(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202490441 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.04.16

(22) Дата подачи заявки
2022.08.24

(51) Int. Cl. ***C12N 5/10*** (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНЫХ ИММУННЫХ КЛЕТОК

(31) **63/236,443**
(32) **2021.08.24**
(33) **US**
(86) **PCT/EP2022/073626**
(87) **WO 2023/025862 2023.03.02**

(71) Заявитель:
АстраЗенека АБ (SE)

(72) Изобретатель:
Мальхотра Дипали, Оверстрит Майкл, Муди Гордон, Коббольд Марк, Бонданза Аттилио (US)

(74) Представитель:
Билык А.В., Поликарпов А.В., Соколова М.В., Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам, клеткам и композициям для получения популяций клеток и композиций для адоптивной клеточной терапии. В частности, в данном документе предусмотрены способы размножения и пролиферации первичных иммунных клеток, в том числе популяций Т-клеток.

202490441 A1

202490441 A1

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНЫХ ИММУННЫХ КЛЕТОК

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 63/236443, поданной 24 августа 2021 года, раскрытие которой полностью включено посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение относится к способам, клеткам и композициям для получения популяций клеток и композиций для адоптивной клеточной терапии. В частности, в данном документе предусмотрены способы размножения и пролиферации первичных иммунных клеток, в том числе популяций Т-клеток.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В последние годы разработанные средства адоптивной клеточной терапии стали революционными для пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями, поскольку FDA впервые одобрило средство терапии на основе химерных антигенных рецепторов (CAR) в 2017 году. (Larson & Maus, *Nat Rev Cancer* 21, 145–161 (2021); Yu, *et al.*, *Nature Reviews Drug Discovery* 19**,** 583-584 (2020)). С 2017 года выросло количество клинических испытаний по изучению средств адоптивной клеточной терапии, таких как CAR-Т-клетки, CAR-натуральные киллеры (NK) и CAR-NKT-клетки, Т-клеточный рецептор (TCR)-Т-клетки, инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), опухольспецифические Т-клетки, нацеливающиеся на антиген, и другие средства клеточной терапии. Совсем недавно в клиническую практику для лечения солидных опухолей поступили первые CAR-макрофаги (CAR-M) (Mukhopadhyay, *Nat Methods* 17, 561 (2020); Klichinsky, *et al., Nat Biotechnol.*, 8, 947-953 (2020); Villanueva, *Nature Reviews Drug Discovery* 19**,** 308 (2020); ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04660929)).

[0004] Хотя существует большой потенциал средств клеточной терапии для лечения пациентов, ряд факторов ограничивает широкую разработку и введение данных лекарственных средств. Большинство средств клеточной терапии в настоящее время производятся аутологичным способом и ассоциированы с переменным качеством клеточных продуктов, синдромом высвобождения цитокинов и другими видами токсичности, длительными сроками изготовления, высокими затратами и ограниченным периодом, в течение которого данные средства терапии могут быть генетически модифицированы для повышения их эффективности. (Larson &Maus, *Nat Rev Cancer* 21, 145–161 (2021)).

[0005] В большинстве средств клеточной терапии, которые в настоящее время проходят тестирование в клинических условиях, применяются CAR-T- или CAR-NK-

клетки, поскольку эти субпопуляции иммунных клеток характеризуются сильной цитотоксичностью. Зрелые первичные человеческие Т-клетки, которые используются для данных средств терапии, встречаются в крови и вторичных лимфоидных органах людей, где они действуют с целью защиты индивидуумов от инфекционных заболеваний и рака. Т-клетки состоят из субпопуляций αβ ("классические" Т-клетки) и γδ. Т-клетки αβ состоят из $CD4^+$ хелперных Т-клеток и $CD8^+$ цитотоксических Т-клеток. $CD4^+$ Т-клетки можно дополнительно подразделить на клетки TH1, клетки TH2, клетки TH9, клетки TH17, клетки TFH и регуляторные Т-клетки. Многие субпопуляции Т-клеток αβ характеризуются сильной цитотоксической функцией, которая была использована для разработки средств клеточной терапии.

