклональных антител (антитела см. в дополнительной таблице 1) в течение 15 мин при комнатной температуре. Эритроциты удаляли лизированием на рабочей станции TQ-Prep (Beckman-Coulter) в присутствии равного объема FBS (100 мкл) для защиты лейкоцитов. Для количественной проточной цитометрии сначала окрашивали и лизировали известный объем крови (100 мкл), как описано выше, а затем добавляли фиксированный объем (50 мкл) Flow-count Fluorospheres с известной концентрацией Beckman Coulter, #7547053). Чтобы определить абсолютное количество клеток, была использована формула: Абсолютный подсчет клеток (клетка/мкл)=[Общее количество подсчитанных клеток/ (Общее количество подсчитанных флуоросфер×2)]×Концентрация Flow-count Fluorospheres. Для окрашивания OVA-специфическим пентамером цельную кровь сначала лизировали с помощью H₂O. Затем 1×10⁶ PBMC ресуспендировали в 50 мкл PBS, содержащего 2 mM ЭДТА и 0,5% бычьего сывороточного альбумина (BSA), и инкубировали с антителами, блокирующими анти-мышинный FcγIII/II рецептор (Cd16/Cd32), в течение 10 минут при комнатной температуре, а затем с OVA-специфичным пентамерным реагентом (0,5 мкг/1×10⁶ клеток) и моноклональными антителами (антитела см. в дополнительной таблице 1) в течение еще 10 мин при

комнатной температуре. Чтобы исключить мертвые клетки из анализа, клетки промывали и ресуспендировали в PBS, содержащем 2% FBS и 10 нг/мл 7-аминоактиномицина D (7-AAD). Для окрашивания клеток Treg в PB сначала проводили поверхностное окрашивание на 50 мкл цельной крови (антитела см. в дополнительной таблице 1), как описано выше. Затем окрашенную цельную кровь промывали и ресуспендировали в 100 мкл раствора для фиксации/проницаемости (eBioscience, #00-5523-00) и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре, промывали и ресуспендировали в 50 мкл раствора для проницаемости, содержащего анти-мышиный FoxP3 или изотип контрольных антител, и выдерживали в течение 20 мин при комнатной температуре.

Костный мозг

Клетки BM получали путем промывки бедренной кости в 2%-ном растворе FBS PBS и пропускания суспензии клеток через нейлоновый фильтр 40 мкм. Клетки (1×10^6 – 3×10^6 клеток) промывали, ресуспендировали в 100 мкл PBS, содержащего 2 mM EDTA и 0,5% бычьего BSA, и инкубировали с антителами, блокирующими анти-мышиный FcyIII/II рецептор (Cd16/Cd32), в течение 15 минут при 4°C. Затем проводили окрашивание моноклональными антителами (антитела см. в дополнительной таблице 1) в течение 20 минут при 4°C. Для окрашивания OVA-специфическим пентамером 1×10^6 BM-клеток окрашивали, как описано выше для PB. Для всех внутриклеточных окрашиваний и для некоторых поверхностных окрашиваний использовалось фиксируемое окрашивание мертвых клеток LIVE/DEAD (ThermoFisher, #L34959) для различения живых и мертвых клеток в соответствии с инструкциями производителя. Для окрашивания Treg в BM сначала выполняли поверхностное окрашивание на 1×10^6 BM-клетках, как описано выше для PB.

Селезенка

Селезенку сначала разрезали на кусочки и полученную клеточную суспензию пропускали через нейлоновый фильтр 40 мкм. Эритроциты лизировали с помощью H₂O, и полученную суспензию клеток затем пропускали через нейлоновый фильтр 40 мкм и промывали в холодном PBS, содержащем 2 mM EDTA и 0,5% BSA. Клетки обрабатывали и иммуноокрашивали, как описано выше для BM.

Окрашивание клеточного цикла

Клетки BM и спленоциты от мышей, которым инъецировали OVA-ALL, собирали, как описано выше. Затем клетки окрашивали на поверхностные маркеры, промывали и фиксировали с использованием буфера BD Cytotfix (BD #554655), промывали и пермеализировали в BD Perm 2 (BD #347692), промывали и окрашивали PerCP-Cy5.5-или APC-конъюгированным антителом Ki67 и, наконец, ресуспендировали в буфере BD Cytotfix с Hoechst при концентрации 1 мкг/мл. Затем клетки анализировали на приборе BD LSRFortessa с УФ-лазером.

Окрашивание апоптоза клеток

Клетки BM и спленоциты от мышей, которым инъецировали OVA-ALL, собирали, как описано выше. Затем клетки окрашивали поверхностными маркерами, как описано

выше. Затем окрашенные клетки дважды промывали буфером для окрашивания клеток (BioLegend, #420201) и ресуспендировали в буфере для связывания аннексина V (Biolegend #422201) и инкубировали с 5 мкл аннексина V, конъюгированного с флуоресцирующей меткой Pacific Blue Thermo Fisher Scientific, и 10 мкл 7-AAD (Biolegend, #420403/420404) в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем к каждому образцу добавляют 400 мкл буфера для связывания аннексина V и процентный состав апоптотических/мертвых клеток в OVA-ALL измеряют с помощью проточной цитометрии в течение 30 минут после окрашивания.

ELISPOT анализ

ELISPOT для g-IFN проводили в 96-луночном плоскодонном планшете (Millipore), покрытом 5 мкг/мл анти мышинового IFN-g первичного антитела (BD, #554430). CD8+ эффекторные T-клетки селезенки сначала очищали путем иммуно-магнитной маркировки клеток (CD8 MicroBead Kit, Miltenyi, #130-049-401), а чистоту оценивали с помощью цитофлуориметрического анализа с использованием панели анти CD8, CD4 и CD3 антител. Эффекторные T-клетки затем высеивали в конечной концентрации 10^5 или 2×10^5 клеток/лунку в присутствии облученных (6000 сГр) 10^5 клеток-мишеней EL4. В некоторых экспериментах также стимулировали эффекторные T-клетки с помощью 2,5 мкг/мл конканавалина А в качестве контроля. После 46 часов инкубации при 37°C/5% CO₂ клетки промывали и инкубировали с биотинилированным анти мышинового IFN-g антителом (клон XMG 1.2, BD #554410, 1 мкг/мл) в течение двух часов. Затем планшеты четыре раза промывали PBS-Tween, затем 3 раза PBS, а затем добавляли авидин-POD (Roche #11089153001) (1: 5000, разведенный в PBS) в течение 1 часа. Затем планшеты четыре раза промывали PBS-Tween, а затем 3 раза PBS, а затем в каждую лунку в течение 15-20 минут добавляли 50 мкл субстрата 3-амино-9-этилкарбазола (AEC, SIGMA #A6926/50tab). Реакцию останавливали добавлением водопроводной воды, и пятна количественно определяли с помощью ELI-Expert.Elispot-Reader и анализировали с помощью Eli.Analyze Version 5.1 (A.EL.VIS). При использовании общего PBMC в качестве эффекторных клеток, общую кровь сначала лизировали с помощью H₂O для эритроцитов, извлеченные PBMC подсчитывали и высеивали в конечной концентрации 10^5 клеток/лунку.

Экстракция РНК, qPCR и анализ экспрессии генов

Экстракцию РНК из клеток ВМ, спленоцитов и очищенных T-клеток селезенки CD4+ проводили с использованием набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen). Клетки лизировали в буфере RLT plus, дополненном бета-меркаптоэтанолом. Затем лизат пропускали через иглу 20-го калибра. РНК затем экстрагировали в соответствии с инструкциями производителя. Извлеченные мРНК транскрибировали с использованием набора SuperScript Vilo (11754250; Invitrogen). Все анализы Q-PCR на отдельных генах были выполнены с использованием зондов TaqMan от Applied Biosystems (см. ниже). QPCR выполняли в течение 40 циклов с использованием инструмента Vii_a 7, тогда как программное обеспечение Vii_a 7 затем использовали для извлечения необработанных данных (Ct). Чтобы определить экспрессию гена, была рассчитана разница (Δ Ct) между

пороговым циклом (Ct) каждого гена и пороговым циклом сравнения. Чем ниже ΔC_t , тем выше уровень экспрессии гена. Чтобы получить относительные количественные значения, затем были рассчитаны экспрессия представляющего интерес гена с кратным изменением по сравнению с его экспрессией в контрольном образце по формуле $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Значения p рассчитывают на основе средних значений $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Манна–Уитни для каждого гена между двумя группами.

Следующие Taqman–зонды использовали на очищенных CD4⁺ Т–клетках селезеночной мыши: *Il10* (Mm00439616_m1), *Il17* (Mm00439618_m1), *Ifn-g* (Mm01168134_m1), *Il2*

(Mm00434256_m1), *Tbx21* (TBET) (Mm00450960_m1), *Rorc* (Mm01261022_m1), *Foxp3* (Mm00475156_m1), *Gata3* (Mm00484683_m1), *Il22* (Mm00444241_m1), *Il4* (Mm00445259_m1).

TCR секвенирование

Входящая ДНК была получена из PBMC IFN и CTRL мышей перед инъекцией опухоли (T0), через 30 дней после инъекции OVA–ALL у мышей с длительным выживанием без опухолей (T1) и через 4 дня после повторного заражения OVA–ALL и родительской инъекцией ALL смешано в соотношении 1:1 (T2). Секвенирование цепи TCR β проводили в адаптивных биотехнологиях с использованием платформы ImmunoSEQ с праймерами, специфичными для всех 54 известных экспрессированных V β и всех 13 областей J β . Каждая уникальная CDR–матрица на уровне аминокислот была определена количественно на миллион (cpm). Клональность

оценивалась как $1 - \text{равномерность распределения по Пиелу}$ ³⁹:

$$c = 1 - \frac{H'}{H}$$

Где H' обозначает энтропию образца, рассчитанную по количеству шаблонов, превышающему 0 (*то есть* набор всех наблюдаемых матриц у мыши), а H обозначает максимальную теоретическую энтропию для мыши, определяемую как

$$H = \ln(S)$$

Где S – количество различных матриц в мышке. Сходство оценивали как $1 - \text{расстояние Брея–Кертиса}$ между образцом s и средним числом шаблонов в момент времени t .

$$s_t = 1 - \frac{\sum_i |s_{i,t} - \bar{s}_{i,t}|}{\sum_i |s_{i,t} + \bar{s}_{i,t}|}$$

Эта мера эквивалентна индексу подобия Соренсена–Дайса и была оценена с учетом всех i наблюдаемых матриц в момент времени t .

Объединенное РНК–секвенирование

РНК выделяли из 10000–50000 отсортированных клеток с использованием системы ReliaPrep РНК MiniPrep (Promega), а библиотеки РНК–Seq готовили по протоколу SMART–Seq2 (Picelli, S. et al. (2014) Nat. Protoc. 9: 171–181), с незначительными

изменениями. Вкратце, РНК (1–5 нг) подвергали обратной транскрипции с использованием пользовательских олигодТ и олиго LNA с переключением матриц (последовательностей) с последующей PCR амплификацией и очисткой (бусины Ampure XP, Beckman Coulter). Полученную кДНК (0,5–1 нг) метили при 55°C в течение 30 минут, и конечные библиотеки РНК–Seq генерировали с использованием реагентов из набора для подготовки библиотеки Nextera XT DNA (Illumina). Секвенирование проводили на приборе NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA) с использованием набора NextSeq 500/550 High Output v2 (75 циклов).

Одноклеточное РНК–секвенирование

Цифровой 3′–концевой scРНК–Seq на основе капел выполняли на Chromium Single–Cell Controller (10X Genomics, Pleasanton, CA) с использованием набора реагентов Chromium Single Cell 3′ Reagent Kit v2 в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, суспендированные отдельные клетки распределяли в Gel Beads–in–Emulsion (GEM) и лизировали с последующим штрих–кодированием РНК, обратной транскрипцией и амплификацией PCR (12–14 циклов). Готовые к секвенированию scРНК–Seq были приготовлены в соответствии с инструкциями производителя, проверены и количественно определены на приборах 2100 Bioanalyzer (Agilent Genomics, Santa Clara, CA) и Qubit 3.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Секвенирование проводили на приборе NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA) с использованием набора NextSeq 500/550 High Output v2 (75 циклов).

Вычислительные методы

Необработанные чтения были обработаны и приведены в соответствие с транскриптомом ENSEMBL mm10 с использованием CellRanger версии 1.3 (поддержка <https://10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/software/pipelines/latest/what-is-cell-ranger>) с параметрами по умолчанию. Были сохранены только достоверно сопоставленные операции считывания, дубликаты без PCR с действительными штрих–кодами и UMI (Unique Molecular Identifiers). Клетки низкого качества отфильтровали. Требовалось минимум 300 уникальных генов, обнаруженных для клеток, кроме того, отбрасывали клетки с соотношением митохондриальной и эндогенной экспрессии генов, превышающим 0,1. Полученные 10821 клеток были сохранены для дальнейшего анализа. Значения экспрессии генов определяли количественно в транскрипте, преобразованном в log на миллион [$\log(\text{TPM}+1)$]. Последующие анализы выполнялись с использованием программного пакета R Seurat версии 2.1 (<https://github.com/satijalab/seurat/>). Кластеризацию клеток и анализ tSNE проводили на 1031 большинстве переменных генов, отобранных со средней экспрессией выше 0,01 и логарифмически измененной дисперсией к среднему соотношению выше 0,5.

Анализ данных Nanostring

Экспрессию РНК оценивали на приборе nCounter SPRINT с использованием nCounter PanCancer Immune Profiler для панели мыши (Nanostring Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Количество транскриптов, полученных с помощью NanoString®, обрабатывали следующим образом. Необработанные значения в

файлах RSC были нормализованы с использованием библиотеки R/Bioconductor NanoStringNorm (v 1.1.21)⁴⁰; вариация технического анализа была нормализована с использованием среднего геометрического внутреннего контроля, оценка фона была рассчитана с использованием среднего значения отрицательных контролей, количества РНК были нормализованы с использованием среднего геометрического значения экспрессии конститутивных генов, была применена дополнительная стабилизация дисперсии. Дифференциальную экспрессию нормализованных данных оценивали с помощью линейных моделей, реализованных в библиотеке R/Bioconductor limma library⁴¹. Транскрипты считали дифференциально выраженными с порогом скорректированного значения $p < 0,05$ (коррекция Бенджамини–Хохберга).

Статистический анализ

Значения выражены в виде среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM), как указано. Статистический анализ выполняли с помощью теста Манна–Уитни или теста Крускала–Уоллиса с последующей после экспериментальной коррекцией по тесту Данна, если не указано иное. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Анализы были выполнены с использованием R 3.2.2⁴², NPC Test R10⁴³ и Prism (GraphPad Prism версия 7.0). Анализ клеточных популяций на фиг. 2 был выполнен непараметрическим комбинированным тестом⁴³, который представляет собой критерий перестановок, альтернативный параметрическому критерию Т–квадрата Хотеллинга для двух выборок. Эта методология позволяет проводить многомерное сравнение средних значений в группах с небольшим количеством наблюдений, которые не удовлетворяют предположению о многомерной нормальности. Фиг. 1a, 1, фиг. 16b, фиг. 17 и фиг. 20b, e были смоделированы в непараметрических рамках, которые позволяют учесть небольшой размер выборки, наличие выбросов, негауссово и сильно искаженное распределение данных, для которых параметрические процедуры не подходят. Был применен надежный и гибкий ранговый метод, подходящий для продольного анализа в факториальном проектировании^{44,45}. В этом контексте проверка гипотез направлена на выявление различий в распределении собранных переменных, а не на различие между средствами^{46,47}. Этот анализ был реализован с использованием пакета prarLD, разработанного в R46. Кривые выживания оценивали с помощью процедуры Каплана–Мейера (КМ). Рассматриваемая в настоящем документе событийная переменная представляла собой время до гибели, информативное цензурирование не осуществляется. Непараметрическая логарифмическая шкала (Mantel–Haenszel) использовалась для сравнения k кривых выживаемости, связанных с k –образцами⁴⁸. При наличии более 2 групп проблема множественного сравнения была решена путем корректировки значения p методом Бонферрони.

Пример 7

Была разработана новая лентивирусная векторная конструкция для опухолеспецифической экспрессии интерферона–гамма (IFN γ), интерферона II типа. Специфичность к опухоли обеспечивается за счет контроля транскрипции через

последовательности энхансера/промотора из локуса Tie2 (Tek), которые избирательно управляют экспрессией трансгена в подмножестве инфильтрирующих опухоль миелоидных клеток, в то же время предотвращая экспрессию в гематопозитических стволовых и прогениторных клетках с помощью последовательностей–мишеней микроРНК, распознаваемых miR–126–3p и miR–130a, как описано ранее (Escobar, G. et al. (2014) *Sci Transl Med* 6: 217ra3). Эта конструкция была названа «Tig126/130a».

Аналогичная конструкция для экспрессии интерферона–альфа под контролем Tie2 и последовательности–мишени miR–126 (то есть Tie2.Ifna.126T) была названа «Tia126».

В дополнение к векторам Tig126/130a и Tia126 авторами был разработан лентивирусный вектор, несущий cDNA гена фактора некроза опухоли альфа (Tnfa), который был назван «Tta126/130a». Структура конструкций (например, Tig126/130a и Tta126/130a) показана на фигуре 28.

Терапия проводится путем трансформации ex vivo гематопозитических стволовых и прогениторных клеток (HSPC) с Tig126/130a с последующей трансплантацией сконструированных клеток условному реципиенту. После приживления потомство HSPC будет расширяться и дифференцироваться, и некоторые из них будут рекрутированы в микроокружение опухоли. Активность промотора специфически активируется в подмножестве инфильтрирующих опухоль моноцитов/макрофагов, в частности, в моноцитах/макрофагах, экспрессирующих Tie2 (TEM), которые локализуются в периваскулярных областях и имеют проангиогенные и иммуносупрессивные функции (De Palma, M. et al. (2005) *Cancer Cell* 8: 211–226; De Palma, M. et al. (2008) *Cancer Cell* 14: 299–311), доставляя груз (например, IFN γ) в это стратегическое положение.

Авторы использовали трансплантируемую модель острого лимфобластного В–лейкоза (В–ALL), близко имитирующую человеческий филадельфийский В–ALL (Nucera, S. et al. (2016) *Cancer Cell* 29: 905–921), которая легко индуцирует противоопухолевую, иммуносупрессивную среду, характеризующуюся, например, появлением миелоидных клеток–супрессоров, понижающей регуляцией генов МНС класса II и повышающей регуляцией IL10 и PD1.

Сначала оценивались последствия доставки IFN γ на основе Tig126/130a для роста лейкемии и микроокружения в опухоли, вызванного лейкемией (фигура 29).

Мышей C57/BL6 в возрасте от 6 до 8 недель преобразовывали с помощью HSPC негативной линии, трансдуцированных либо Tig126/130a, Tta126/130a, либо контрольным лентивирусным вектором, экспрессирующим биологически неактивный, укороченный ген рецептора фактора роста нервов (NGFR). Дозировка Tig126/130a и Tta126/130a была количественно определена как число копий вектора 1,39 и 2,01, соответственно, in vitro, и 0,44 и 0,83, соответственно, in vivo. Через восемь недель после пересадки при восстановлении периферической крови животные получали В–ALL, после чего следовал частый сбор крови. По сравнению с контрольными животными мыши, сконструированные для экспрессии IFN γ , показали значительно более медленное прогрессирование заболевания (фигура 29А). Более того, при умерщвлении наблюдалась повышенная

регуляция экспрессии МНС класса II на макрофагах селезенки (фигура 29B), а также уменьшение количества миелоидных клеток–супрессоров в костном мозге (фигура 29C), указывающих на превращение микроокружения опухоли в более противоопухолевое, «M1–подобное» состояние поляризации. Степень ингибирования лейкоза генной терапией Tig126/130a была сравнима с тем, что ранее наблюдалось с грузом интерферона I типа (а именно, с интерфероном–альфа), используя аналогичный векторный скелет (Tia126), ту же платформу доставки и ту же модель лейкемии. Напротив, вектор Tta126/130a не оказывал заметного влияния на рост лейкемии, если он использовался в качестве монотерапии.

Затем авторы объединили одновременную доставку нескольких иммуностимулирующих цитокинов в микросреду лейкемии, используя векторную цепь Tie2, снабженную различными трансгенными грузами. Были совместно трансдуцированы HSPC негативной линии с дублетными комбинациями векторов Tia126, Tig126/130a и Tta126/130a по сравнению с монотерапией Tia126 или контрольной группой, трансдуцированной биологически неактивным Tie2. Вектор NGFR, и трансплантировали клетки летально облученным реципиентным мышам. Мыши восстанавливаются, как ожидалось, без аддитивной токсичности из–за комбинированной экспрессии цитокинов. Количество копий векторов отдельных векторов, измеренное определенными количественными анализами PCR, было довольно низким, в диапазоне от 0,1 до 0,3 у преобразованных мышей. Мышей заражали B–ALL, как описано выше. Отдельно Tia126 показал снижение роста лейкемии по сравнению с контролем, аналогично комбинациям с Tig126/130a или Tta126/130a (фигура 30A).

Неожиданно комбинация Tig126/130a и Tta126/130a привела к резкому снижению прогрессирования лейкемии, связанному со значительным увеличением экспрессии МНС класса II на макрофагах селезенки (фигура 30B), снижением MDSC (фигура 30C) и увеличением цитотоксических CD8+ Т–клеток в селезенке (фигура 30D). Эти данные предполагают синергизм между IFN γ и TNF α , локально экспрессируемым в микроокружении опухоли через лейкемию, проникающую в миелоидные клетки под контролем энхансера/промотора Tie2.