[0006] Аналогично, зрелые первичные человеческие NK-клетки, которые можно применять для средств клеточной терапии, встречаются в крови, вторичных лимфоидных органах, печени и ассоциированных со слизистой оболочкой лимфоидных тканях, участках, которые NK-клетки патрулируют на наличие патогенов или трансформированных клеток. (Jianhua, *et al., Trends in Immunology* 34, 573-582 (2013). Подобно Т-клеткам, у NK-клеток наблюдается сильная цитотоксическая функция, и они представляют интерес для разработки средств клеточной терапии.

[0007] Однако первичные человеческие иммунные клетки, такие как Т-клетки и NK-клетки, также обладают ограниченным потенциалом пролиферации *in vitro* и *in vivo*, что ограничивает возможность их применения для создания широко распространенных, готовых для применения средств клеточной терапии. Кроме того, данная ограниченная способность к пролиферации зрелых первичных человеческих иммунных клеток ухудшает возможность их генетического редактирования для смягчения синдрома высвобождения цитокинов и других потенциальных видов токсичности, ассоциированных с клеточной терапией, преодоления проблем, ассоциированных с микроокружением опухоли, и предотвращения отторжения аллогенных продуктов клеточной терапии у пациентов.

[0008] Линии лейкозных клеток от пациентов десятилетиями изучались в культуре клеток, где их трансформированный статус придает им долгосрочную пролиферативную способность, что позволяет применять их в ряде клеточных анализов. Это, в свою очередь, способствовало разработке многочисленных средств терапии. Однако данным клеткам обычно не хватает мощной цитотоксической функции зрелых первичных человеческих Т- и NK-клеток, поскольку они зачастую являются незрелыми или получены из нефункциональных клонов Т-клеток. Трансформированную природу данных клеток можно сопоставить с коллекцией мутаций, которые также зачастую встречаются у пациентов с Т-клеточным острым лимфобластным лейкозом. Более того, зрелые Т-клетки от отличных от

человека приматов могут трансформироваться вирусами герпеса посредством путей, которые сходятся по некоторым из тех же механизмов, которые участвуют в трансформации первичных человеческих Т-клеток у пациентов. (Biesinger, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3116–3119 (1992); Weber, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11049–11053 (1993); Fickenscher H, Fleckenstein B., *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356(1408):545-67 (2001); Tsygankov, *J Cell Physiol.* 203(2):305-18 (2005).

[0009] Хотя предыдущие исследования позволяют предположить, что первичные человеческие Т-клетки могут быть иммортализованы за счет сверхэкспрессии таких факторов, как теломераза-обратная транскриптаза (TERT) (Barsov, *Methods Mol Biol.* 511, 143-58 (2009); Rufer, *et al., Blood* 98, 597-603 (2001); Hooijberg, *et al., J Immunol.* 165, 4239-45 (2000)) и транскрипционный трансактиваторный белок Tax вируса Т-клеточного лейкоза человека 1 типа или вируса Т-клеточного лейкоза человека 2 типа (HTLV-1/HTLV-2) (Akagi, *et. al., Oncogene* 14, 2071–2080 (1997); Grassmann, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 3351–3355 (1989); Ren, *et al., J. Biol. Chem.* 287, 34683-34693 (2012), или такими вирусами, как *Herpesvirus saimiri (*Biesinger, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3116–3119 (1992); Weber, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11049–11053 (1993)) и HTLV-1/HTLV-2, данные подходы не очень воспроизводимы и могут привести к перепрограммированию модифицированных или инфицированных клеток. Кроме того, клетки, пролиферативная долговечность которых была увеличена за счет сверхэкспрессии TERT, по-прежнему нуждаются в использовании питающих клеток или обширной экзогенной стимуляции посредством их Т-клеточных рецепторов для управления пролиферацией (Rufer, *et al., Blood* 98, 597-603 (2001); Hooijberg, *et al., J Immunol.* 165, 4239-45 (2000)). Применение аллогенных питающих клеток и обширная повторная стимуляция нежелательны при создании банка зрелых первичных человеческих Т- или NK-клеток, поскольку данные методологии сложно масштабировать, и в конечном итоге они могут привести клетки к дисфункциональному состоянию. Более того, применение инфекционных агентов, способных трансформировать зрелые первичные человеческие Т- или NK-клетки, ограничивает использование данных клеток при разработке средств клеточной терапии, поскольку пациенты зачастую имеют ослабленный иммунитет.

[00010] В свете данных проблем существует значительная потребность в создании альтернативных способов, с помощью которых можно продлить пролиферативную долговечность первичных иммунных клеток человека для того, чтобы сделать возможным крупномасштабное изготовление аллогенных цитотоксических клеток. В настоящем изобретении описаны способы и клетки, которые позволяют удовлетворить данную неудовлетворенную потребность.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00011] Настоящим изобретением в данном документе предусмотрен способ получения популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS), включающий: (a) введение одного или нескольких генетических изменений в первичные иммунные клетки и (b) культивирование первичных иммунных клеток в культуральной среде; где культивирование обеспечивает индуцирование пролиферации первичных иммунных клеток с получением популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS).

[00012] Настоящим изобретением в данном документе также предусмотрен способ получения популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS), включающий: (a) подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных регуляторных факторов в первичных иммунных клетках, где эндогенный регуляторный фактор представляет собой ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитор циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B) или S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазу (MTAP); (b) подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных генов, связанных с иммунитетом, в первичных иммунных клетках, где эндогенный ген, связанный с иммунитетом, представляет собой ген бета-2-микроглобулина (B2M) и/или константного участка α-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC); и (c) культивирование первичных иммунных клеток в культуральной среде; где культивирование обеспечивает индуцирование пролиферации первичных иммунных клеток с получением популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS).

[00013] Настоящим изобретением в данном документе дополнительно предусмотрен способ получения популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS), включающий: (a) подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных регуляторных факторов в первичных иммунных клетках, где эндогенный регуляторный фактор представляет собой ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитор циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B) или S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазу (MTAP); (b) подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных генов, связанных с иммунитетом, в первичных иммунных клетках, где эндогенный ген, связанный с иммунитетом, представляет собой ген бета-2-микроглобулина (B2M) и/или константного участка α-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC); и (c) культивирование первичных иммунных клеток в культуральной среде; где культивирование обеспечивает индуцирование пролиферации первичных иммунных

клеток с получением популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS).

[00014] Настоящим изобретением в данном документе предусмотрен способ получения популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS), включающий: (a) подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных регуляторных факторов в первичных иммунных клетках, где эндогенный регуляторный фактор представляет собой ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитор циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B) или S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазу (MTAP); и (b) культивирование первичных иммунных клеток в культуральной среде; где культивирование обеспечивает индуцирование пролиферации первичных иммунных клеток с получением популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS).

[00015] Настоящим изобретением в данном документе также предусмотрена популяция сконструированных иммунных клеток, полученная в соответствии с описанными способами. Настоящим изобретением дополнительно предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая вышеупомянутую популяцию сконструированных иммунных клеток и фармацевтически приемлемый носитель. Настоящим изобретением в данном документе дополнительно предусмотрен способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества вышеупомянутой фармацевтической композиции.

[00016] Настоящим изобретением предусмотрена сконструированная Т-клетка, которая не экспрессирует ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитор циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B), S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазу (MTAP), бета-2-микроглобулин (B2M) и/или константный участок α-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC).

[00017] Настоящим изобретением предусмотрена сконструированная Т-клетка, экспрессирующая трансген, кодирующий сверхбольшой белок В-клеточной лимфомы (Bcl-XL), где сконструированная Т-клетка не экспрессирует ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитор циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B), S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазу (MTAP) и/или гомолог фосфатазы и тензина (PTEN).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00018] На фиг. 1A-1B проиллюстрировано, что вставка Bcl-xL придавала селективное преимущество для выживаемости Т-клеток в долгосрочной культуре. Общие первичные человеческие Т-клетки (фиг. 1A) или очищенные первичные человеческие $CD8^+$ Т-клетки

(фиг. 1B) выделили, стимулировали, трансфицировали и повторно стимулировали так, как описано на фиг. 2.