Кроме того, оценивалась потенциальная синергия предлагаемой доставки IFN γ на основе генной терапии с другими иммунотерапевтическими стратегиями, включая ингибиторы контрольных точек анти–CTLA–4 и анти–LAG–3 и ингибитор фермента IDO, l–метил–триптофан (l–MT). Были трансдуцированы HSPC негативной линии с Tig126/130a или контрольным биологически неактивным Tie2. Вектор NGFR, и трансплантировали клетки летально облученным реципиентным мышам. Мыши восстанавливаются, как ожидалось, без аддитивной токсичности из–за комбинированной экспрессии цитокинов. Число копий векторов отдельных векторов, измеренное определенными количественными анализами PCR, составляло 0,72 для Tig126/130a и 0,84 для контролей у преобразованных мышей. Мышей заражали B–ALL, как описано выше.

Наблюдалось, что в то время как анти–CTLA–4 (α CTLA4) и анти–LAG–3 (α LAG3)

уже продемонстрировали некоторую эффективность в монотерапии в снижении прогрессирования В–ALL, лечение 1–MT не оказывало положительного эффекта (фигура 31А). Более того, комбинация доставки IFN γ на основе генной терапии с 1–MT и ингибиторами контрольных точек повысила эффективность лечения, что привело к снижению прогрессирования заболевания (фигура 31А), связанного со значительным увеличением экспрессии МНС класса II на селезенке и макрофаги костного мозга (фигуры 31А и 31В) и увеличением цитотоксических CD8 $^+$ Т–клеток в селезенке (фигура 31D).

ССЫЛКИ

1. Khalil, D. N., Smith, E. L., Brentjens, R. J. & Wolchok, J. D. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 273–290 (2016).
2. Topalian, S. L., Drake, C. G. & Pardoll, D. M. Immune Checkpoint Blockade : A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell* **27**, 450–461 (2015).
3. Schadendorf, D. *et al.* Pooled Analysis of Long–Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **33**, 1889–94 (2015).
4. Pitt, J. M. *et al.* Resistance Mechanisms to Immune–Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor–Intrinsic and –Extrinsic Factors. *Immunity* **44**, 1255–1269 (2016).
5. Parker, B. S., Rautela, J. & Hertzog, P. J. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 131–44 (2016).
6. Hervas–Stubbs, S. *et al.* Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clin. Cancer Res.* **17**, 2619–27 (2011).
7. Fuertes, M. B., Woo, S. R., Burnett, B., Fu, Y. X. & Gajewski, T. F. Type I interferon response and innate immune sensing of cancer. *Trends Immunol.* **34**, 67–73 (2013).
8. De Palma, M. *et al.* Tumor–Targeted Interferon–Alpha Delivery by Tie2–Expressing Monocytes Inhibits Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Cell* **14**, 299–311 (2008).
9. Escobar, G. *et al.* Genetic engineering of hematopoiesis for targeted IFN– α delivery inhibits breast cancer progression. *Sci. Transl. Med.* **6**, 217ra3 (2014).
10. Catarinella, M. *et al.* IFN α gene/cell therapy curbs colorectal cancer colonization of the liver by acting on the hepatic microenvironment. *EMBO Mol. Med.* **8**, 155–70 (2016).
11. Fesnak, A. D., June, C. H. & Levine, B. L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 566–81 (2016).
12. Rosenberg, S. A. & Restifo, N. P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science (80–.)*. **348**, 62–68 (2015).
13. Sotillo, E. *et al.* Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART–19 immunotherapy. *Cancer Discov.* **5**, 1282–1295 (2015).
14. Nucera, S. *et al.* микроРНК–126 Orchestrates an Oncogenic Program in B Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* **29**, 905–921 (2016).
15. De Palma, M., Venneri, M. A., Roca, C. & Naldini, L. Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat.*

Med. **9**, 789–95 (2003).

16. De Palma, M. *et al.* Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* **8**, 211–26 (2005).

17. Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **480**, 480–9 (2011).

18. Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E. & Gabrilovich, D. I. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol.* **37**, 208–220 (2016).

19. Ruffell, B. & Coussens, L. M. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* **27**, 462–472 (2015).

20. Joyce Johanna A. and Fearon Douglas T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science (80-)*. **348**, (2015).

21. Verdegaal, E. M. E. *et al.* Neoantigen landscape dynamics during human melanoma–T cell interactions. *Nature* **536**, 91–5 (2016).

22. Matsushita, H. *et al.* Cancer exome analysis reveals a T–cell–dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* **482**, 400–4 (2012).

23. Linnemann, C. *et al.* High–throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo–antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat Med* **21**, 81–85 (2015).

24. Lu, Y. C. *et al.* Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions. *Clin. Cancer Res.* **20**, 3401–3410 (2014).

25. McGranahan, N. *et al.* Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science (80-)*. **351**, 1463–1469 (2016).

26. Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science (80-)*. **348**, 69–74 (2015).

27. Sharma, P. & Allison, J. P. Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy: Toward Combination Strategies with Curative Potential. *Cell* **161**, 205–214 (2015).

28. Schildberg, F. A., Klein, S. R., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. Coinhibitory Pathways in the B7–CD28 Ligand–Receptor Family. *Immunity* **44**, 955–972 (2016).

29. Yang, X. *et al.* Targeting the Tumor Microenvironment with Interferon– β Bridges Innate and Adaptive Immune Responses. *Cancer Cell* **25**, 37–48 (2014).

30. Huang, T.–H., Chintalacheruvu, K. R. & Morrison, S. L. Targeting IFN–alpha to B Cell Lymphoma by a Tumor–Specific Antibody Elicits Potent Antitumor Activities. *J. Immunol.* **179**, 6881–6888 (2007).

31. Wilson, E. B. *et al.* Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* **340**, 202–7 (2013).

32. Sandler, N. G. *et al.* Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature* **511**, 601–605 (2014).

33. Joseph Benci, A. L. *et al.* Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell* **167**, 1540–1554 (2016).

34. Gentles, A. J. *et al.* The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* **21**, 938–945 (2015).
35. Mlecnik, B. *et al.* Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity* **44**, 698–711 (2016).
36. Bachireddy, P., Burkhardt, U. E., Rajasagi, M. & Wu, C. J. Haematological malignancies: at the forefront of immunotherapeutic innovation. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 201–215 (2015).
37. Mátrai, J. *et al.* Hepatocyte-targeted expression by integrase-defective lentiviral vectors induces antigen-specific tolerance in mice with low genotoxic risk. *Hepatology* **53**, 1696–1707 (2011).
38. Amendola, M., Venneri, M. A., Biffi, A., Vigna, E. & Naldini, L. Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters. *Nat. Biotechnol.* **23**, 108–116 (2005).
39. Tumeh, P., Harview, C., Yearley, J. & Al, E. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568–571 (2014).
40. Waggott, D. *et al.* NanoStringNorm: An extensible R package for the pre-processing of nanostring мПНК and микроПНК data. *Bioinformatics* **28**, 1546–1548 (2012).
41. Ritchie, M. E. *et al.* limma powers differential expression analyses for ПНК742 sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47 (2015).
42. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing Vienna Austria* **0**, {ISBN} 3–900051–07–0 (2016).
43. Pesarin, F. & Salmaso, L. *Permutation Tests for Complex Data. Permutation Tests for Complex Data: Theory, Applications and Software* (2010). doi:10.1002/9780470689516
44. Brunner, E. & Puri, M. L. Nonparametric methods in factorial designs. *Stat. Pap.* **42**, 1–52 (2001).
45. Brunner, E., Domhof, S. & Langer, F. Nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. *Wiley Ser. Probab. Stat.* xvii, **261** (2002).
46. Noguchi, K., Gel, Y. R., Brunner, E. & Konietzschke, F. nparLD: An R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. *J. Stat. Softw.* **50**, 1–23 (2012).
47. Feys, J. New Nonparametric Rank Tests for Interactions in Factorial Designs with Repeated Measures New Nonparametric Rank Tests for. **15**, (2016).
48. Therneau, T. M. A Package for Survival Analysis in S. *Survival* (2015).

1. Гематопозитическая стволовая клетка (HSC), гемопоэтическая клетка–предшественник (HPC), миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень mir–130a и/или mir–126, функционально связанную с

нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используются в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета, специфической к связанной с опухолью антигену (ТАА) Т–клеткой и/или 1–метил–триптофаном (1–МТ),

предпочтительно, где цитокин представляет собой интерферон (IFN), IL–12 или гранулоцитарно–макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM–CSF),

предпочтительно, где IFN представляет собой IFN типа I (предпочтительно, IFN α или IFN β) или IFN типа II (предпочтительно, IFN γ),

более предпочтительно, где IFN типа I представляет собой IFN α .

2. HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит для применения по п.1, где HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит используется в сочетании с ингибитором иммунной контрольных точек иммунитета и ТАА–специфической Т–клеткой.

3. HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит для применения по п.1 или 2, где ТАА–специфическая Т–клетка экспрессирует рецептор химерного антигена (CAR) и/или рецептор трансгенных Т–клеток (TCR)

4. HSC, НРС, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит для применения в качестве любого из предшествующих пунктов, где ТАА выбран из группы, включающей карциноэмбриональный антиген (CEA), рецептор эстрогена, рецептор прогестерона, ephrinB2, ROR1, мезотелин, c–Met, GD–2 и MAGE A3 TCR, 4–1BB, антиген аденокарциномы, альфа–фетопротеин BAFF, клетку В–лимфомы, антиген C242, карбоангидразу 9 (CA–IX), CCR4, CD152, CD200, CD22, CD19, CD22, CD123, CD221, CD23 (рецептор IgE), CD28, CD4, CD40, CD44, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CS–1, CNT0888, CTLA–4, DR5, EpcAM, CD3, дополнительный домен фибронектина–В, рецептор фолата 1, гликопротеин 75, GPNMB, HGF, рецептор–киназы фактор роста гепатоцитов человека, рецептор IGF–1, IGF–I, IgG1, L1–CAM, IL–13, IL–6, рецептор инсулиноподобного фактора роста I, интегрин α 5 β 1, интегрин α v β 3, MORAb–009, MS4A1, муцин CanAg, N–гликолилнейраминная кислота, NPC–1C, PDGF–R α , PDL192, фосфатидилсерин, клетки карциномы предстательной железы, RANKL, RON, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, тенасцин С, TGF бета 2, TGF– β , TRAIL–R1, TRAIL–R2, опухолевый антиген CTAA16.88, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), VEGF–A, VEGFR–1, VEGFR2, виментин, 5T4, CD5, CD19, CD20, CD21, CD25, CD37, CD30, CD33, CD45, CAMPATH–1 (CDw52), HLA–DR, антиидиотип, TAG–72, EpcAM, MUC1, фолат–связывающий белок, A33, G250, простатический специфический мембранный антиген (PSMA), простатический специфический антиген (PSA), ферритин, ганглиозиды (например, GD2, GD3, GM2), Ley, CA–125, CA19–9, рецептор эпидермального фактора

роста (EGFR), p185HER2, рецептор IL-2, de2-7 EGFR, белок активации фибробластов (FAP), тенасцин, металлопротеиназы, эндосиалин, карбоноангидраза, галектин 9, альдолаза А, eIFγ4, тирозиназа, галектин 4, HERKV-K10, p53, NY-LU-12, Restin, NY-CO-38, MAGE-1, MAGE-4a, SSX2, NY-ESO-1, SCP-1, 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, b-catenin/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27m, CDK4/m, CT, Cyp-B, DAM-6 (MAGE-B2) and DAM-10 (MAGE-B1), ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT (hTRT), iCE, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/Melan-A, MC1R, Myosin/m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-A, NY-ESO-1, P15, p190 минорный bcr-abl, Pml/RARa, PRAME, RAGE, RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-3, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, белок 1, gp75, TRP-2, TRP-2/INT2 и WT1,

предпочтительно, где ТАА-специфическая Т-клетка экспрессирует CD19-специфическую CAR.

5. HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит для применения по любому из предыдущих пунктов, где ТАА-специфическая Т-клетка получена из клетки, выделенной у пациента.

6. HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит для применения по любому из предшествующих пунктов, где ТАА-специфическая Т-клетка сконструирована так, чтобы разрушать по меньшей мере один эндогенный ген, предпочтительно, где по меньшей мере один эндогенный ген выбран из эндогенного гена, кодирующего α-цепь TCR, β-цепь TCR и главный комплекс гистосовместимости (МНС).

7. HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит для применения по любому из предыдущих пунктов, где ингибитор контрольных точек иммунитета представляет собой антитело, предпочтительно, где антитело-ингибитор контрольных точек иммунитета выбрано из группы, состоящей из антитела против CTLA4, антитела против PD1, антитела против PDL1, антитела против PDL2 и антитела против LAG-3.

8. HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит для применения по любому из предыдущих пунктов, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень mir-130a и по меньшей мере одну последовательность-мишень mir-126, предпочтительно, где вектор содержит две последовательности-мишени mir-130a и две последовательности-мишени mir-126.

9. HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит для применения по любому из предыдущих пунктов, где вектор дополнительно содержит тканеспецифичный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, предпочтительно, где тканеспецифичный промотор представляет собой ТЕК (Tie2) промотор.

10. HSC, НРС, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит для применения по любому из предыдущих пунктов, где рак

представляет собой гематологическое злокачественное новообразование или солидную опухоль, предпочтительно, где гематологическое злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), лимфобластный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (ALL), миелодиспластические синдромы (MDS), миелопролиферативные новообразования (MPN), первичный миелофиброз, эссенциальной тромбоцитемией, истинную полицитемию, атипичный хронический миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), лимфому, множественную миелому, неходжкинскую лимфому и лимфому Ходжкина; или, предпочтительно, где солидная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака легких, рака молочной железы, рака пищевода, рака желудка, рака толстой кишки, холангиокарциномы, рака поджелудочной железы, рака яичника, рака головы и шеи, синовиальной саркомы, ангиосаркомы, остеосаркомы, рака щитовидной железы, рака эндометрия, нейробластомы, рабдомиосаркомы, рака печени, меланомы, рака предстательной железы, рака почки, саркомы мягких тканей, рака уротелия, рака желчных путей, глиобластомы, рака шейки матки и колоректального рака.

11. Специфическая к связанному с опухолью антигену (ТАА) Т-клетка для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили гематопозитическую стволовую клетку (HSC), гематопозитическую клетку–предшественник (HPC), миелоид/моноцит–коммитированную клетку–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащий вектор, в котором вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, предпочтительно, где ТАА выбран из группы, включающей карциноэмбриональный антиген (CEA), рецептор эстрогена, рецептор прогестерона, *ephrinB2*, *ROR1*, мезотелин, *c-Met*, *GD-2* и *MAGE A3* TCR, *4-1BB*, антиген аденокарциномы, альфа-фетопротеин *BAFF*, клетку В–лимфомы, антиген *C242*, карбоангидразу 9 (*CA-IX*), *CCR4*, *CD152*, *CD200*, *CD22*, *CD19*, *CD22*, *CD123*, *CD221*, *CD23* (рецептор *IgE*), *CD28*, *CD4*, *CD40*, *CD44*, *CD44 v6*, *CD51*, *CD52*, *CD56*, *CD74*, *CD80*, *CS-1*, *CNT0888*, *CTLA-4*, *DR5*, *EpCAM*, *CD3*, дополнительный домен фибронектина–В, рецептор фолата 1, гликопротеин 75, *GP130*, *HGF*, рецептор–киназы фактор роста гепатоцитов человека, рецептор *IGF-1*, *IGF-I*, *IgG1*, *L1-CAM*, *IL-13*, *IL-6*, рецептор инсулиноподобного фактора роста I, интегрин $\alpha 5\beta 1$, интегрин $\alpha v\beta 3$, *MORAb-009*, *MS4A1*, муцин *CanAg*, N–гликолилнейраминавая кислота, *NPC-1C*, *PDGF-R α* , *PDL192*, фосфатидилсерин, клетки карциномы предстательной железы, *RANKL*, *RON*, *SCH 900105*, *SDC1*, *SLAMF7*, тенасцин С, *TGF бета 2*, *TGF- β* , *TRAIL-R1*, *TRAIL-R2*, опухолевый антиген *CTAA16.88*, фактор роста эндотелия сосудов (*VEGF*), *VEGF-A*, *VEGFR-1*, *VEGFR2*, виментин, *5T4*, *CD5*, *CD19*, *CD20*, *CD21*, *CD25*, *CD37*, *CD30*, *CD33*, *CD45*, *CAMPATH-1 (CDw52)*, *HLA-DR*, антиидиотип, *TAG-72*, *Ep-CAM*, *MUC1*, фолат–связывающий белок, *A33*, *G250*, простатический специфический мембранный антиген, (*PSMA*), простатический специфический антиген (*PSA*), ферритин, ганглиозиды (например, *GD2*, *GD3*, *GM2*), *Le^y*,

CA-125, CA19-9, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), p185HER2, рецептор IL-2, de2-7 EGFR, белок активации фибробластов (FAP), тенасцин, металлопротеиназы, эндосиалин, карбоаноангидраза, галектин 9, альдолаза A, eIF γ 4, тирозиназа, галектин 4, HERKV-K10, p53, NY-LU-12, Restin, NY-CO-38, MAGE-1, MAGE-4a, SSX2, NY-ESO-1, SCP-1, 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, b-catenin/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27m, CDK4/m, CT, Cyp-B, DAM-6 (MAGE-B2) and DAM-10 (MAGE-B1), ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT (hTRT), iCE, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/Melan-A, MC1R, Myosin/m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-A, NY-ESO-1, P15, p190 минорный bcr-abl, Pml/RAR α , PRAME, RAGE, RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-3, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, белок 1, gp75, TRP-2, TRP-2/INT2 и WT1, предпочтительно, где ТА А-специфическая Т-клетка экспрессирует химерный антигенный рецептор (CAR) и/или трансгенный Т-клеточный рецептор (TCR),

предпочтительно, где цитокин представляет собой интерферон (IFN), IL-12 или гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF),

предпочтительно, где IFN представляет собой IFN типа I (предпочтительно, IFN α или IFN β) или IFN типа II (предпочтительно, IFN γ),

более предпочтительно, где IFN типа I представляет собой IFN α ,

предпочтительно, где ТАА-специфическая Т-клетка экспрессирует CD19-специфическую CAR.

12. Ингибитор иммунной контрольной точки для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили гематопозитическую стволовую клетку (HSC), гематопозитическую клетку-предшественник (HPC), миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, содержащий вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень mir-130a и/или mir-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, предпочтительно, где ингибитор контрольных точек иммунитета представляет собой антитело, более предпочтительно, где антитело-ингибитор контрольных точек иммунитета выбрано из группы, состоящей из антитела против CTLA4, антитела против PD1, антитела против PDL1, антитела против PDL2 и антитела против LAG-3,

предпочтительно, где цитокин представляет собой интерферон (IFN), IL-12 или гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF),

предпочтительно, где IFN представляет собой IFN типа I (предпочтительно, IFN α или IFN β) или IFN типа II (предпочтительно, IFN γ),

более предпочтительно, где IFN типа I представляет собой IFN α .

13. 1-Метил-триптофан (1-MT) для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили гематопозитическую стволовую клетку (HSC), гематопозитическую клетку-предшественник (HPC), миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественник, макрофаг или

моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин,

предпочтительно, где цитокин представляет собой интерферон (IFN), IL-12 или гранулоцитарно–макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF),

предпочтительно, где IFN представляет собой IFN типа II (предпочтительно IFN γ).

14. Комбинация ингибитора контрольных точек иммунитета и связанной с опухолью антиген–(ТАА)–специфической Т–клетка для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где пациенту ранее вводили гематопозитическую стволовую клетку (HSC) или гематопозитическую клетку–предшественник (HPC), содержащие вектор, в котором вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, предпочтительно, где ТАА–специфическая Т–клетка экспрессирует химерный антигенный рецептор (CAR) и/или трансгенный Т–клеточный рецептор (TCR),

предпочтительно, где цитокин представляет собой интерферон (IFN), IL-12 или гранулоцитарно–макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF),

предпочтительно, где IFN представляет собой IFN типа I (предпочтительно, IFN α или IFN β) или IFN типа II (предпочтительно, IFN γ),

более предпочтительно, где IFN типа I представляет собой IFN α .

15. ТАА–специфическая Т–клетка для применения по п.11, ингибитор контрольных точек иммунитета для применения по п.12, 1–метил–триптофан (1–MT) для применения по п.13 или комбинация для применения в соответствии с п.14, где вектор содержит, по меньшей мере, одну последовательность–мишень *mir-130a* и по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-126*, предпочтительно, где вектор содержит две последовательности–мишени *mir-130a* и две последовательности–мишени *mir-126*.

16. ТАА–специфическая Т–клетка для применения по п.11 или 15, ингибитор контрольных точек иммунитета для применения по п.12 или 15, 1–метил–триптофан (1–MT) для применения по п.13 или 15, или комбинация по п.14 или 15, где вектор дополнительно содержит тканеспецифический промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, предпочтительно, где тканеспецифичный промотор представляет собой ТЕК (Tie2) промотор.

17. ТАА–специфическая Т–клетка для применения по любому из пп.11 и 15–16, ингибитор контрольных точек иммунитета для применения по любому из пп.12 и 15–16, 1–метил–триптофан (1–MT) для применения по п.13 или 15–16 или комбинации для применения по любому из пп.14–16, где рак представляет собой гематологическое злокачественное новообразование или солидную опухоль, предпочтительно, где гематологическое злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), лимфобластного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза (ALL), миелодиспластических синдромов, лимфомы, множественной миеломы,

неходжкинской лимфомы и лимфомы Ходжкина; или, предпочтительно, где солидная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака легких, рака молочной железы, рака пищевода, рака желудка, рака толстой кишки, холангиокарциномы, рака поджелудочной железы, рака яичника, рака головы и шеи, синовиальной саркомы, ангиосаркомы, остеосаркомы, рака щитовидной железы рака эндометрия, нейробластомы, рабдомиосаркомы, рака печени, меланомы, рака предстательной железы, рака почки, саркомы мягких тканей, рака уротелия, рака желчных путей, глиобластомы, рака шейки матки и колоректального рака.

18. Способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, который включает стадию введения гемопоэтической стволовой клетки (HSC), гемопоэтической клетки-предшественника (HPC), клетки-предшественника, миелоид/моноцит-коммитированной клетки-предшественника, макрофага или моноцита, содержащих вектор, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, нуждающемуся в этом пациенту, где HSC, HPC, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественник, макрофаг или моноцит вводят пациенту в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета, специфической к связанному с опухолью антигену (ТАА) Т-клеткой и/или 1-метил-триптофаном (1-MT), предпочтительно, где ТАА-специфическая Т-клетка экспрессирует химерный антигенный рецептор (CAR) и/или трансгенный Т-клеточный рецептор (TCR),

предпочтительно, где цитокин представляет собой интерферон (IFN), IL-12 или гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF),

предпочтительно, где IFN представляет собой IFN типа I (предпочтительно, IFN α или IFN β) или IFN типа II (предпочтительно, IFN γ),

более предпочтительно, где IFN типа I представляет собой IFN α .

19. Способ лечения или профилактики злокачественного новообразования у пациента, которому ранее вводили гематопоэтическую стволовую клетку (HSC), гематопоэтическую клетку-предшественник (HPC), миелоид/моноцит-коммитированной клетку-предшественник, макрофаг или моноцит, включающей вектор, в котором вектор содержит, по меньшей мере, одну последовательность-мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, который включает стадию введения специфической к связанному с опухолью антигену (ТАА) Т-клетки, стадию введения ингибитора контрольных точек иммунитета и/или стадию введения 1-метил-триптофана (1-MT), предпочтительно, где ТАА-специфическая Т-клетка экспрессирует химерный антигенный рецептор (CAR) и/или трансгенный Т-клеточный рецептор (TCR),

предпочтительно, где цитокин представляет собой интерферон (IFN), IL-12 или гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF),

предпочтительно, где IFN представляет собой IFN типа I (предпочтительно, IFN α или IFN β) или IFN типа II (предпочтительно, IFN γ),

более предпочтительно, где IFN типа I представляет собой IFN α .

20. Гемопозитическая стволовая клетка (HSC), гемопозитическая клетка–предшественник (HPC), миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, содержащий по меньшей мере одну последовательность–мишень mir–130a и/или mir–126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый цитокин, и вектор, содержащий по меньшей мере одну последовательность–мишень mir–130a и/или mir–126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где первый и второй цитокины являются различными,

предпочтительно, где первый и второй цитокины, каждый, независимо, выбраны из интерферона (IFN) или фактора некроза опухоли альфа (TNF α),

предпочтительно, где первый и второй цитокины, каждый, независимо, выбраны из группы, состоящей из IFN типа I (предпочтительно, IFN α или IFN β), IFN типа II (предпочтительно, IFN γ) и TNF α ,

предпочтительно, где первый и второй цитокины, каждый, независимо, выбраны из группы, состоящей из IFN α , IFN β , IFN γ и TNF α .

21. Популяция гемопозитических стволовых клеток (HSC), гемопозитических клеток–предшественников (HPC), миелоид/моноцит–коммитированных клеток–предшественников, макрофагов или моноцитов, популяция, трансдуцированная вектором, содержащим по меньшей мере одну последовательность–мишень mir–130a и/или mir–126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый цитокин, и вектором, содержащим по меньшей мере одну последовательность–мишень mir–130a и/или mir–126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где первый и второй цитокины являются различными,

предпочтительно, где первый и второй цитокины, каждый, независимо, выбраны из интерферона (IFN) или фактора некроза опухоли альфа (TNF α),

предпочтительно, где первый и второй цитокины, каждый, независимо, выбраны из группы, состоящей из IFN типа I (предпочтительно, IFN α или IFN β), IFN типа II (предпочтительно, IFN γ) и TNF α ,

предпочтительно, где первый и второй цитокины, каждый, независимо, выбраны из группы, состоящей из IFN α , IFN β , IFN γ и TNF α .

22. HSC, HPC, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг, моноцит или популяция для применения по п.20 или 21, где:

(a) первый цитокин представляет собой IFN α , а второй цитокин представляет собой IFN γ ;

(b) первый цитокин представляет собой IFN α , а второй цитокин представляет собой TNF α ; или

(с) первый цитокин представляет собой $IFN\gamma$, а второй цитокин представляет собой $TNF\alpha$,

предпочтительно, где первый цитокин представляет собой $IFN\gamma$, а второй цитокин представляет собой $TNF\alpha$.

23. Гемопозитическая стволовая клетка (HSC), гемопозитическая клетка–предшественник (HPC), миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественник, макрофаг или моноцит, содержащие вектор, где вектор содержит по меньшей мере, одну последовательность–мишень $mir-130a$ и/или $mir-126$, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у пациента, где цитокин представляет собой интерферон (IFN) или фактор альфа некроза опухоли ($TNF\alpha$),

предпочтительно, где IFN представляет собой IFN типа II (предпочтительно, $IFN\gamma$) или IFN типа I (предпочтительно, $IFN\alpha$ или $IFN\beta$),

более предпочтительно, где IFN типа II представляет собой $IFN\gamma$.

По доверенности

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение гемопоэтической стволовой клетки (HSC), гемопоэтической клетки–предшественницы (HPC), миелоид/моноцит–коммитированной клетки–предшественницы, макрофага или моноцита, содержащих вектор,

где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин, для лечения или профилактики злокачественного новообразования у пациента,

где HSC, HPC, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественница, макрофаг или моноцит, используют в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета.

2. Применение по п. 1, где HSC, HPC, миелоид/моноцит–коммитированная клетка–предшественница, макрофаг или моноцит используют в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунитета и ТАА-специфической Т-клеткой.

3. Применение по п. 1 или п. 2, где ТАА-специфическая Т-клетка экспрессирует химерный рецептор антигена (CAR) и/или рецептор трансгенных Т-клеток (TCR)

4. Применение по любому из предшествующих пунктов, где ТАА выбран из группы, состоящей из карциноэмбрионального антигена (CEA), рецептора эстрогена, рецептора прогестерона, *ephrinB2*, *ROR1*, мезотелина, *c-Met*, *GD-2* и *MAGE A3* TCR, *4-1BB*, антигена аденокарциномы, альфа-фетопротеина *BAFF*, клетки В-лимфомы, антигена *C242*, карбоангидразы 9 (*CA-IX*), *CCR4*, *CD152*, *CD200*, *CD22*, *CD19*, *CD22*, *CD123*, *CD221*, *CD23* (рецептор *IgE*), *CD28*, *CD4*, *CD40*, *CD44*, *CD44 v6*, *CD51*, *CD52*, *CD56*, *CD74*, *CD80*, *CS-1*, *CNT0888*, *CTLA-4*, *DR5*, *EpCAM*, *CD3*, дополнительного домена фибронектина-В, рецептора фолата 1, гликопротеина 75, *GPNMB*, *HGF*, киназного рецептора фактора роста гепатоцитов человека, рецептора *IGF-1*, *IGF-I*, *IgG1*, *L1-CAM*, *IL-13*, *IL-6*, рецептора инсулиноподобного фактора роста I, интегрина $\alpha 5\beta 1$, интегрин $\alpha v\beta 3$, *MORAb-009*, *MS4A1*, муцина *CanAg*, N-гликолилнейраминовой кислоты, *NPC-1C*, *PDGF-R α* , *PDL192*, фосфатидилсерина, клеток карциномы предстательной железы, *RANKL*, *RON*, *SCH 900105*, *SDC1*, *SLAMF7*, тенастина С, *TGF бета 2*, *TGF- β* , *TRAIL-R1*, *TRAIL-R2*, опухолевого антигена *CTAA16.88*, фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF*), *VEGF-A*, *VEGFR-1*, *VEGFR2*, виментина, *5T4*, *CD5*, *CD19*, *CD20*, *CD21*, *CD25*, *CD37*, *CD30*, *CD33*, *CD45*, *CAMPATH-1 (CDw52)*, *HLA-DR*, антиидиотипа, *TAG-72*, *Ep-CAM*, *MUC1*, фолат-связывающего белка, *A33*, *G250*, простатического специфического мембранного антигена (*PSMA*), простатического специфического антигена (*PSA*), ферритина, ганглиозидов (например, *GD2*, *GD3*, *GM2*), *Ley*, *CA-125*, *CA19-9*, рецептора

эпидермального фактора роста (EGFR), p185HER2, рецептора IL-2, de2-7 EGFR, белка активации фибробластов (FAP), тенасцина, металлопротеиназы, эндосиалина, карбоангидразы, галектина 9, альдолазы А, eIF γ 4, тирозиназы, галектина 4, HERKV-K10, p53, NY-LU-12, рестина, NY-CO-38, MAGE-1, MAGE-4a, SSX2, NY-ESO-1, SCP-1, 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, b-катенина/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27m, CDK4/m, CT, Сур-В, DAM-6 (MAGE-B2) и DAM-10 (MAGE-B1), ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT (hTRT), iCE, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/мелана-А, MC1R, миозина/m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-А, NY-ESO-1, P15, p190 минорного bcr-abl, Pml/RAR α , PRAME, RAGE, RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-3, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, белка 1, gp75, TRP-2, TRP-2/INT2 и WT1.

5. Применение по любому из предыдущих пунктов, где ТАА-специфическая Т-клетка получена из клетки, выделенной у пациента.

6. Применение по любому из предшествующих пунктов, где ТАА-специфическая Т-клетка сконструирована так, чтобы разрушать по меньшей мере один эндогенный ген.

7. Применение по любому из предшествующих пунктов, где ингибитор контрольных точек иммунитета:

(i) представляет собой антитело; и/или

(ii) ингибирует молекулу ингибитора контрольных точек иммунитета, выбранную из группы, состоящей из A2AR (рецептор аденозина A2A), B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA (аттенюатор В- и Т-лимфоцитов; CD272), HVEM (медиатор проникновения вируса герпеса), CTLA-4 (ассоциированный с Т-лимфоцитами цитотоксический белок 4; CD152), IDO (индоламин-2,3-диоксигеназа), TDO (триптофан-2,3-диоксигеназа), KIR (иммуноглобулин-подобный рецептор клеток-киллеров), LAG3 (ген-3 активации лимфоцитов), PD-1 (рецептор запрограммированной смерти 1), PD-L1 (лиганд 1 PD-1), PD-L2 (лиганд 2 PD-1), TIM-3 (домен иммуноглобулина Т-клеток и муциновый домен 3), VISTA (V-доменный Ig супрессор активации Т-клеток), B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86).

8. Применение по любому из предыдущих пунктов, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень mir-130a и по меньшей мере одну последовательность-мишень mir-126.

9. Применение по любому из предыдущих пунктов, где вектор также содержит тканеспецифичный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

10. Применение по любому из предыдущих пунктов, где злокачественное

новообразование представляет собой гематологическое злокачественное новообразование или солидную опухоль.

11. Применение ингибитора контрольных точек иммунитета для лечения или профилактики злокачественного новообразования у пациента,

где пациенту также вводят гематопозитическую стволовую клетку (HSC), гематопозитическую клетку–предшественницу (HPC), миелоид/моноцит–коммитированную клетку–предшественницу, макрофаг или моноцит, содержащие вектор,

где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и/или *mir-126*, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

12. Применение по п. 11, где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-130a* и по меньшей мере одну последовательность–мишень *mir-126*.

13. Применение по п. 11 или п. 12, где вектор дополнительно содержит тканеспецифический промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

14. Применение по любому из пп. 11–13, где злокачественное новообразование представляет собой гематологическое злокачественное новообразование или солидную опухоль.

15. Применение по любому из предшествующих пунктов, где цитокин представляет собой интерферон (IFN), IL-12 или гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

16. Применение по любому из предшествующих пунктов, где цитокин представляет собой IFN α или IFN γ .

17. Применение по любому из пп. 11-16, где ингибитор контрольных точек иммунитета:

(i) представляет собой антитело; и/или

(ii) ингибирует молекулу ингибитора контрольных точек иммунитета, выбранную из группы, состоящей из A2AR (рецептор аденозина A2A), B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA (аттенуатор В- и Т-лимфоцитов; CD272), HVEM (медиатор проникновения вируса герпеса), CTLA-4 (ассоциированный с Т-лимфоцитами цитотоксический белок 4; CD152), IDO (индоламин-2,3-диоксигеназа), TDO (триптофан-2,3-диоксигеназа), KIR (иммуноглобулин-подобный рецептор клеток-киллеров), LAG3 (ген-3 активации лимфоцитов), PD-1 (рецептор запрограммированной смерти 1), PD-L1 (лиганд 1 PD-1), PD-L2 (лиганд 2 PD-1), TIM-3 (домен иммуноглобулина Т-клеток и

муциновый домен 3), VISTA (V-доменный Ig супрессор активации Т-клеток), B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86).

18. Применение по любому из пп. 7-10 или 15-17, где антитело-ингибитор иммунных контрольных точек выбрано из группы, состоящей из анти-CTLA4 антитела, анти-PD1 антитела, анти-PDL1 антитела, анти-PDL2 антитела и анти-LAG-3 антитела.

19. Применение по любому из пп. 6-10, 15 или 16-18, где по меньшей мере один эндогенный ген выбран из эндогенного гена, кодирующего TCR α цепь, TCR β цепь и главный комплекс гистосовместимости (МНС).

20. Применение по любому из пп. 9-10 или 13-19, где тканеспецифичный промотор представляет собой промотор ТЕК (Tie2).

21. Применение по любому из предыдущих пунктов, где злокачественное новообразование представляет собой рак печени или глиобластому.

22. Применение по любому из пп. 2-10 или 15-21, где цитокином является интерферон (IFN),

где ТАА-специфическая Т-клетка экспрессирует CAR, и

где ТАА представляет собой B7-H3.

23. Способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, включающий стадию введения больному гемопоэтической стволовой клетки (HPC), гематопоэтической клетки-предшественницы (HPC), миелоид/моноцит-коммитированной клетки-предшественницы, макрофага или моноцита, содержащего вектор,

где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин,

где HSC, HPC, миелоид/моноцит-коммитированная клетка-предшественница, макрофаг или моноцит вводят пациенту в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек.

24. Способ по п. 23, где цитокином является интерферон (IFN), IL-12 или гранулоцит-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

25. Способ по п. 23 или 24, где цитокином является IFN α или IFN γ .

26. Способ по любому из пп. 23-25, где ингибитор контрольных точек иммунитета представляет собой:

(i) антитело; и/или

(ii) ингибирует молекулу ингибитора контрольных точек иммунитета, выбранную из группы, состоящей из A2AR (рецептор аденозина A2A), B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA (аттенуатор В- и Т-лимфоцитов; CD272), HVEM (медиатор

проникновения вируса герпеса), CTLA-4 (ассоциированный с Т-лимфоцитами цитотоксический белок 4; CD152), IDO (индоламин-2,3-диоксигеназа), TDO (триптофан-2,3-диоксигеназа), KIR (иммуноглобулин-подобный рецептор клеток-киллеров), LAG3 (ген-3 активации лимфоцитов), PD-1 (рецептор запрограммированной смерти 1), PD-L1 (лиганд 1 PD-1), PD-L2 (лиганд 2 PD-1), TIM-3 (домен иммуноглобулина Т-клеток и муциновый домен 3), VISTA (V-доменный Ig супрессор активации Т-клеток), B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86).

27. Способ по п. 26, где антитело-ингибитор контрольных точек иммунитета выбрано из группы, состоящей из анти-CTLA4 антитела, анти-PD1 антитела, анти-PDL1 антитела, анти-PDL2 антитела и анти-LAG-3 антитела.

28. Способ по любому из пп. 23-27, где вектор также содержит тканеспецифический промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

29. Способ по п. 28, где тканеспецифичный промотор представляет собой промотор ТЕК (Tie2).

30. Способ по любому из пп. 23-29, где злокачественное новообразование представляет собой гематологическую злокачественную опухоль или солидную опухоль.

31. Способ по любому из пп. 23-30, где злокачественное новообразование представляет собой рак печени или глиобластому.

32. Продукт, содержащий:

(а) гемопоэтическую стволовую клетку (HSC), гемопоэтическую клетку-предшественницы (HPC), миелоид/моноцит-коммитированную клетку-предшественницы, макрофаг или моноцит, содержащие вектор,

где вектор содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-130a и/или miR-126, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин; и

(b) ингибитор контрольных точек иммунитета.

33. Продукт по п. 32, где цитокин представляет собой интерферон (IFN), IL-12 или гранулоцит-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

34. Продукт по п. 32 или 33, где цитокином является IFN α или IFN γ .

35. Продукт по любому из пп. 32-34, где ингибитор контрольных точек иммунитета:

(i) представляет собой антитело; и/или

(ii) ингибирует молекулу ингибитора контрольной точки иммунитета, выбранную из группы, состоящей из A2AR (рецептор аденозина A2A), B7-H3 (CD276), B7-H4

(VTCN1), BTLA (аттенуатор В- и Т-лимфоцитов; CD272), HVEM (медиатор проникновения вируса герпеса), CTLA-4 (ассоциированный с Т-лимфоцитами цитотоксический белок 4; CD152), IDO (индоламин-2,3-диоксигеназа), TDO (триптофан-2,3-диоксигеназа), KIR (иммуноглобулин-подобный рецептор клеток-киллеров), LAG3 (ген-3 активации лимфоцитов), PD-1 (рецептор запрограммированной смерти 1), PD-L1 (лиганд 1 PD-1), PD-L2 (лиганд 2 PD-1), TIM-3 (домен иммуноглобулина Т-клеток и муциновый домен 3), VISTA (V-доменный Ig супрессор активации Т-клеток), B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86).

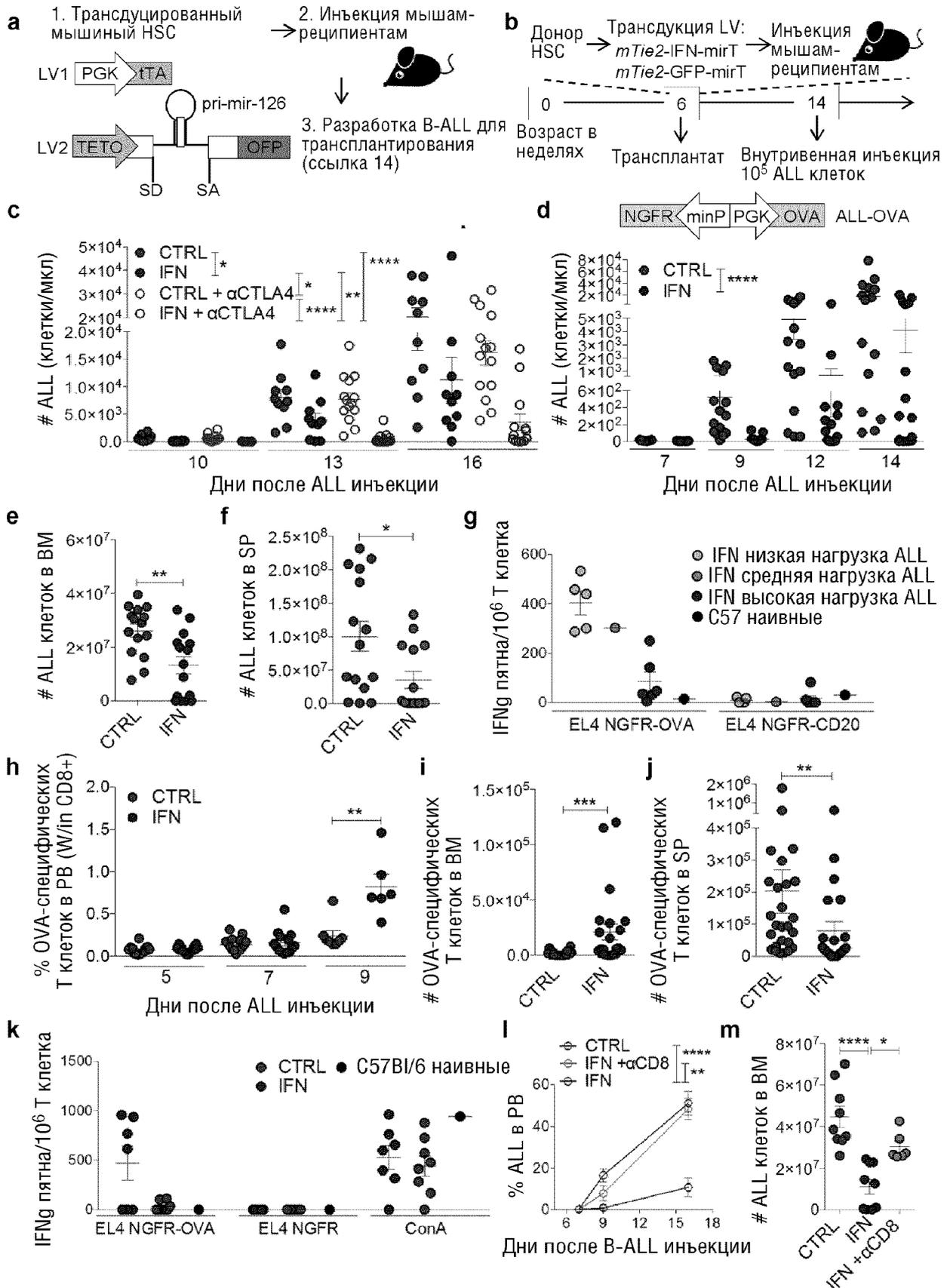
36. Продукт по п. 35, где антитело-ингибитор контрольной точки иммунитета выбрано из группы, состоящей из анти-CTLA4 антитела, анти-PD1 антитела, анти-PDL1 антитела, анти-PDL2 антитела и анти-LAG-3 антитела.

37. Продукт по любому из пп. 32-36, где вектор также содержит тканеспецифичный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей цитокин.