[00019] На фиг. 2 проиллюстрирован способ идентификации повышающих выживаемость трансгенов в первичных человеческих Т-клетках.

[00020] На фиг. 3A-3B проиллюстрировано, что устранение экспрессии регулирующих клеточный цикл молекул усиливало пролиферативную способность Т-клеток в долгосрочной культуре.

[00021] На фиг. 4A-4D проиллюстрировано, что повторная стимуляция T_{REX}+Bcl-xL-клеток может усилить их пролиферацию в долгосрочной культуре. На фиг. 4A продемонстрирована общая кратность размножения T_{REX}+Bcl-xL-клеток с течением времени. На фиг. 4B-4D продемонстрирована общая кратность размножения T_{REX}+Bcl-xL-клеток и T_{REX} +Bcl-xL-клеток с дефицитом по PTEN, которые повторно стимулировали Dynabeads с αCD3 или αCD3/αCD28 в течение 3 дней, после чего с клеток удаляли гранулы. Отслеживали общую кратность размножения и отображали ее на графике для покоящихся и обработанных клеток с течением времени. Стрелками указаны периоды повторной стимуляции. Черной стрелкой указан момент времени оценки дополнительных вариантов повторной стимуляции. Фиг. 4A-4D представлены в логарифмическом масштабе.

[00022] На фиг. 5A-5B проиллюстрировано, что T_{REX}+Bcl-xL-клетки зависят от IL-2 для размножения и выживаемости в культуре клеток. Общую кратность размножения (фиг. 5A) и жизнеспособность клеток (фиг. 5B) оценивали для 3 T_{REX}+Bcl-xL-линий от двух разных доноров, созданных так, как показано на фиг. 3, выращенных в присутствии возрастающих количеств рекомбинантного человеческого интерлейкина 2 (IL-2) в течение 6 дней.

[00023] На фиг. 6A-6K проиллюстрировано, что T_{REX}+Bcl-xL-клетки фенотипически напоминают нормальные первичные человеческие $CD8^+$ Т-клетки. T_{REX}+Bcl-xL-клетки окрашивали фиксируемым красителем на жизнеспособность, а также с помощью панели антител к CD3, CD4, CD8, CD28, CD45RO, CCR7, PD1 и TIGIT. T_{REX}+Bcl-xL-линии демонстрируют экспрессию CD3 (фиг. 6A) и характеризуются высокой частотой $CD8^+$ клеток (фиг. 6B). T_{REX}+Bcl-xL-линии характеризовались специфическими свойствами донора или клеточной линии, что проиллюстрировано экспрессией таких маркеров, как PD1 и TIGIT (фиг. 6C), CD28 (фиг. 6D), а также CCR7 и CD45RO (фиг. 6E), независимо от сверхэкспрессии Bcl-xL (GFP^+ и GFP^- клетки). T_{REX}+Bcl-xL-линии демонстрируют экспрессию CCR2 (фиг. 6F), CCR5 (фиг. 6G) и CXCR3 (фиг. 6J). Экспрессия CCR6 (фиг. 6H) была гетерогенной, тогда как экспрессия CCR7 (фиг. 6I) и CXCR5 (фиг. 6K) была низкой или отсутствовала.

[00024] На фиг. 7A-7F проиллюстрировано, что T_{REX}+Bcl-xL-клетки являются цитотоксическими. Процент цитолиза рассчитывали через 12 часов (фиг. 7A) и 24 часа (фиг. 7B) после добавления эффекторных клеток и активатора Т-клеток или контрольного антитела. Надосадочные жидкости собирали из совместных культур через 72 часа после добавления эффекторных клеток и активатора Т-клеток и анализировали на наличие интерферона γ (IFN-γ) (фиг. 7C), IL-2 (фиг. 7D), фактора некроза опухоли α (TNF-α) (фиг. 7E) и гранзима B (фиг. 7F).

[00025] На фиг. 8A-8G проиллюстрировано, что T_{REX}+Bcl-xL-клетки могут давать функциональные CAR-T_{REX}+Bcl-xL-клетки. Экспрессию поверхностного CAR оценивали через 22 дня после трансдукции с помощью проточной цитометрии (фиг. 8A). Процент цитолиза рассчитывали через 12 часов (фиг. 8B) и 24 часа (фиг. 8C) после добавления эффекторных клеток. Активность CAR-T_{REX} сравнивали с активностью CAR-Т-клеток и CAR-$CD8^+$ Т-клеток. Надосадочные жидкости собирали из совместных культур через 72 часа после добавления эффекторных клеток и анализировали на наличие IFN-γ (фиг. 8D), IL-2 (фиг. 8E), TNF-α (фиг. 8F) и гранзима B (фиг. 8G).

[00026] На фиг. 9A-9C продемонстрировано, что T_{REX}-клетки мигрируют в те же локации, что и первичные CD8+ Т-клетки, и способны отвечать на IL-2 in vivo.

[00027] На фиг. 10A-10B продемонстрировано, что CAR-T_{REX}-клетки отвечают на IL-2 и IL-15 in vivo.

[00028] На фиг. 11A-11D продемонстрировано, что CAR-T_{REX}-клетки нацеливаются на солидные опухоли in vivo.

[00029] На фиг. 12 продемонстрировано, что воспроизводимость изменений REX обеспечивает усиленную пролиферацию in vitro по сравнению с немодифицированными, соответствующими по донору CD8+ Т-клетками. Кратность размножения T_{REX}-клеток или соответствующих по донору первичных (без изменений) CD8+ Т-клеток отслеживали с течением времени у 4 дополнительных здоровых доноров.

[00030] На фиг. 13A и 13B продемонстрировано, что CAR-T_{REX}-клетки нацеливаются на BCMA+ опухолевые клетки аналогично немодифицированным CAR-Т-клеткам.

[00031] На фиг. 14 продемонстрировано, что T_{REX}-клетки к BCMA и T_{REX}-клетки к HER2 продуцируют более низкие уровни воспалительных цитокинов, чем CAR-Т-клетки к BCMA и CAR-Т-клетки к HER2 после взаимодействия с CAR.

[00032] На фиг. 15 продемонстрировано, что CAR-T_{REX}-клетки нацеливаются на BCMA+ опухолевые клетки, сохраняются в анализе серийного уничтожения и отвечают на IL-2.

[00033] На фиг. 16 продемонстрировано, что фенотип T_{REX}-клеток можно получить с помощью различных комбинаций изменений.

[00034] На фиг. 17 продемонстрировано, что T_{REX}-клетки редактированы в ожидаемых локусах.

[00035] На фиг. 18A, 18B и 18C продемонстрировано, что T_{REX}-клетки характеризуются обогащением профилей экспрессии генов, ассоциированных с клеточным циклом.

[00036] На фиг. 19 продемонстрировано, что выживаемость и пролиферация T_{REX}-клеток зависят от IL-2.

[00037] На фиг. 20A и 20B продемонстрировано, что CAR-T_{REX}-клетки нацеливаются на HER2hi опухолевые клетки аналогично немодифицированным CAR-T-клеткам с меньшей общей выработкой цитокинов.

[00038] На фиг. 21 продемонстрировано, что изменения REX способствуют пролиферативной способности CD4+ T_{REX}-клеток.

[00039] На фиг. 22 продемонстрировано, что γδ-T_{REX}-клетки можно получить с помощью изменений REX.

[00040] На фиг. 23 продемонстрировано, что γδ-T_{REX}-клетки активны в анализе с применением активаторов Т-клеток (TCE) in vitro.

[00041] На фиг. 24 продемонстрировано, что γδ-T_{REX}-клетки можно получить из множества субпопуляций γδ-Т-клеток, и разнообразие сохраняется после трансдукции CAR.

[00042] На фиг. 25A и 25B продемонстрировано, что γδ-T_{REX}-клетки нацеливаются на BCMA+ опухолевые клетки аналогично немодифицированным CAR-T-клеткам.

[00043] На фиг. 26 продемонстрировано, что изменения REX в NK-клетках обеспечивают поддержание фенотипа NK_{REX}-клеток.