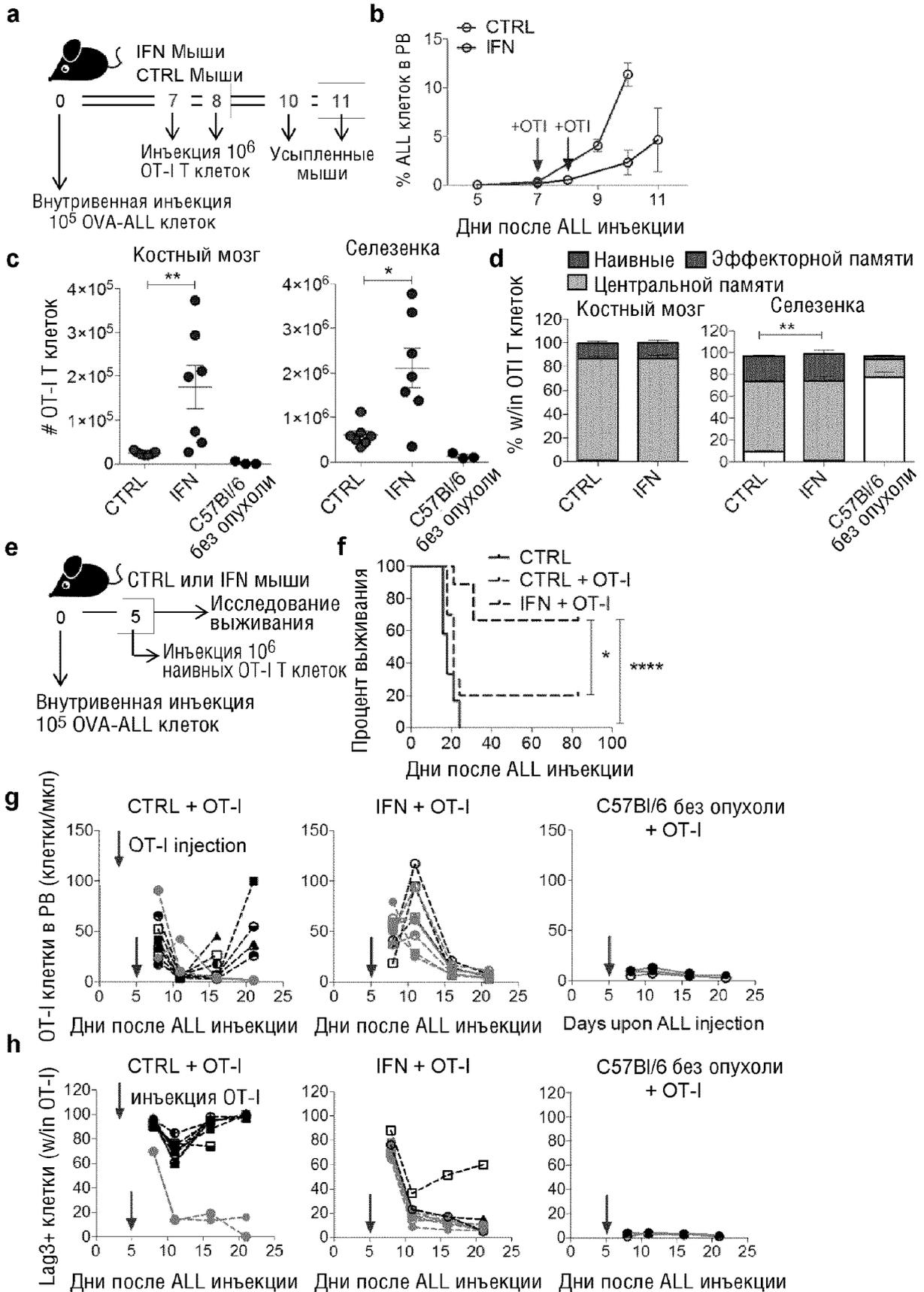
38. Продукт по п. 37, где тканеспецифичный промотор представляет собой промотор ТЕК (Tie2).

По доверенности

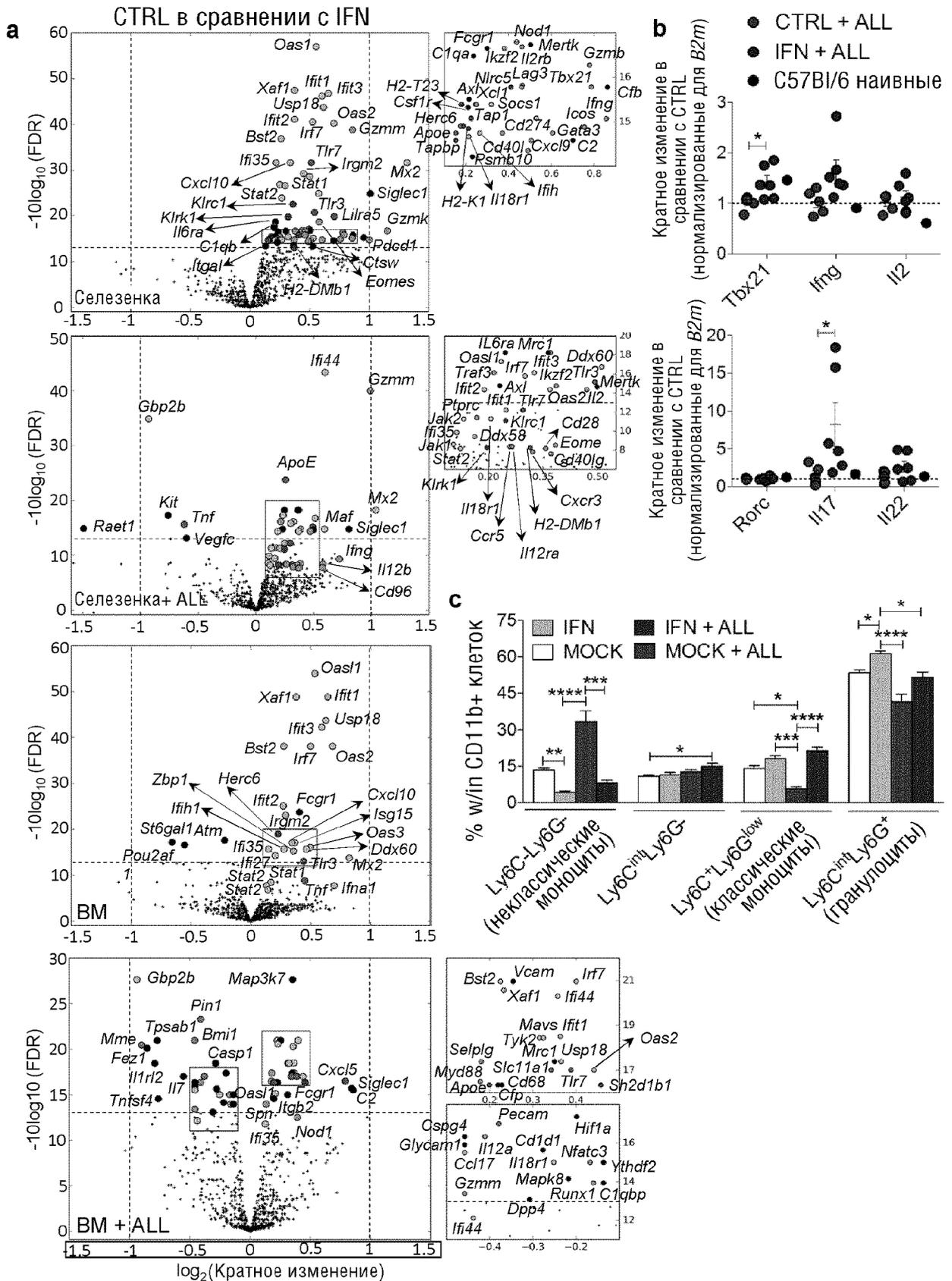
ФИГ.1



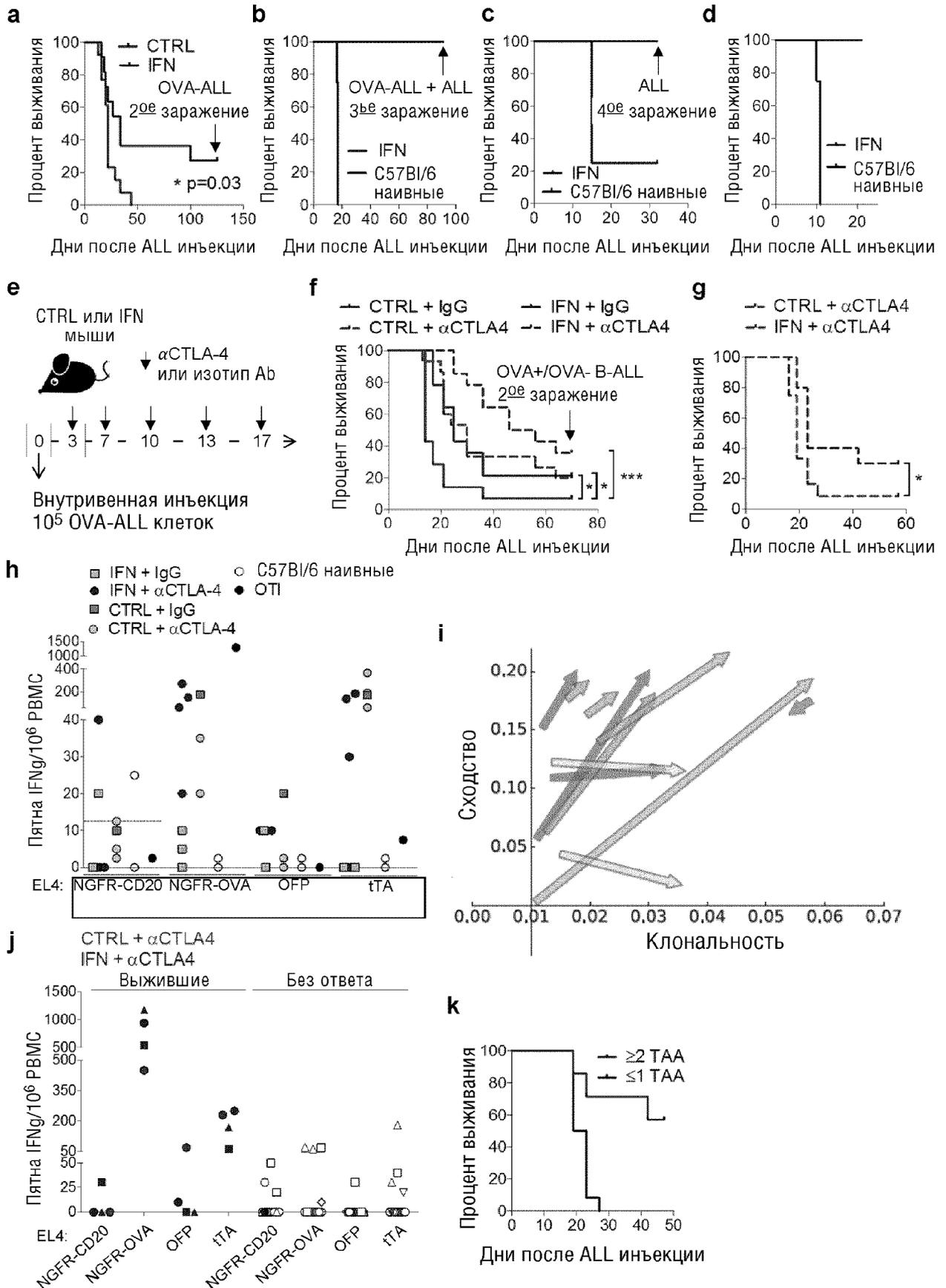
ФИГ.2



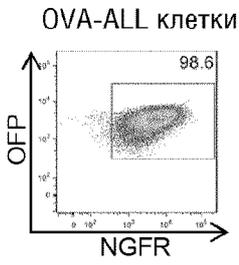
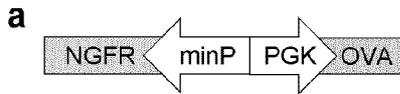
ФИГ.3



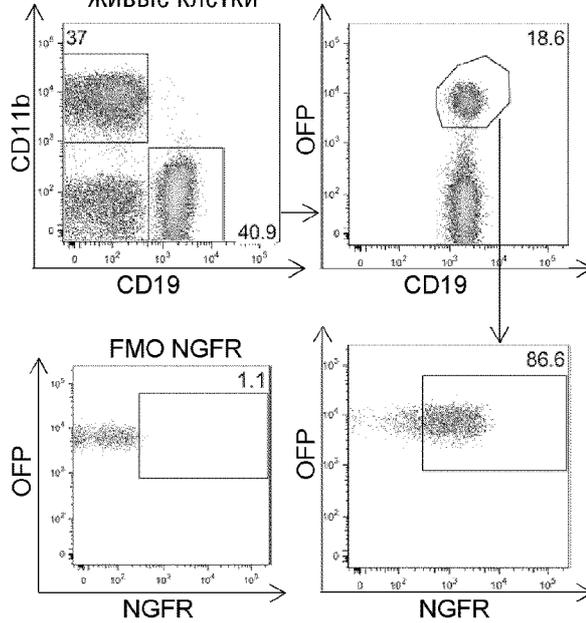
ФИГ.4



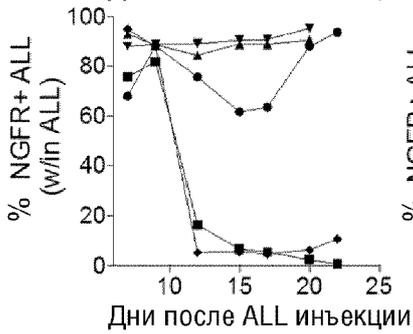
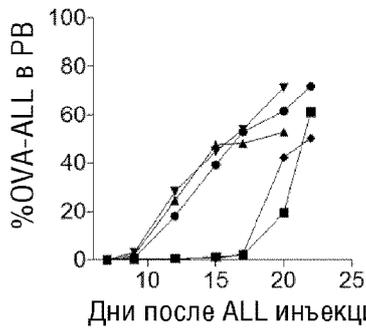
ФИГ.5



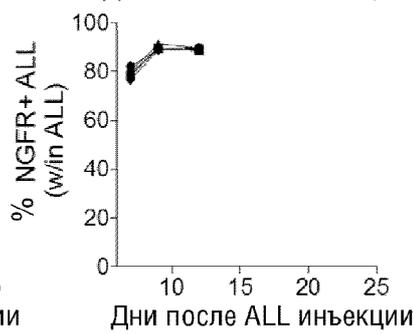
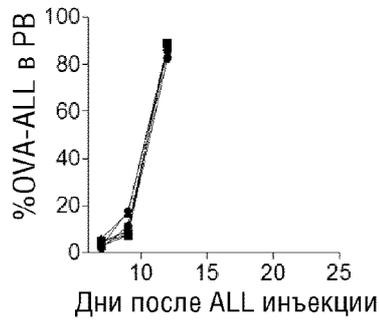
b Селектированные w/in одиночные живые клетки



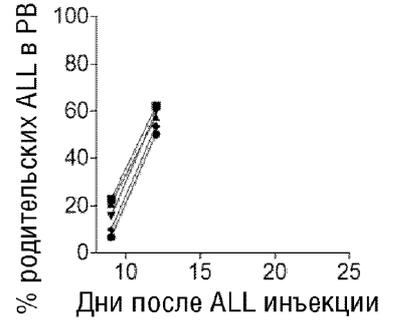
c OVA-ALL в C57Bl/6



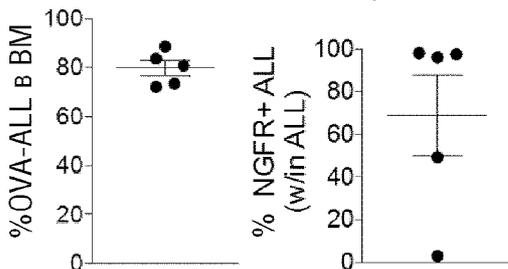
OVA-ALL в NSG



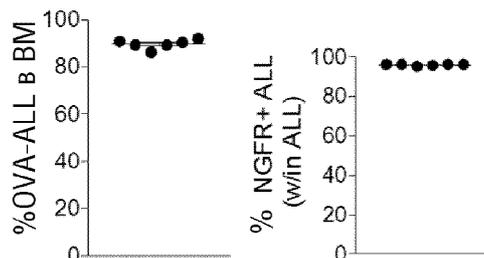
Родительские ALL в C57Bl/6



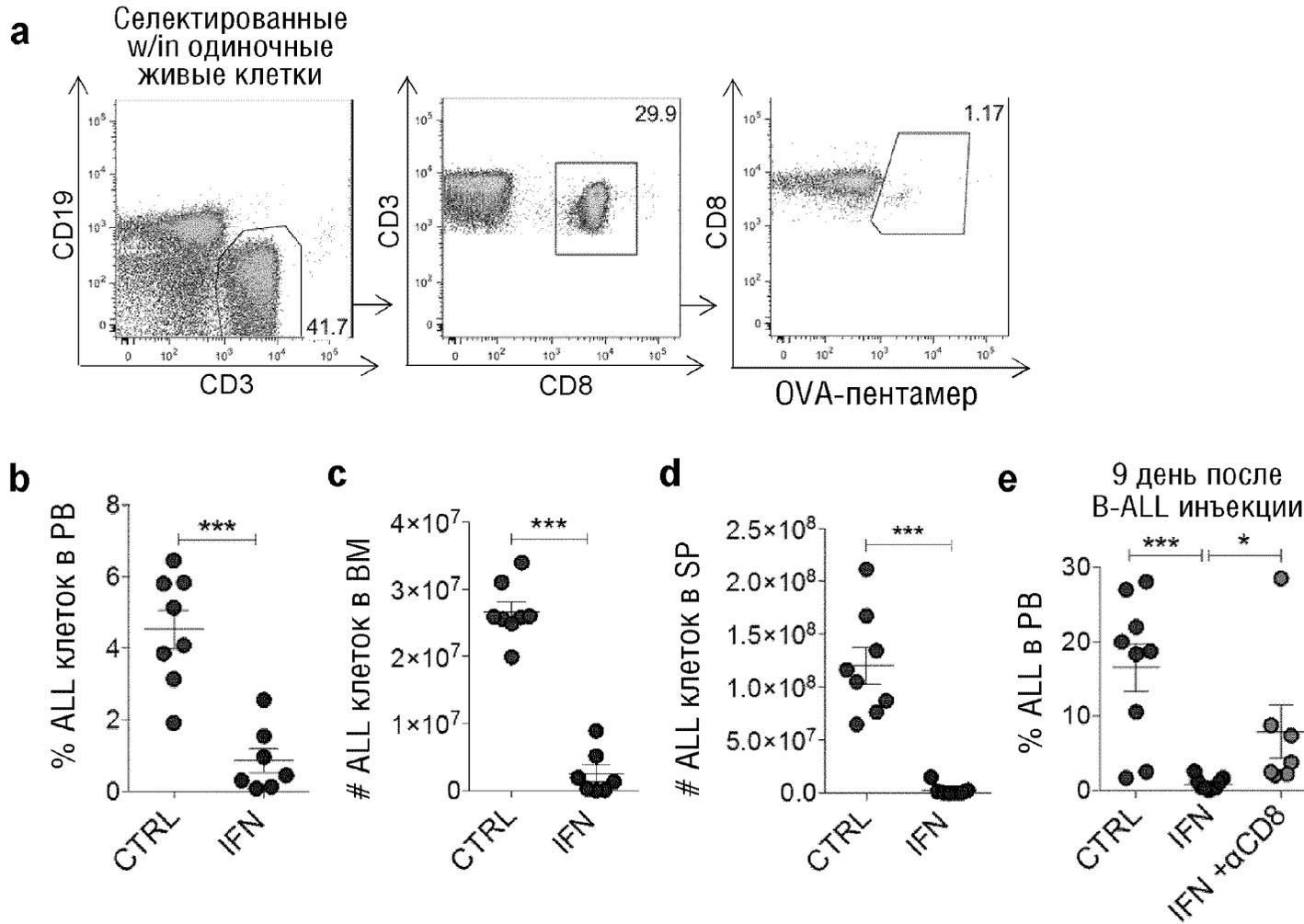
d OVA-ALL в C57Bl/6



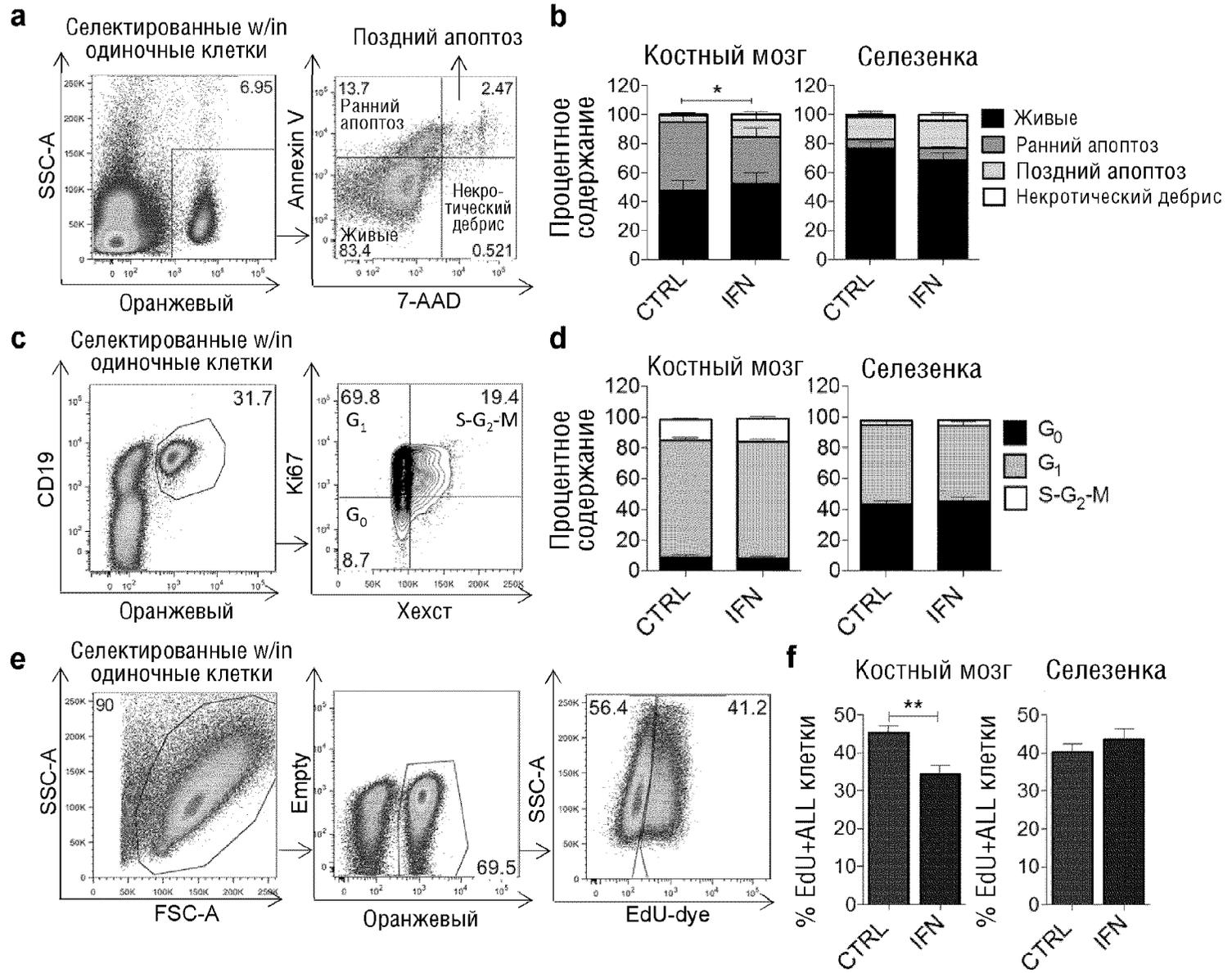
e OVA-ALL в NSG



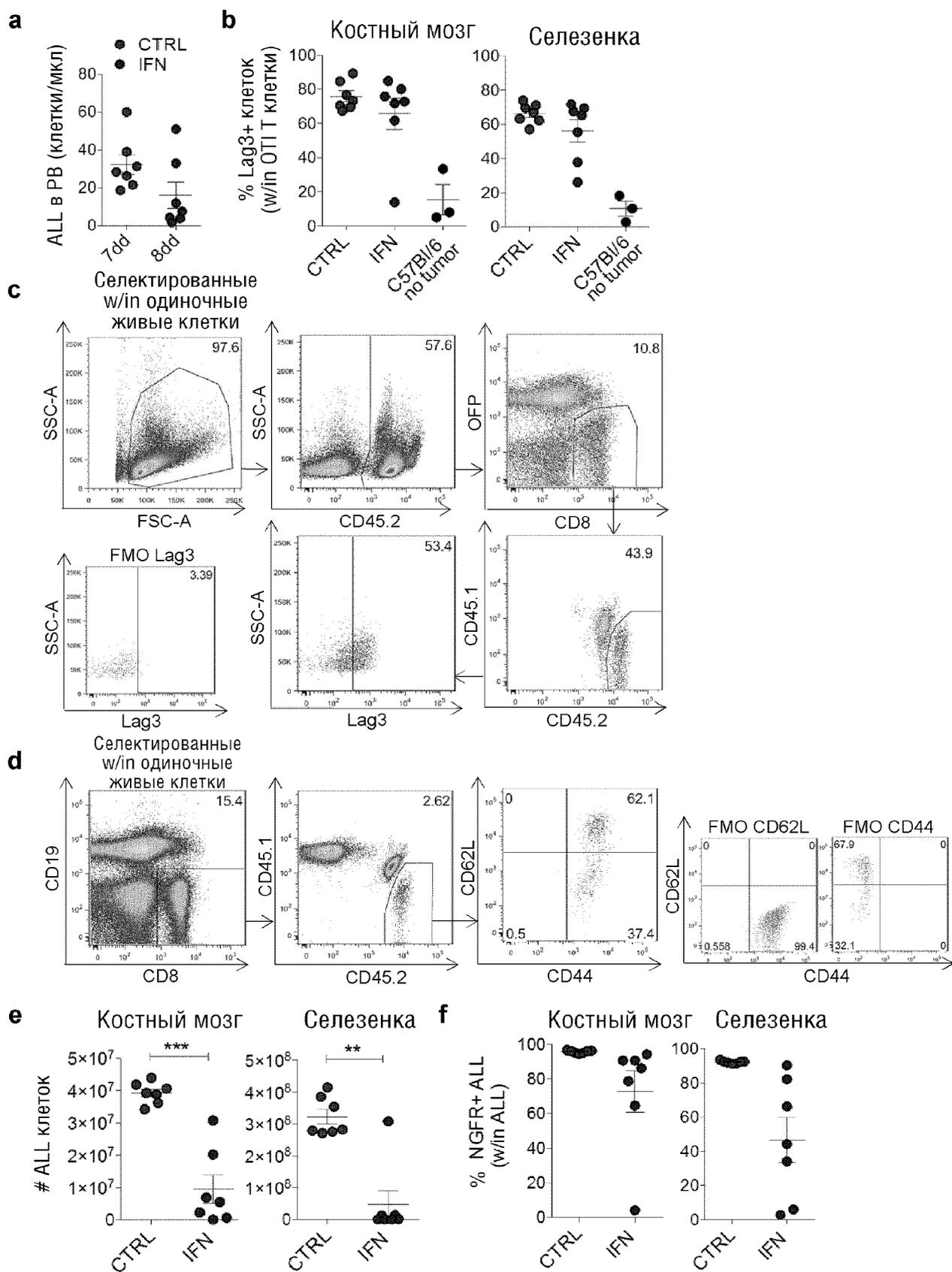
ФИГ.6



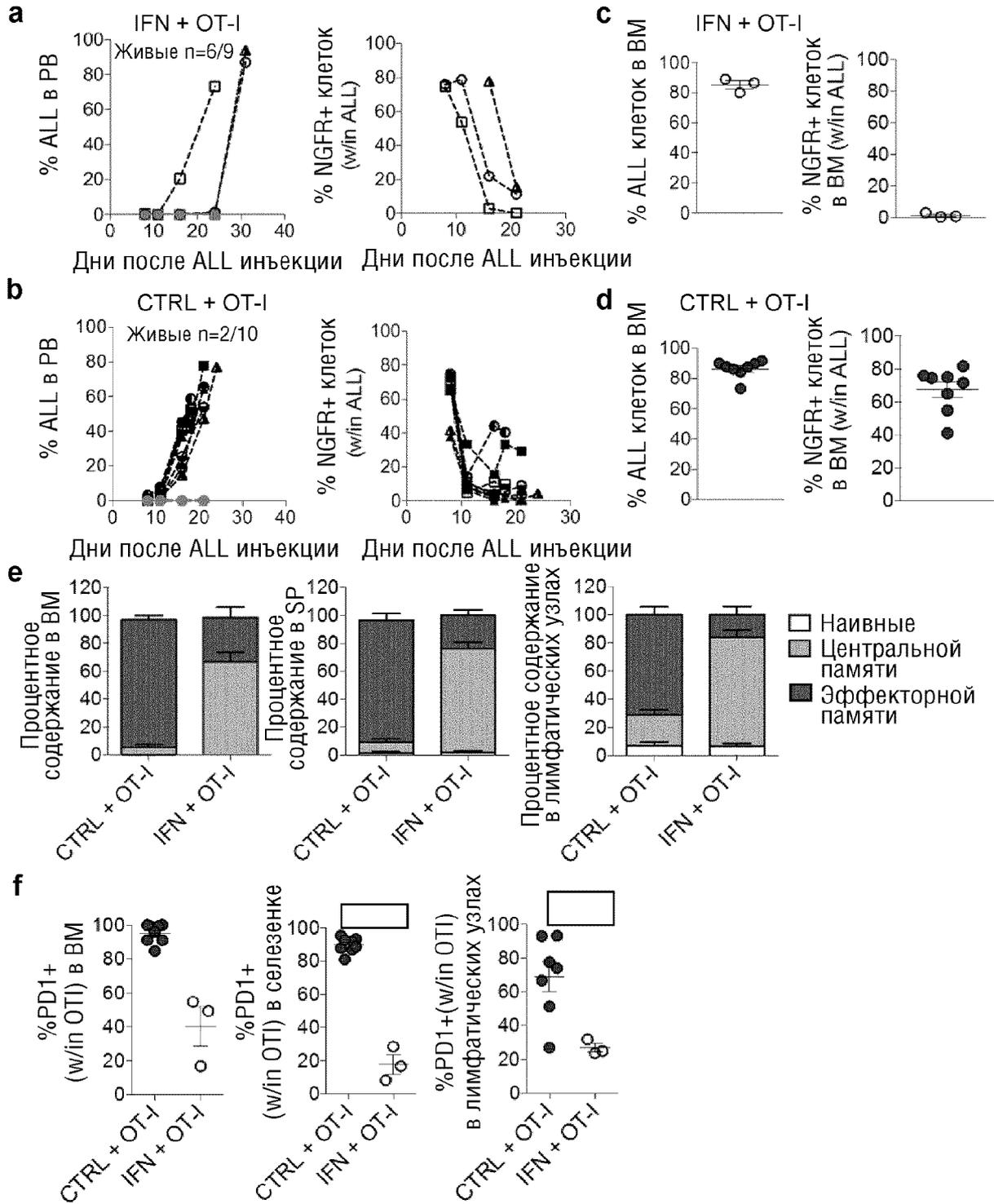
ФИГ.7



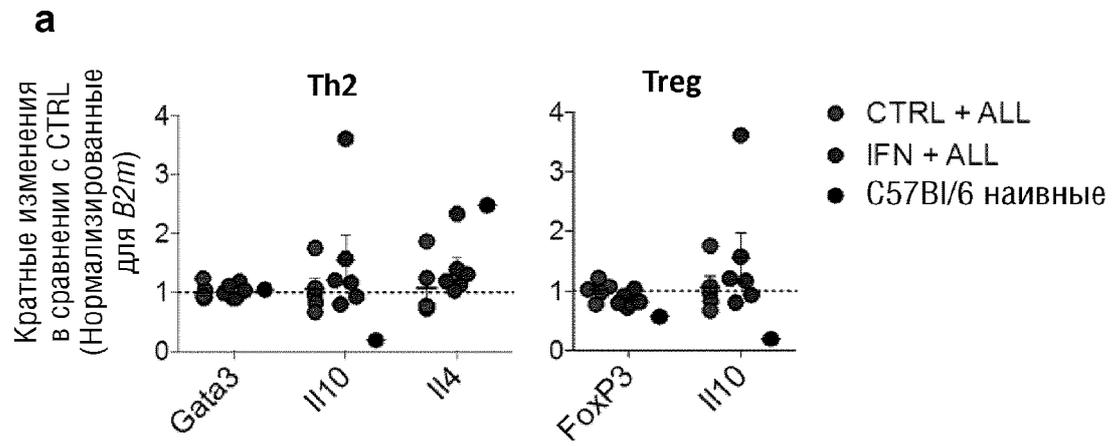
ФИГ.8



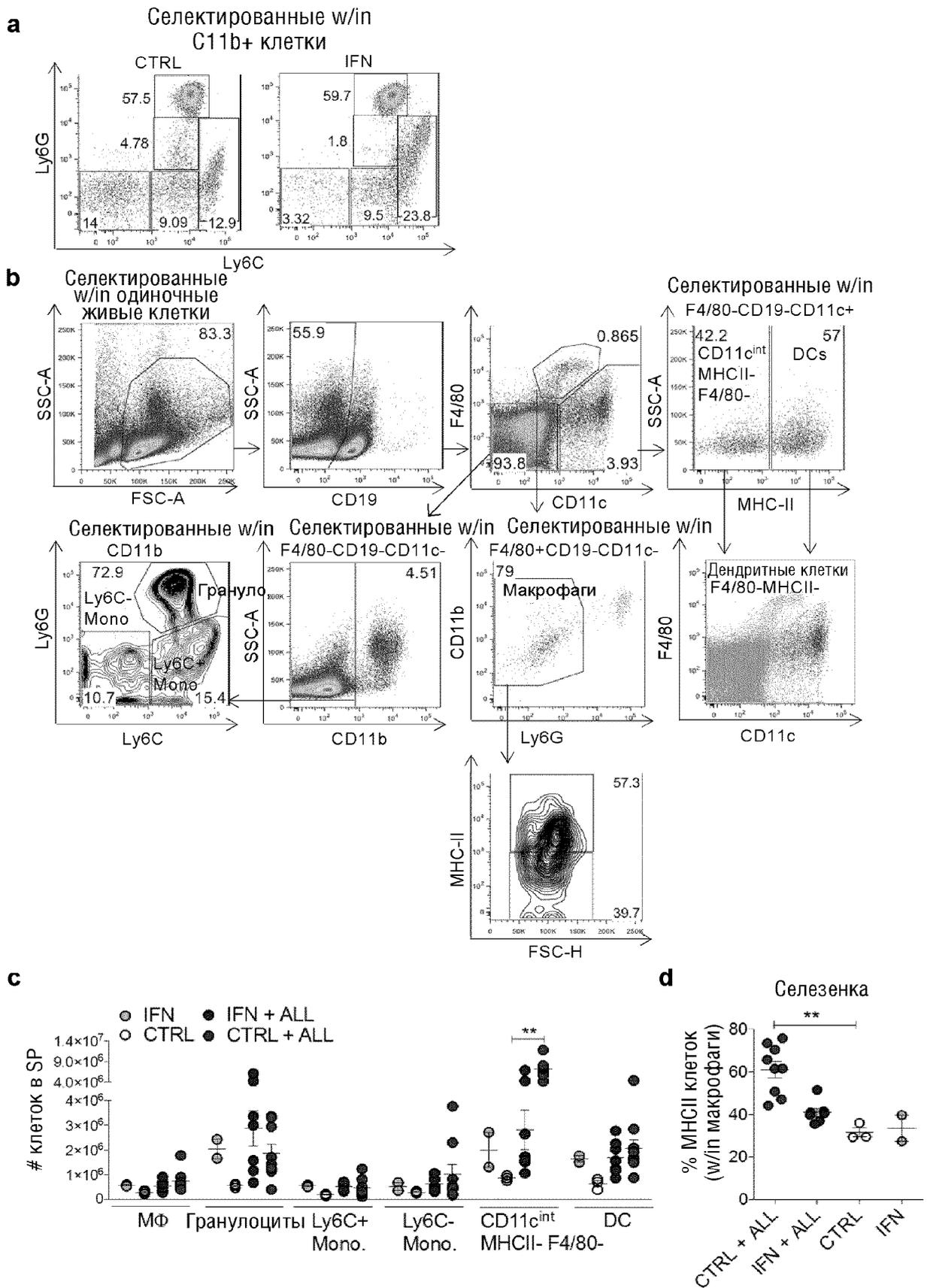
ФИГ.9