[00044] На фиг. 27 продемонстрировано, что пролиферация и выживаемость NK_{REX}-клеток зависят от цитокинов.

[00045] На фиг. 28 продемонстрировано, что NK_{REX}-клетки сохраняют экспрессию CAR с течением времени.

[00046] На фиг. 29A-29C продемонстрировано, что NK_{REX}-клетки являются цитотоксичными in vitro, и экспрессия CAR может дополнительно повышать эффективность.

[00047] На фиг. 30 продемонстрировано, что T_{REX}-клетки чувствительны к средствам, истощающим Т-клетки, и химиотерапевтическим средствам.

[00048] На фиг. 31 продемонстрировано, что B2MKO T_{REX}-клетки чувствительны к опосредованному NK-клетками истощению, и это можно модулировать с помощью антител к CD38.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[00049] Настоящее изобретение относится к способам, клеткам и композициям для получения популяций клеток и композиций для адоптивной клеточной терапии. В частности, в данном документе предусмотрены способы размножения и пролиферации первичных иммунных клеток, в том числе популяций Т-клеток.

[00050] При применении согласно настоящему изобретению, если не указано иное, все технические и научные термины следует понимать как имеющие то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области. Если согласно контексту не требуется иное, то термины в единственном числе будут включать форму множественного числа, и термины во множественном числе будут включать форму единственного числа.

[00051] Как используется в данном документе, термины "содержать" и "включать" и их варианты (например, "содержит", "содержащий", "включает" и "включающий") следует понимать как обозначающие включение указанного компонента, признака, элемента, или стадии, или группы компонентов, признаков, элементов или стадий, но не исключение любого другого компонента, признака, элемента, или стадии, или группы компонентов, признаков, элементов или стадий. Любой из терминов "содержащий", "состоящий по существу из" и "состоящий из" могут заменяться любым из двух других терминов, сохраняя при этом их обычные значения.

[00052] Применяемые в данном документе формы единственного числа включают формы множественного числа, если в контексте явно не указано иное.

[00053] Процентные значения, раскрытые в данном документе, могут варьироваться в пределах ±10, 20 или 30% от раскрытых значений и остаются в рамках предусмотренного раскрытия.

[00054] Если не указано иное или иное не очевидно из контекста и не понимается специалистом обычной квалификации в данной области техники, то значения в данном документе, которые выражены в виде диапазонов, могут принимать любое конкретное значение или поддиапазон в пределах указанных диапазонов в различных аспектах настоящего изобретения, вплоть до десятых долей единицы нижнего предела диапазона, если контекст явно не предусматривает иное.

[00055] Применяемые в данном документе диапазоны и количества могут быть выражены как "приблизительно" конкретное значение или диапазон. Термин "приблизительно" также включает точное количество. Например, "приблизительно 5%" означает "приблизительно 5%" и также "5%". Термин "приблизительно" также может относиться к ±10% от заданного значения или диапазона значений. Следовательно, приблизительно 5% также означает, например, 4,5%-5,5%. Если иное не очевидно из

контекста, все числовые значения, представленные в данном документе, модифицированы с помощью термина "приблизительно".

[00056] Как используется в данном документе, термины "или" и "и/или" могут описывать несколько компонентов в комбинации или исключая друг друга. Например, "x, y, и/или z" может относиться только к "x", только к "y", только к "z", "x, y и z", "(x и y) или z" "x или (y и z)" или "x, или y, или z". "Устойчивый к репликативному старению" (RRS) относится к первичным иммунным клеткам, которые устойчивы к репликативному старению (RS), которое приводит к ограниченному числу удвоений популяции. В результате описанная в данном документе популяция первичных иммунных клеток преимущественно обладает увеличенной пролиферативной способностью.

[00057] В одном аспекте настоящим изобретением в данном документе предусмотрен способ получения популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS), включающий i) введение одного или нескольких генетических изменений в первичные иммунные клетки и ii) культивирование первичных иммунных клеток в культуральной среде; где культивирование обеспечивает индуцирование пролиферации первичных иммунных клеток с получением популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS).