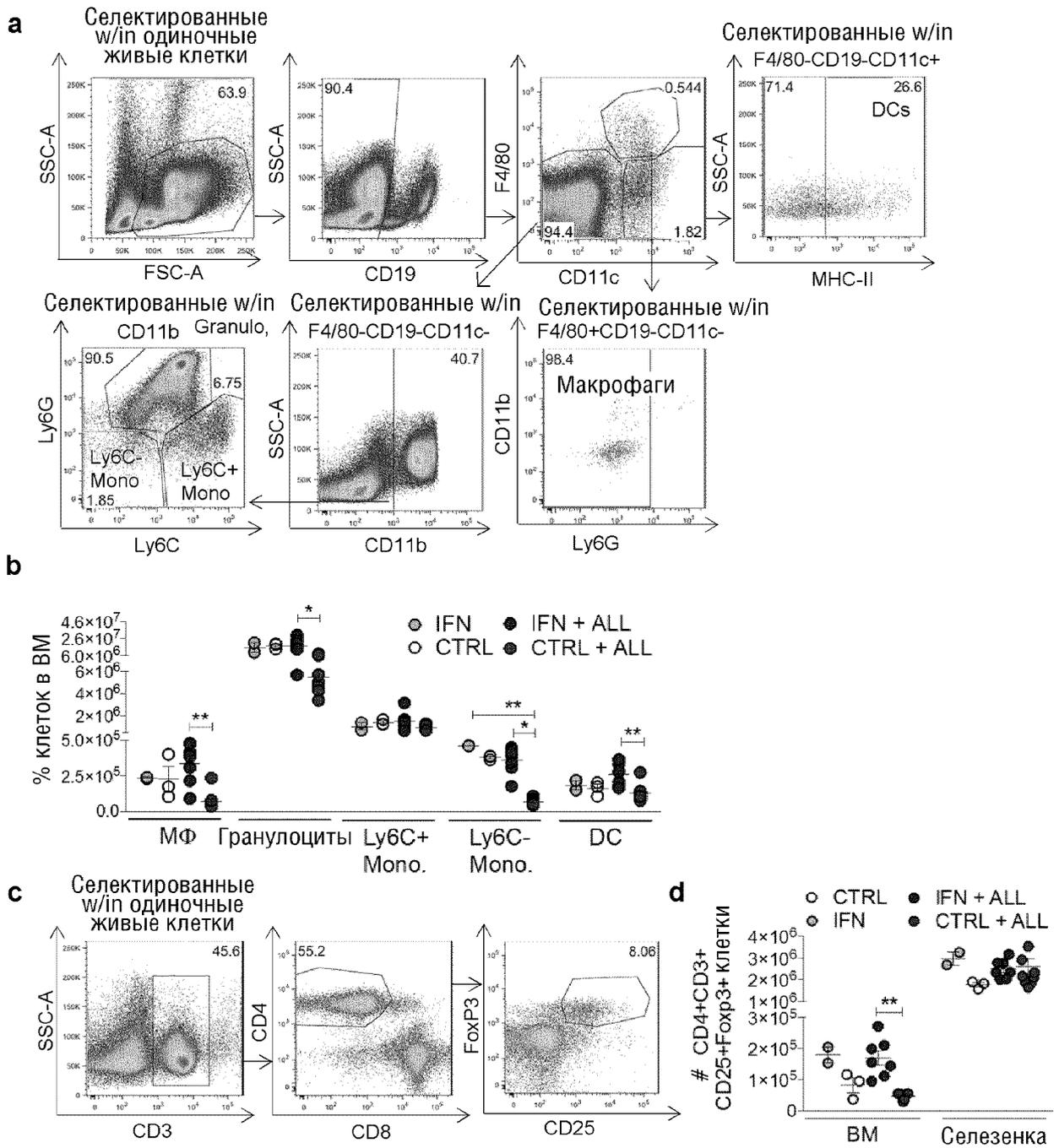
ФИГ.10



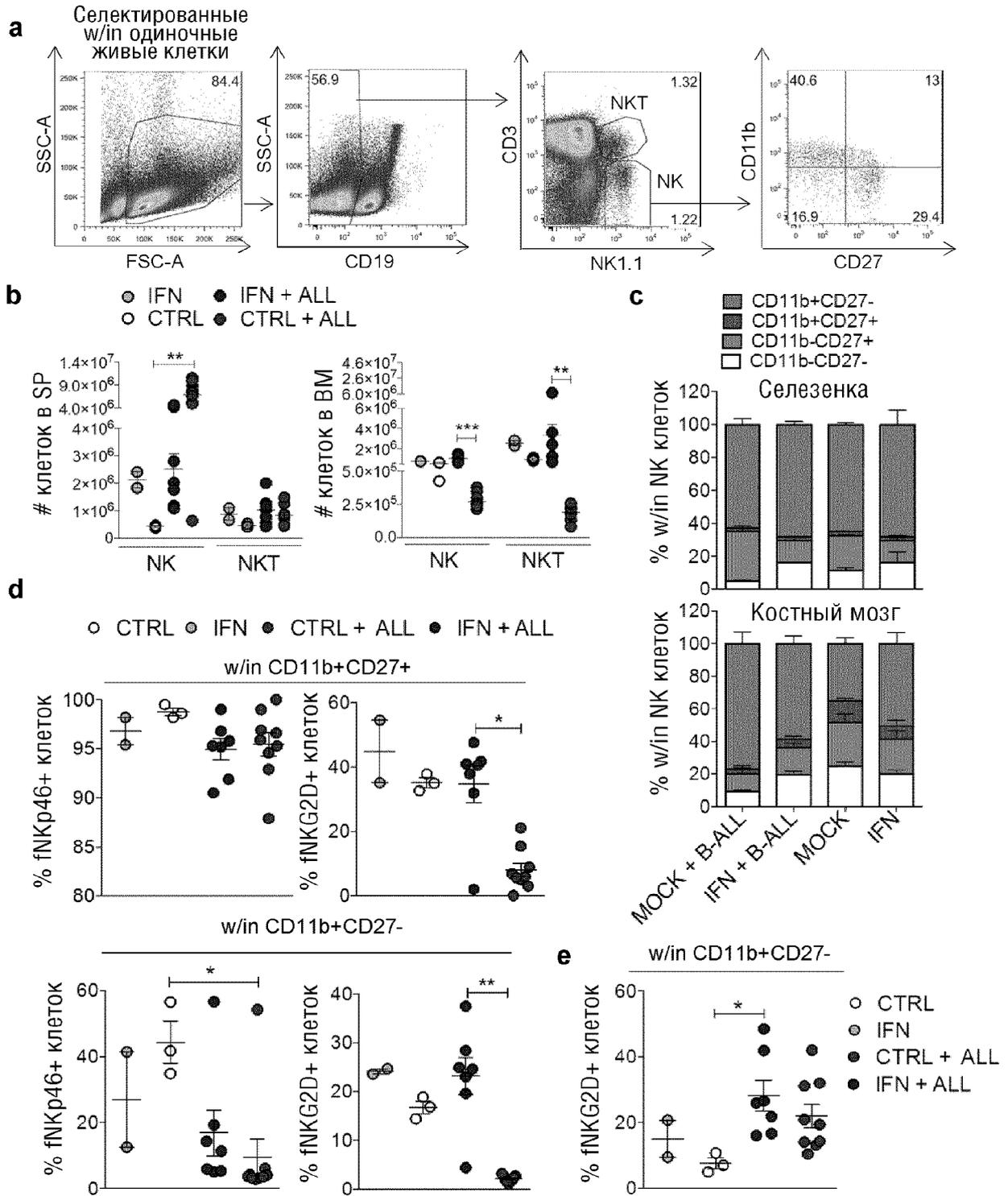
ФИГ.11



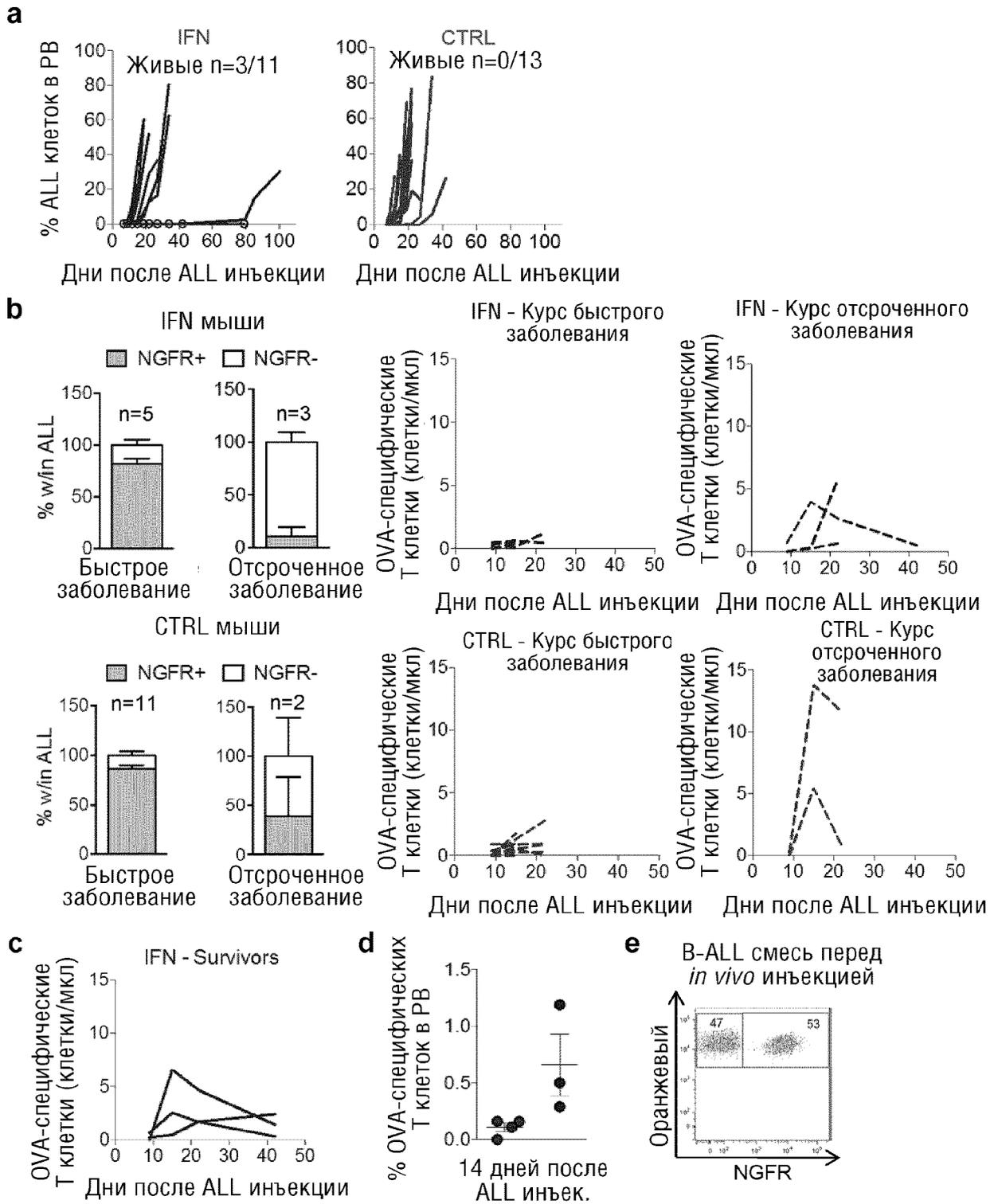
ФИГ.12



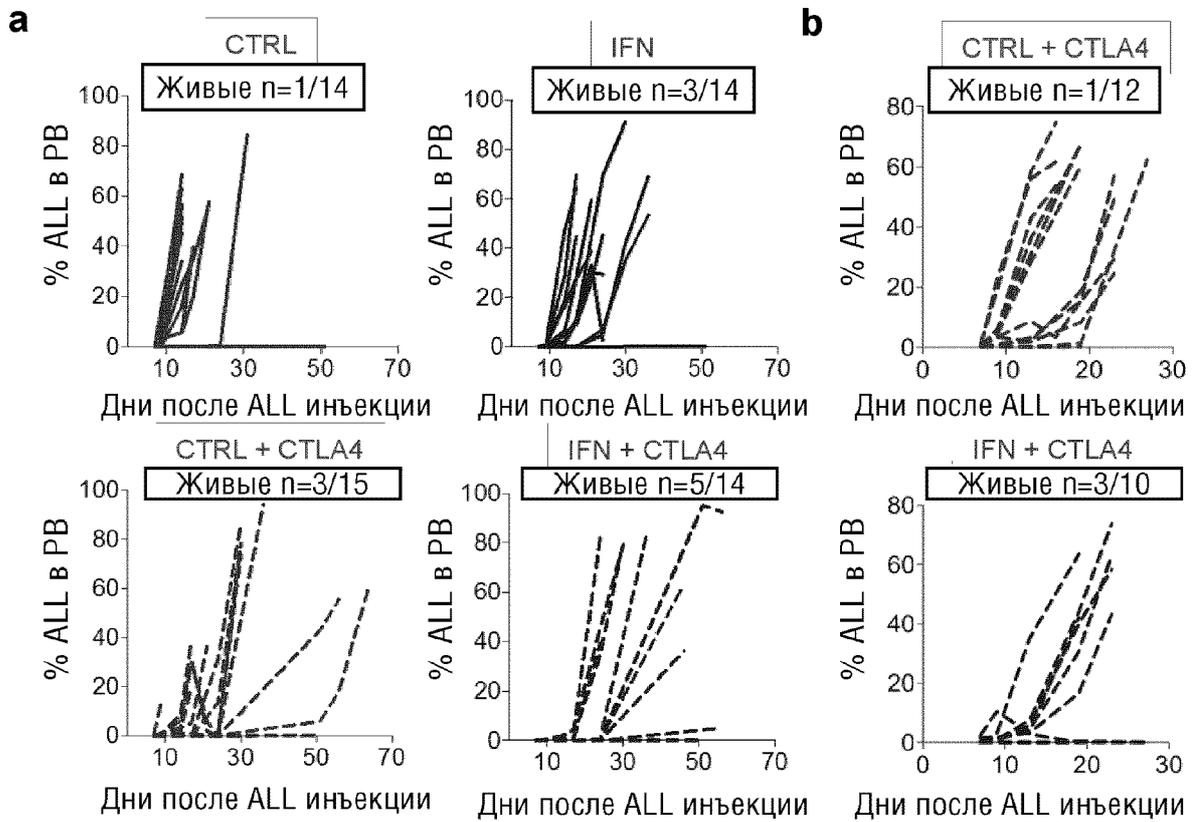
ФИГ. 13



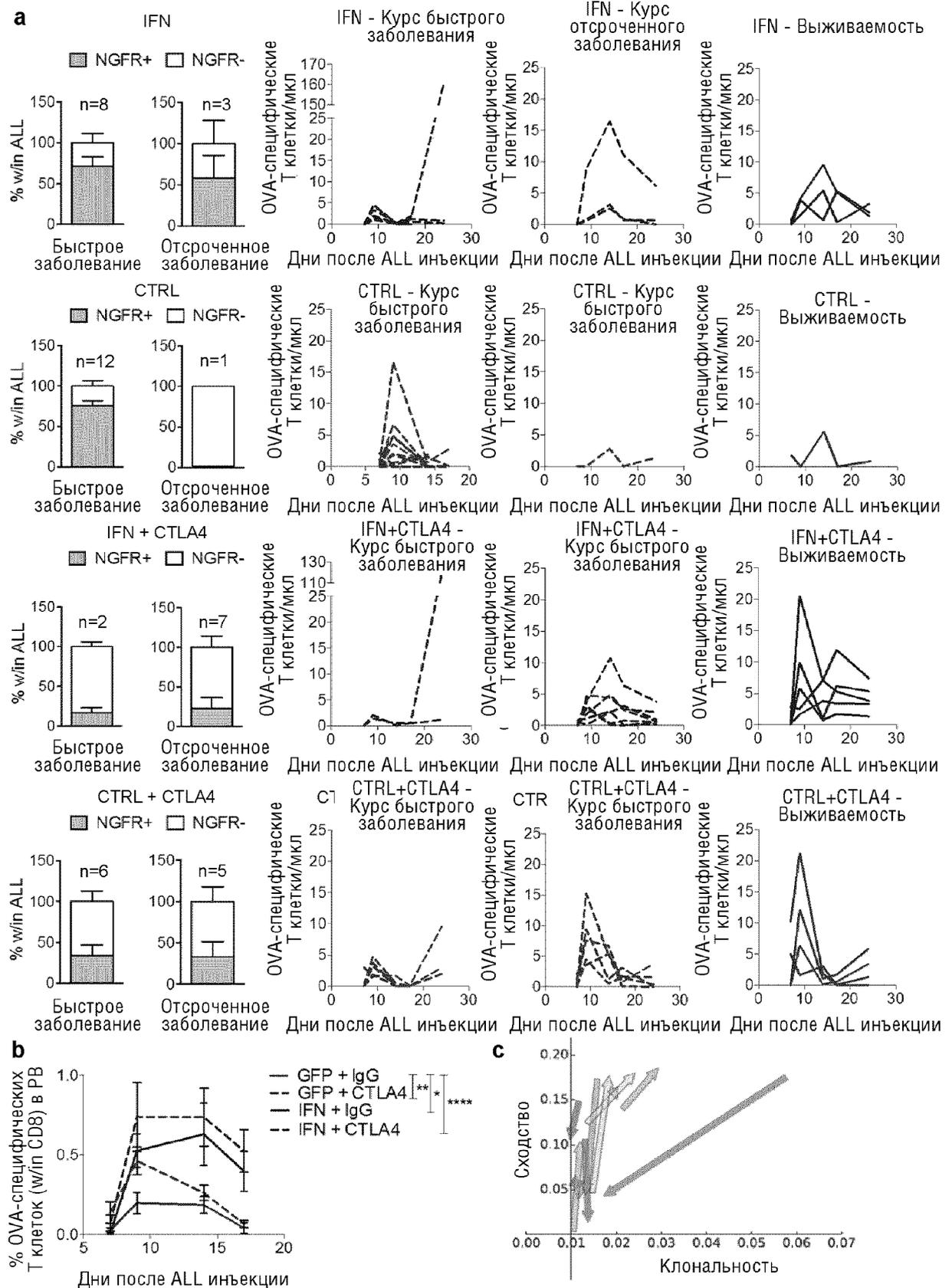
ФИГ.14



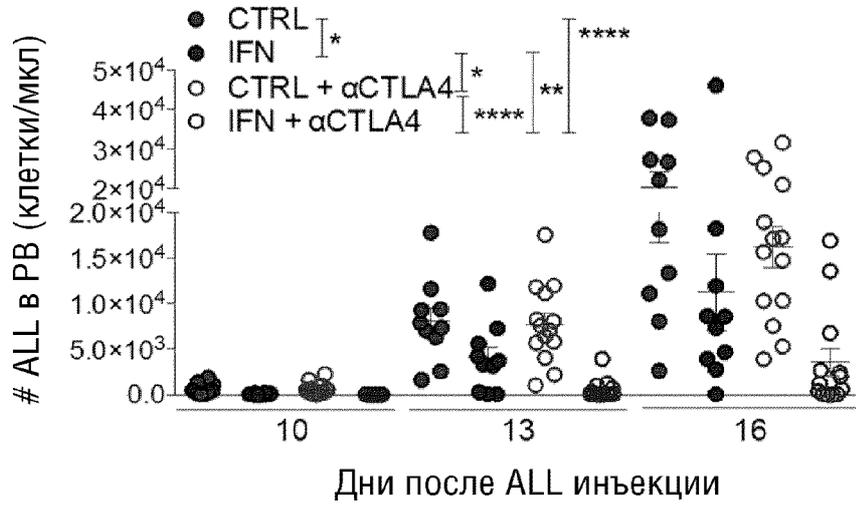
ФИГ.15



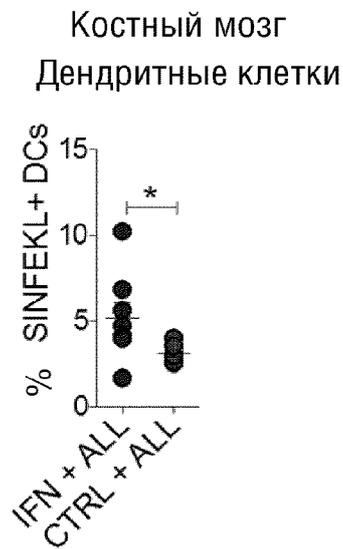
ФИГ.16



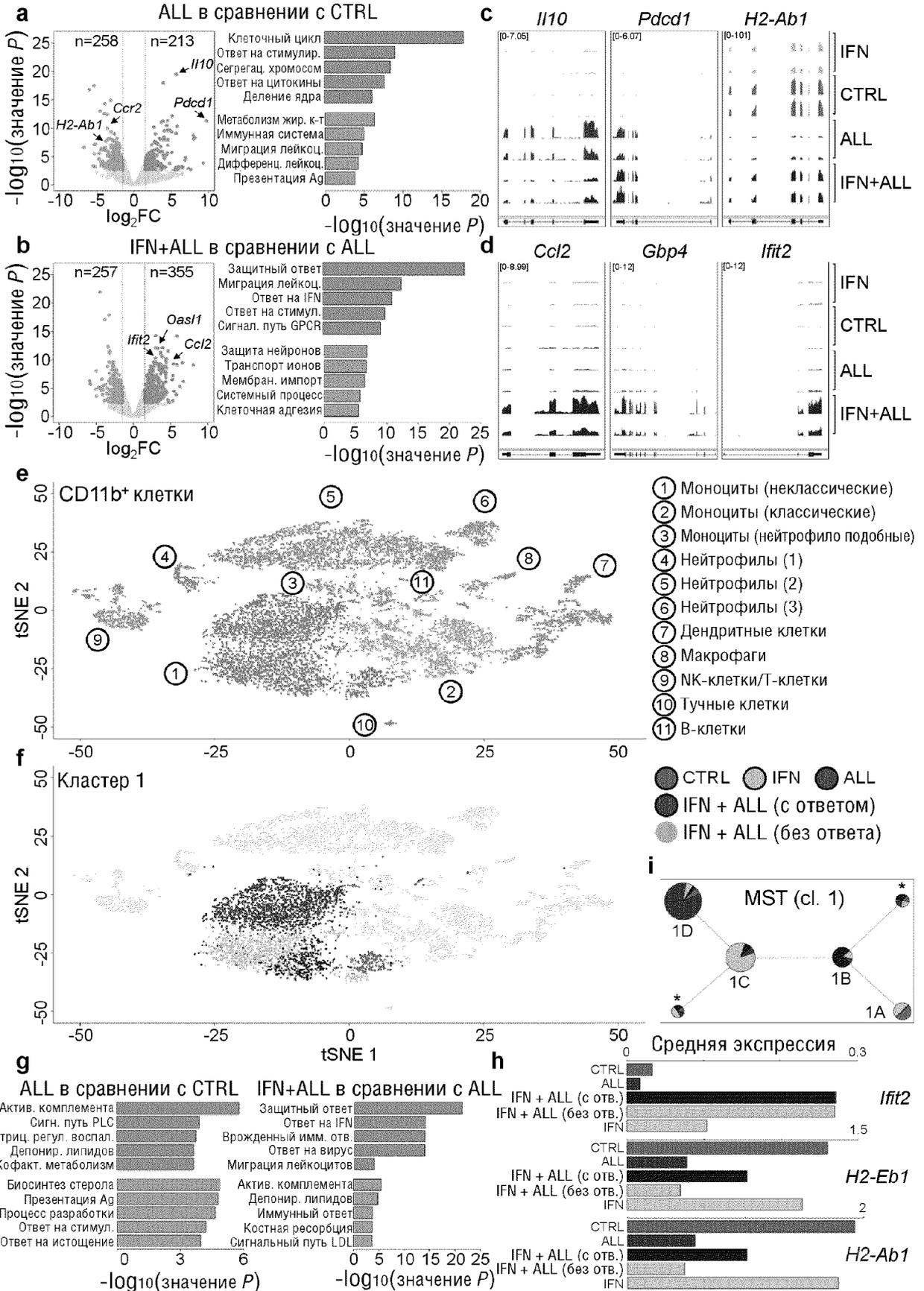
ФИГ.17



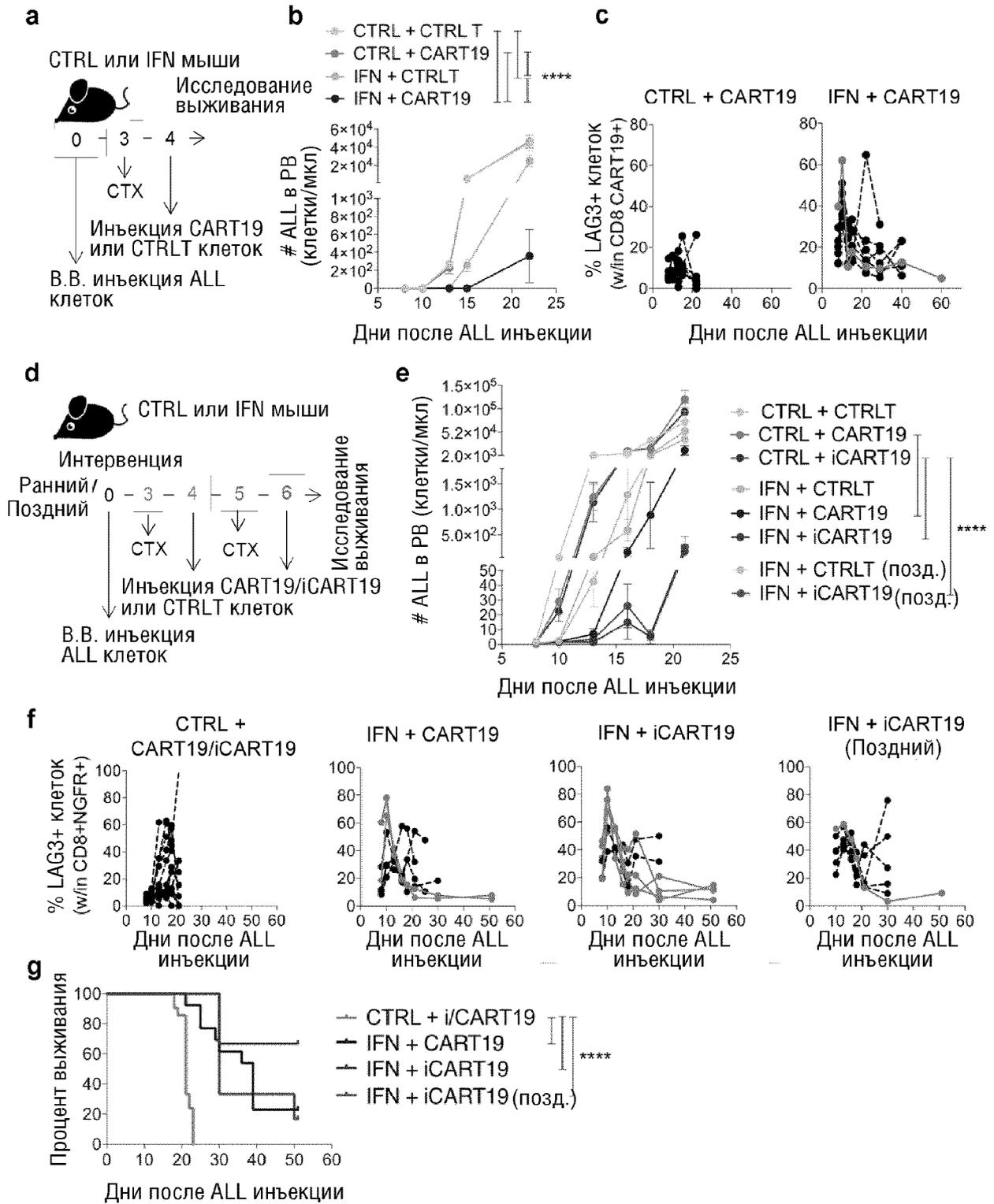
ФИГ.18



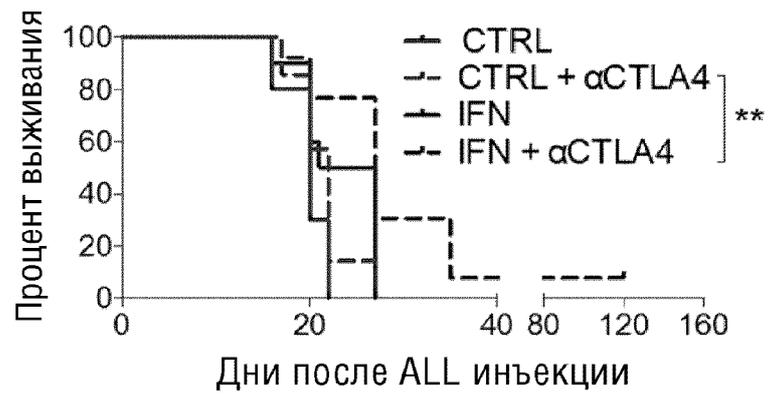
ФИГ.19