[00058] В одном аспекте настоящим изобретением в данном документе предусмотрен способ получения популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS), включающий i) введение трансгена, кодирующего сверхбольшой белок В-клеточной лимфомы (Bcl-xL), в первичные иммунные клетки; ii) подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных регуляторных факторов, выбранных из ингибитора циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитора циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B) и S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазы (MTAP), в первичных иммунных клетках; и iii) культивирование первичных иммунных клеток в культуральной среде; где культивирование обеспечивает индуцирование пролиферации первичных иммунных клеток с получением популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS). В некоторых аспектах способ включает подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных генов, связанных с иммунитетом, в первичных иммунных клетках. В определенных аспектах эндогенный ген, связанный с иммунитетом, представляет собой ген бета-2-микроглобулина (B2M) или константного участка α-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC). В некоторых аспектах способ включает подавление экспрессии CD38.

[00059] В одном аспекте настоящим изобретением в данном документе предусмотрен способ получения популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному

старению (RRS), включающий i) подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных регуляторных факторов, выбранных из ингибитора циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитора циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B) и S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазы (MTAP), в первичных иммунных клетках; и ii) культивирование первичных иммунных клеток в культуральной среде; где культивирование обеспечивает индуцирование пролиферации первичных иммунных клеток с получением популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS). В некоторых аспектах способ включает подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных генов, связанных с иммунитетом, в первичных иммунных клетках. В определенных аспектах эндогенный ген, связанный с иммунитетом, представляет собой ген бета-2-микроглобулина (B2M) или константного участка α-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC). В некоторых аспектах способ включает подавление экспрессии CD38.

[00060] Генетическое изменение означает преобразование генетического материала первичной иммунной клетки. Генетическое изменение включает генетический материал, который необходимо добавить, удалить или изменить. В конкретных аспектах генетические изменения включают введение трансгена в первичные иммунные клетки и/или подавление экспрессии гена в первичной иммунной клетке. В конкретных аспектах введение одного или нескольких генетических изменений предусматривает введение в первичные иммунные клетки одного или нескольких трансгенов, кодирующих антиапоптотический фактор или фактор, полученный из вируса.

[00061] Термин "первичная(-ые) иммунная(-ые) клетка(-и)" может относиться к любой(любым) клетке(клеткам), участвующей(участвующим) в первичном иммунном ответе, такой(таким) как Т-клетки, В-клетки и NK-клетки, нейтрофилы и моноциты/макрофаги/дендритные клетки. В некоторых аспектах первичные иммунные клетки могут предусматривать общие Т-клетки, CD4-положительные Т-клетки, CD8-положительные Т-клетки, регуляторные Т-клетки, гамма-дельта-Т-клетки, инвариантные Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой (MAIT), натуральные клетки-киллеры (NK) или натуральные Т-клетки-киллеры (NKT).

[00062] Термин "трансген" относится к любой последовательности нуклеиновой кислоты, которую вводят в клетку посредством экспериментальных манипуляций. Трансген может представлять собой "эндогенную последовательность ДНК" или "гетерологичную последовательность ДНК". Трансген можно выделить и получить в подходящем количестве с помощью одного или нескольких способов, хорошо известных в данной области техники. Эти и другие способы, применимые для выделения трансгена, изложены, например, в Sambrook et al. (см. выше) и в публикации Berger and Kimmel

(Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques, том 152, Academic Press, Inc., Сан-Диего, Калифорния (1987)).

[00063] Трансген можно включить в "трансгенную конструкцию", которая содержит представляющий интерес ген вместе с другими регуляторными последовательностями ДНК, необходимыми для временной, или клеточноспецифической или усиленной экспрессии представляющих интерес трансгенов.

[00064] Трансген может быть введен в клетки с помощью любого подходящего способа или методики, известных из уровня техники. В конкретных аспектах трансген вводят с помощью ДНК-транспозона на основе плазмиды, лентивирусной платформы или сайтспецифической интеграции посредством CRISPR. Экспрессия трансгена в клетке может быть конститутивной или индуцируемой.

[00065] В конкретных аспектах трансген кодирует антиапоптотический фактор. "Антиапоптотический фактор" относится к белку или олигонуклеотиду (который может быть олигонуклеотидом, кодирующим белок, или молчащим нуклеотидом), который оказывает действие путем предупреждения апоптоза клетки, в частности, испытывающей стресс клетки, клетки, получившей сигнал подвергнуться апоптозу или клетки, которая подвергается аномальной клеточной пролиферации. В конкретных аспектах антиапоптотический фактор представляет собой сверхбольшой белок В-клеточной лимфомы (Bcl-xL) или фактор 2 В-клеточной лимфомы (Bcl-2).

[00066] В конкретных аспектах трансген кодирует фактор, полученный из вируса. "Фактор, полученный из вируса" относится как к встречающимся в природе вирусным пептидам, полипептидам или белкам, так и к пептидам, полипептидам или белкам, у которых проявляется определенная степень идентичности последовательности и/или сходства с вирусным белком и/или сохраняется одно или несколько структурных, механистических или антигенных свойств вирусного белка. В конкретных аспектах фактор, полученный из вируса, получен из StpA A11 *Saimiriine gammaherpesvirus 2*, StpC *Herpesvirus saimiri*, Tip *Herpesvirus saimiri* или модифицированного Tio-LMP1 *Herpesvirus ateles*-вируса Эпштейна-Барра.

[00067] В других аспектах трансген кодирует белок, связанный с активирующими сигналами в клетке.

[00068] В некоторых аспектах способы по настоящему изобретению дополнительно включают подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных регуляторных факторов в первичных иммунных клетках, за счет чего активность эндогенного регуляторного фактора устраняется или снижается. Применяемый в данном документе термин "регуляторный фактор" относится к гену, который кодирует белок, участвующий в

регуляции блокировки клеточного цикла, клеточной гибели или подавления сигнала. Эндогенный регуляторный фактор может быть подавлен или блокирован любым подходящим способом или методикой, известными из уровня техники. Известные способы подавления экспрессии генов или снижения активности фактора включают без ограничения CRISPR/Cas (в том числе факторы, вносящие изменения по цитозиновым и адениновым основаниям), микроРНК, shRNA, RNAi, TALEN, нуклеазы с цинковыми пальцами, мегануклеазы, нейтрализующие антитела, низкомолекулярные ингибиторы, химические ингибиторы, блокирующие последующие сигнальные пути, и другие. Подавление эндогенного регуляторного фактора может представлять собой полное подавление, частичное подавление, подавление экспрессии гена или снижение активности фактора. В некоторых аспектах активность эндогенных регуляторных факторов или экспрессия генов снижены на 1%-100% (т. е. на 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100%). Регуляторный фактор включает ген, который кодирует белок, участвующий в регуляции блокировки клеточного цикла, клеточной гибели или подавления сигнала. В конкретных аспектах одним или несколькими эндогенными регуляторными факторами являются ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитор циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B) и/или S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилаза (MTAP). В конкретных аспектах одним или несколькими эндогенными регуляторными факторами являются транскрипционный корепрессор 1 RB (RB1), TP53, регулятор 1 аутофагии и беклина 1 (AMBRA1), фактор нейрофиброматоза 1 типа (NF1), отличный от рецептора фактор тирозин-протеинфосфатазы 2 типа (PTPN2) или супрессор передачи цитокинового сигнала 1 (SOCS1).

[00069] Термин "эндогенный" относится к развивающемуся или возникающему внутри клетки, ткани или организма или части клетки, ткани или организма.

[00070] В некоторых аспектах способы по настоящему изобретению дополнительно включают подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных генов, связанных с иммунитетом, в первичных иммунных клетках, за счет чего активность генов, связанных с иммунитетом, устраняется или снижается. Применяемый в данном документе термин "ген, связанный с иммунитетом", относится к гену, который кодирует белок, участвующий в осуществлении иммунного ответа. В определенных аспектах ген, связанный с иммунитетом, кодирует белок, который участвует в аллогенных иммунных ответах по типу "хозяин против трансплантата" (HvG) и "трансплантат против хозяина" (GvH). Ген, связанный с