ФИГ.20

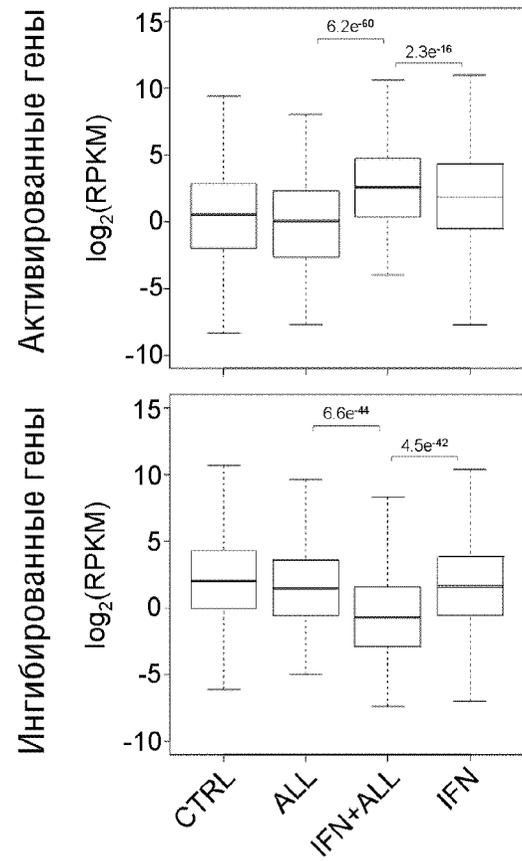


ФИГ.21

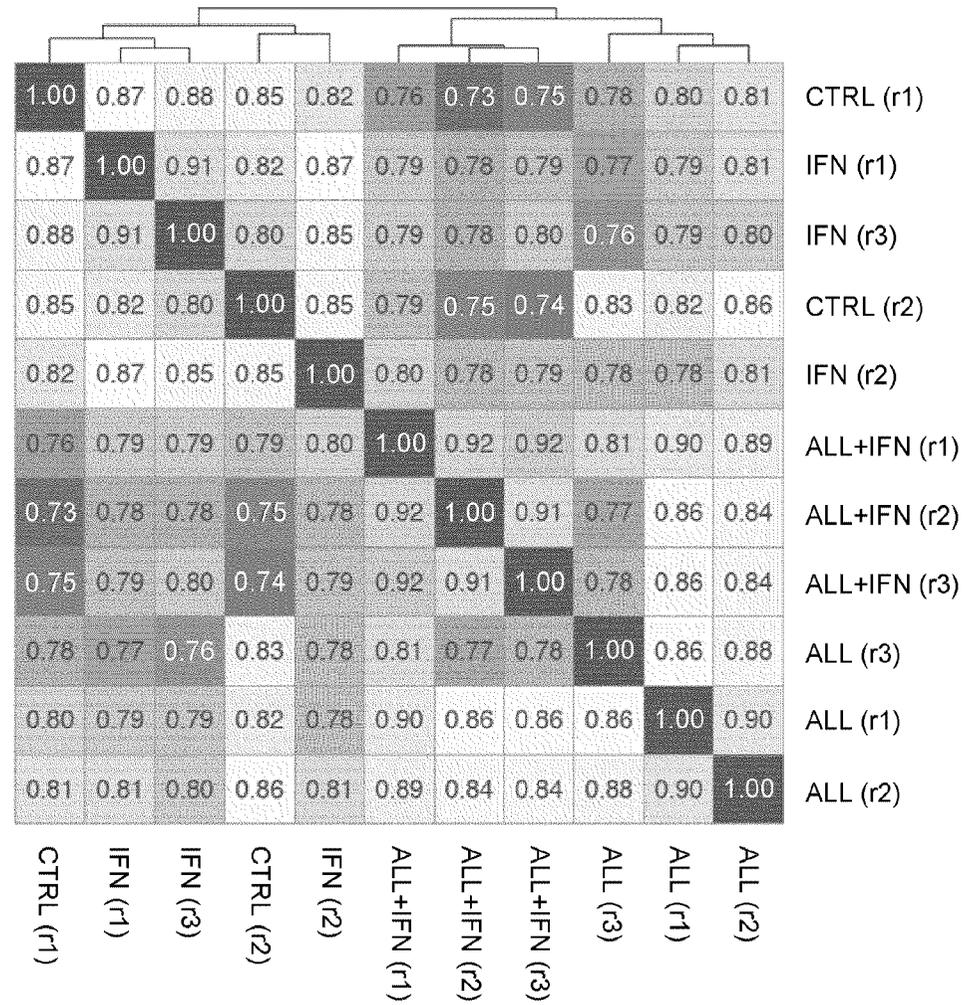


ФИГ.22

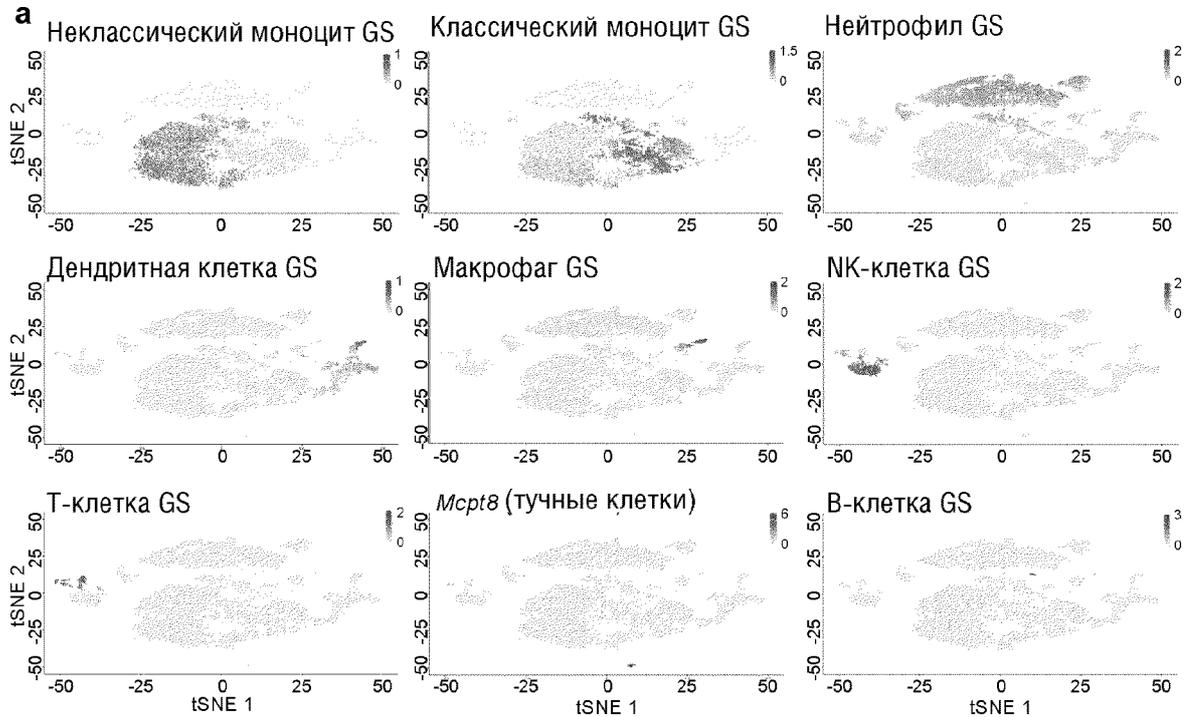
а IFN + ALL в сравнении с ALL



б

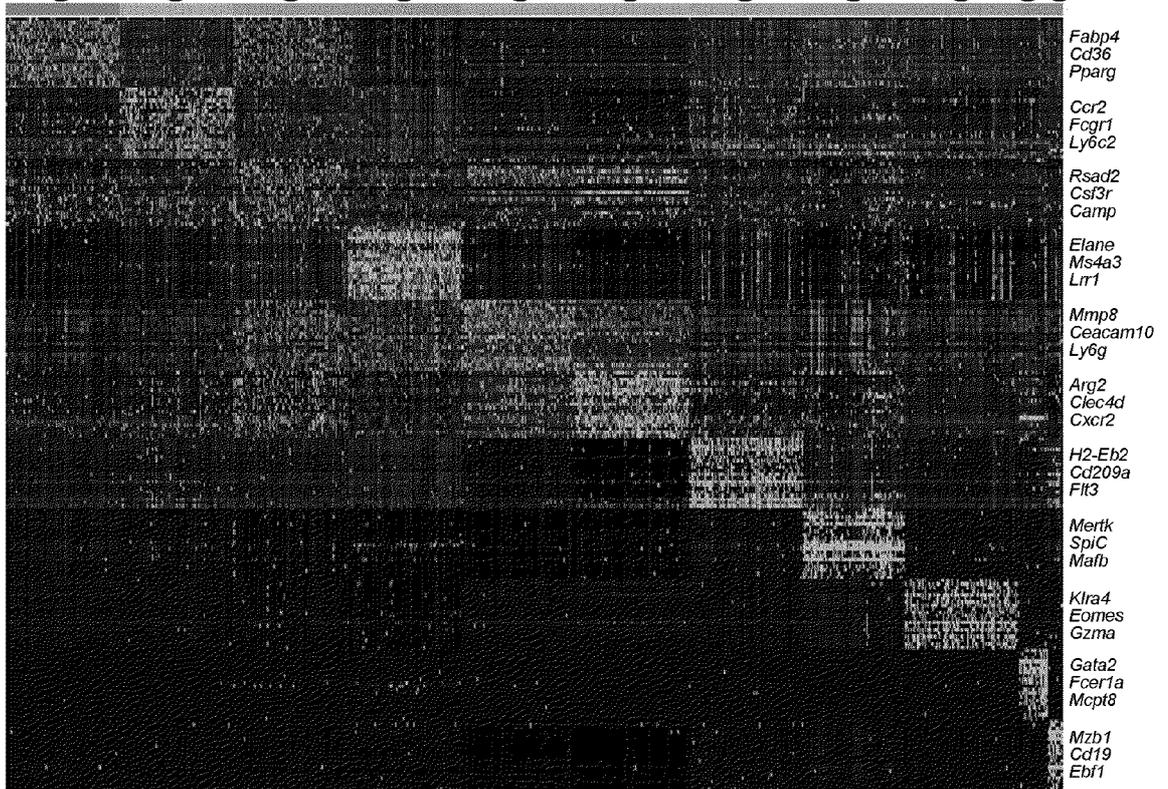


ФИГ.23



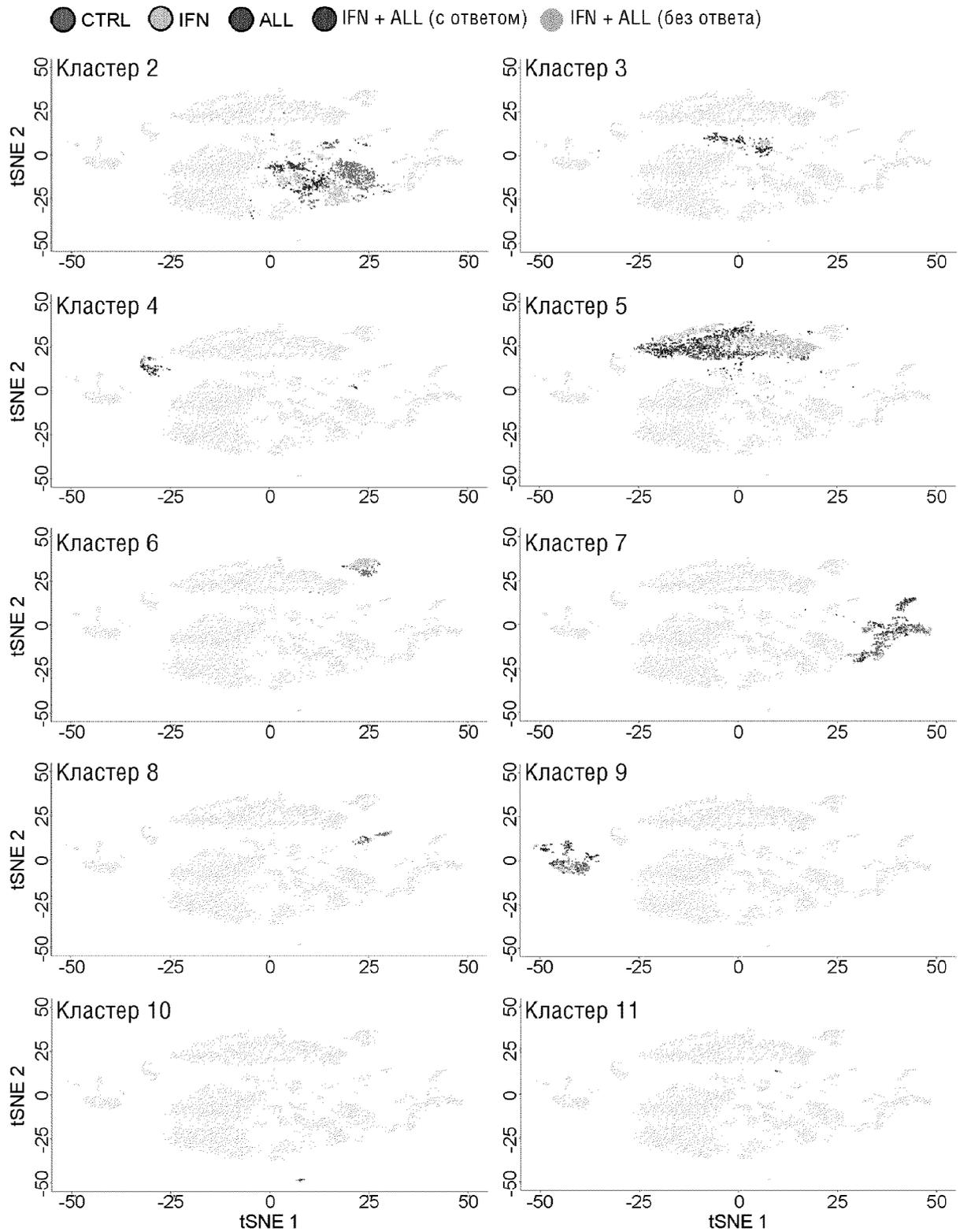
b

Моно некласс.	Моно Класс.	Моно подобные	Неу- (1)	Нейт. (2)	Нейт. (3)	DC	Макроф.	NK/T	Тучные	B
①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪

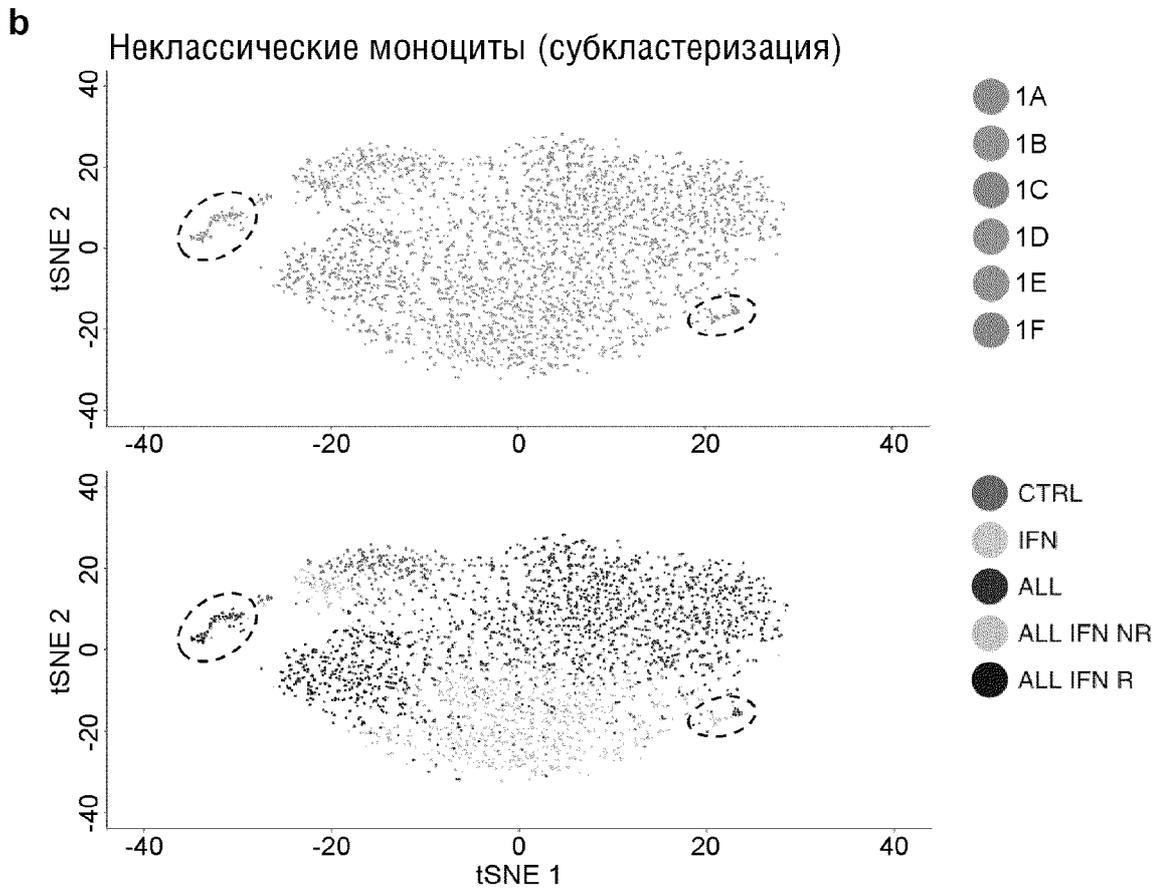
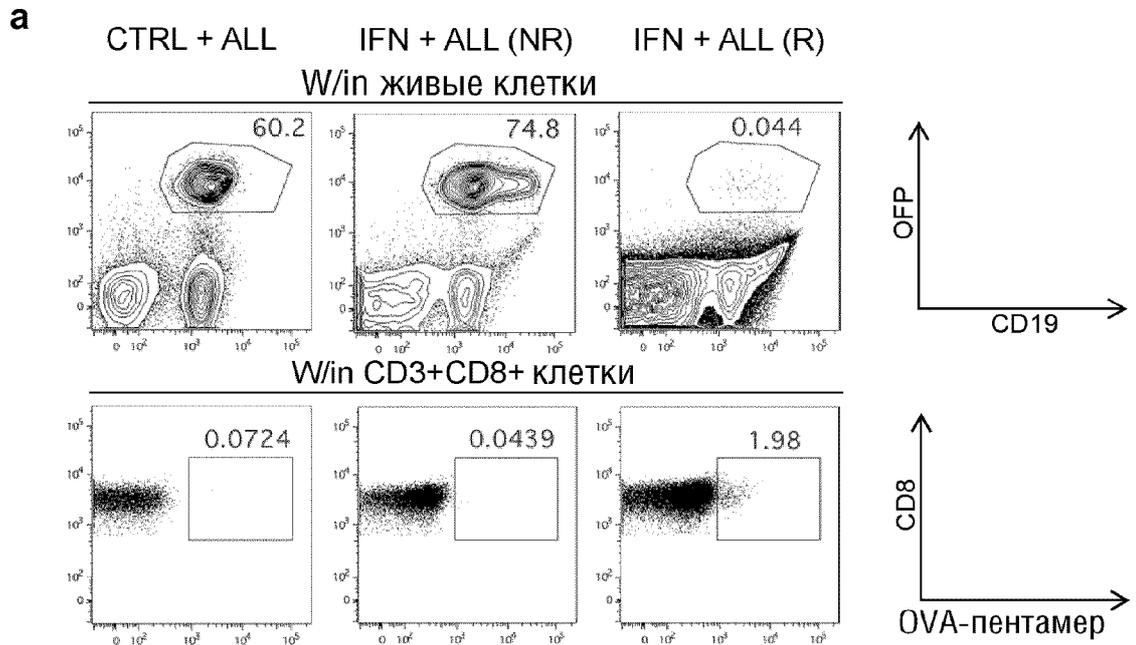


-2 -1 0 1 2

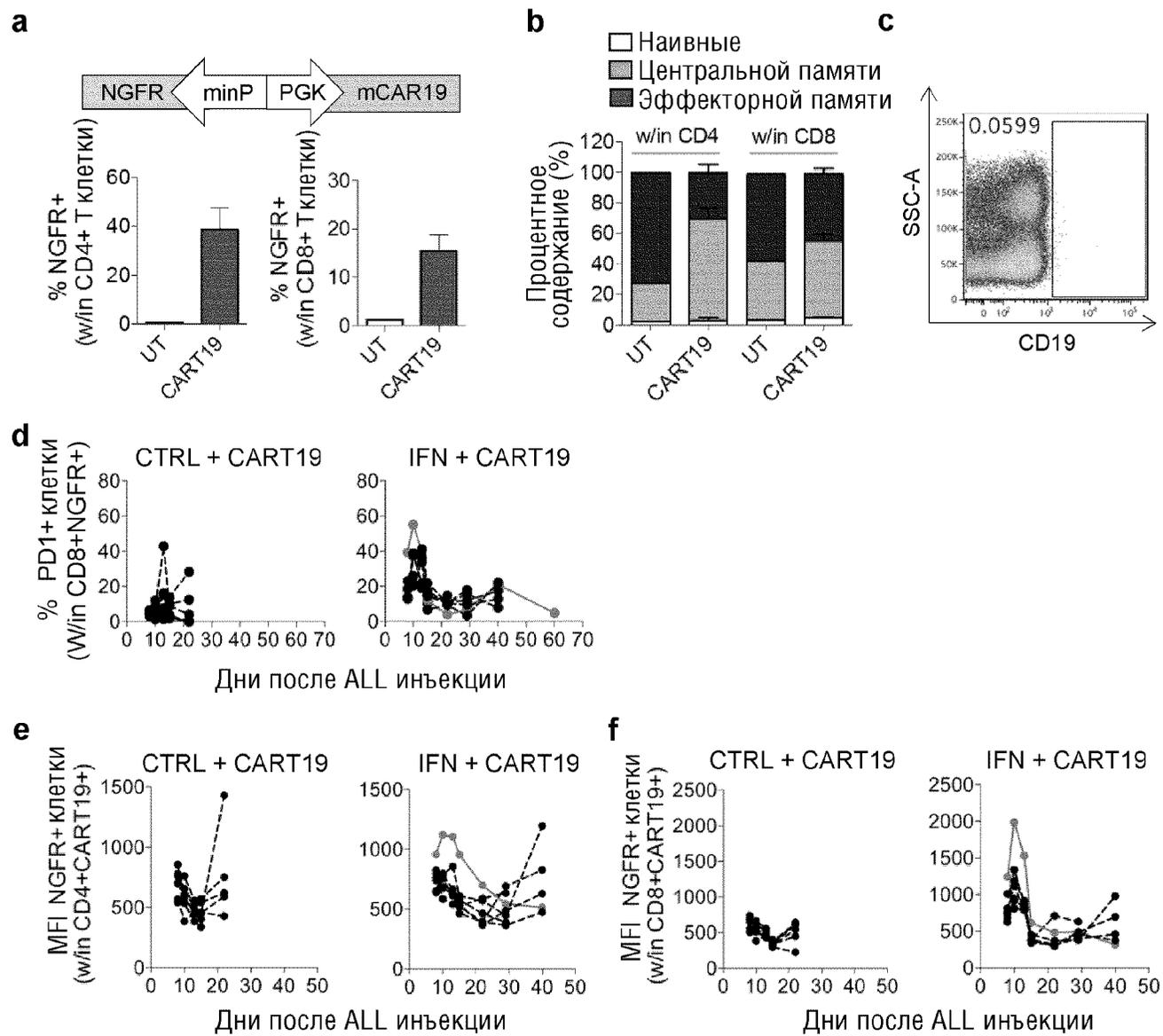
ФИГ.24



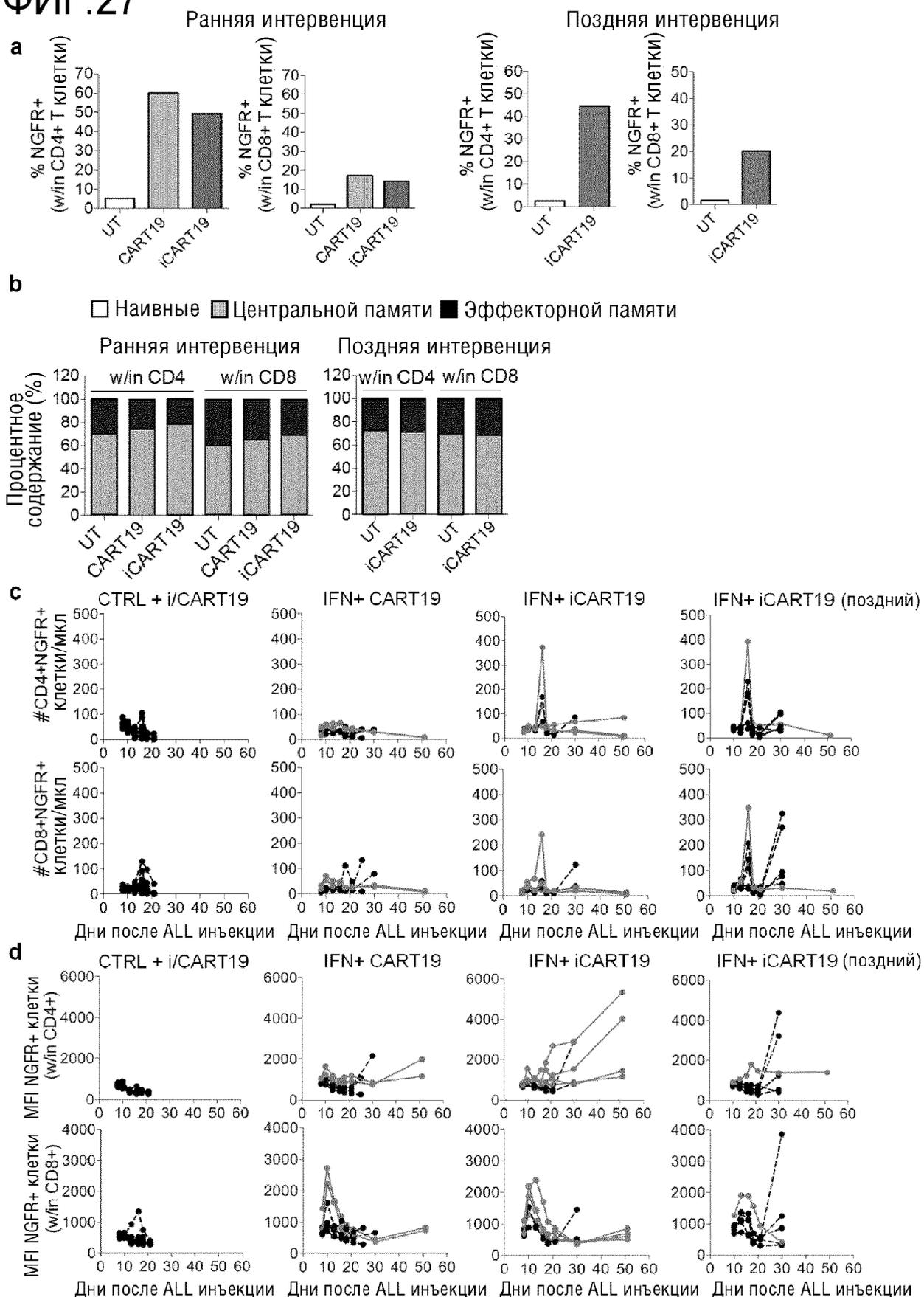
ФИГ.25



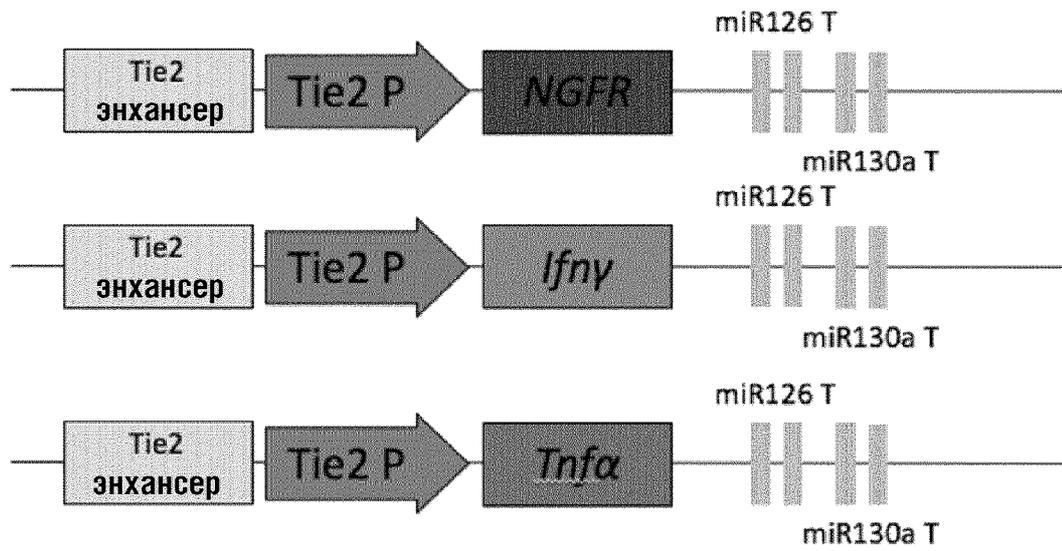
ФИГ.26



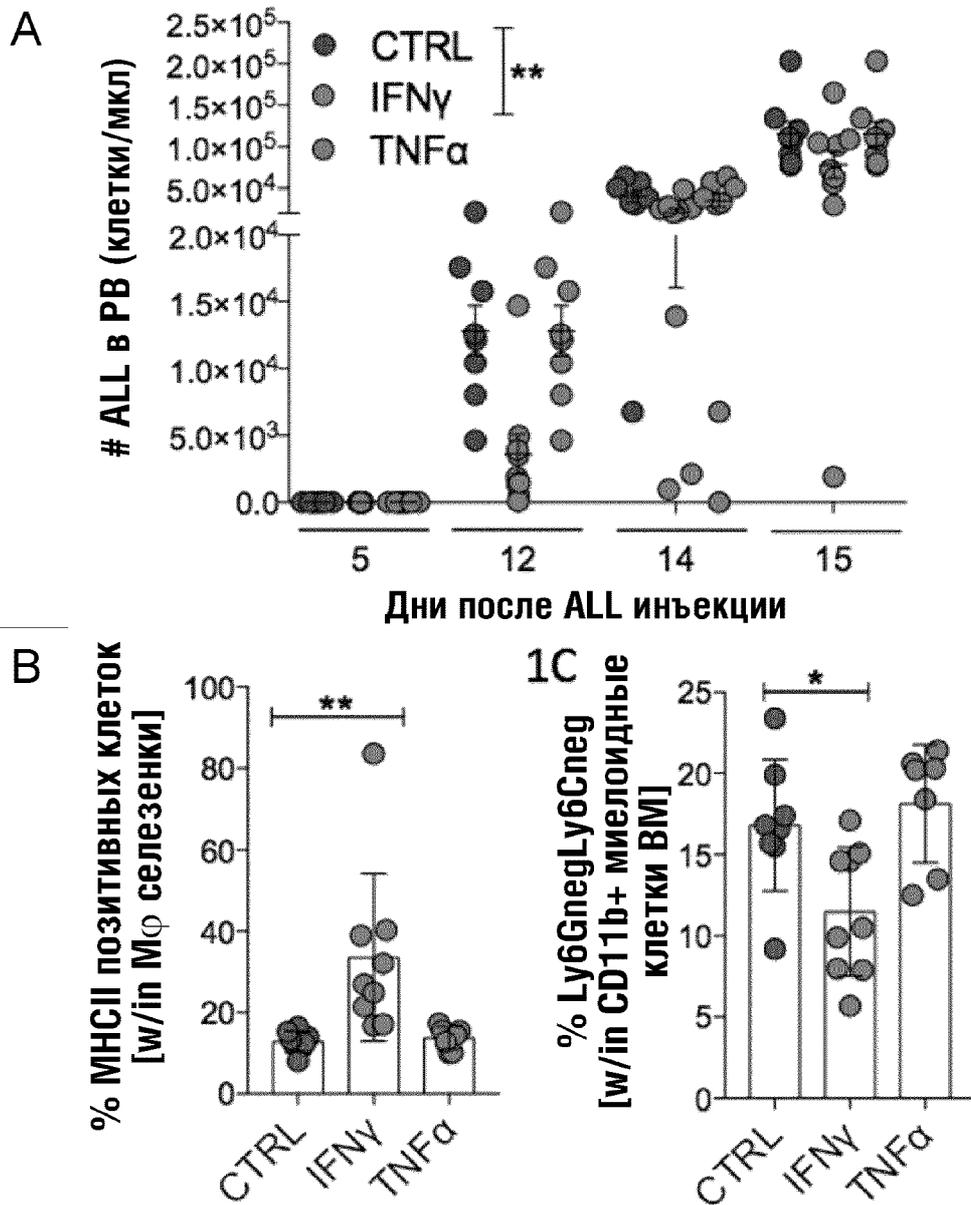
ФИГ.27



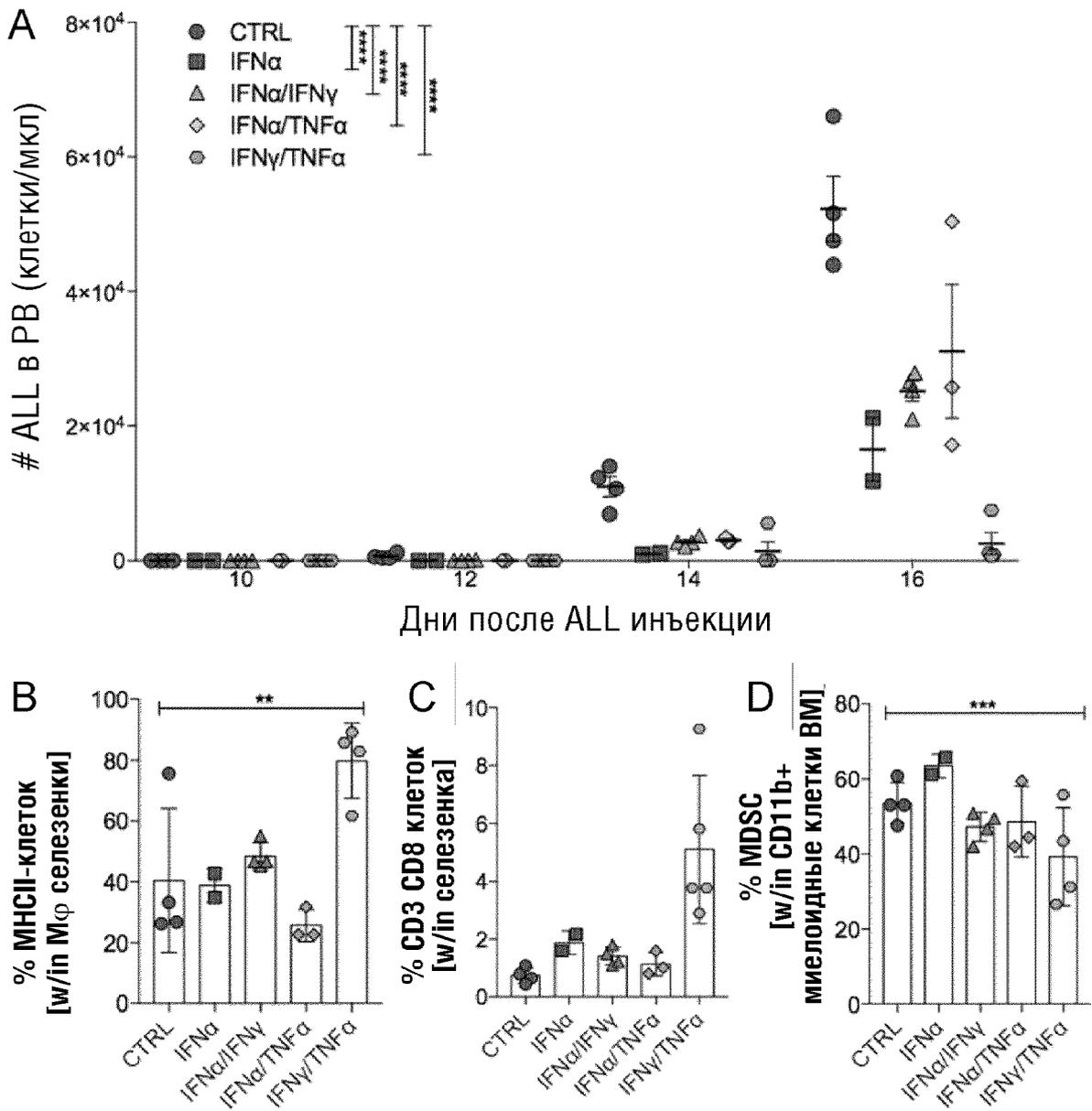
ФИГ.28



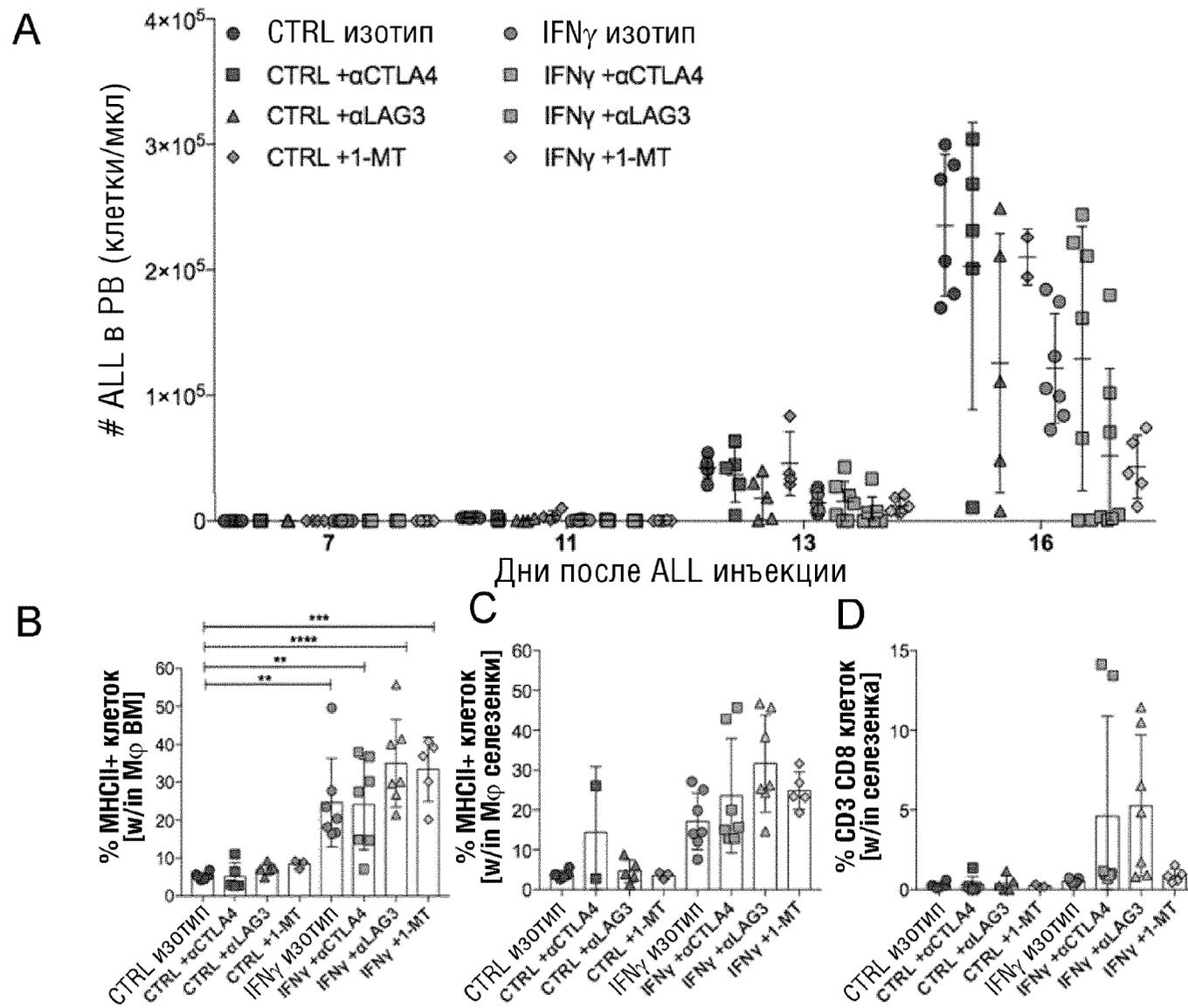
ФИГ. 29



ФИГ. 30



ФИГ. 31



ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202393155**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

МПК:

C12N 5/0789 (2010.01)
C12N 5/0786 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)

СПК:

C12N 5/0645
C12N 5/0647
A61P 35/00

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
 Espacenet, EAPATIS, Google, Reaxys

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	EA201171335 A1 (ФОНДАЦИОНЕ ЧЕНТРО САН РАФАЭЛЕ ДЕЛЬ МОНТЭ ТАБОР), 30.05.2012 ф-ла, реферат, стр.39,43	1-38
Y	GIULIA ESCOBAR et al. Genetic engineering of hematopoiesis for targeted IFN- α delivery inhibits breast cancer progression. SCI TRANSL MED. 2014 Jan 1;6(217):217ra3. doi: 10.1126/scitranslmed.3006353. реферат, фиг.2А	1-38
Y	MARIO CATARINELLA et al. IFN α gene/cell therapy curbs colorectal cancer colonization of the liver by acting on the hepatic microenvironment. EMBO MOL MED. 2016 Feb 1;8(2):155-70. doi: 10.15252/emmm.201505395. реферат, стр.165-167.	1-38
Y	PADMANEE SHARMA et al. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative Padmanee Sharma et al. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. CELL. 2015 Apr 9;161(2):205-14. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.030. реферат, стр.211	1-38
A	SHIN HAMADA et al. MiR-126 Acts as a Tumor Suppressor in Pancreatic Cancer Cells via the Regulation of ADAM9. ANGIOGENESIS, METASTASIS, AND THE CELLULAR MICROENVIRONMENT. MOLECULAR CANCER RESEARCH. JANUARY 01 2012.10(1):3-10. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0272. реферат	1-38

 последующие документы указаны в продолжении графы

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

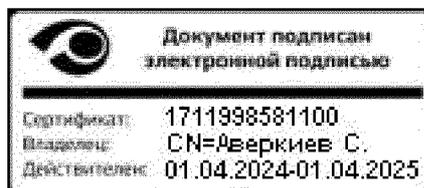
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи
евразийской заявки или после нее«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию
и т.д."P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки,
но после даты испрашиваемого приоритета"«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и при-
веденный для понимания изобретения«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска,
порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска,
порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами
той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 30 сентября 2024 (30.09.2024)

Уполномоченное лицо:
 Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев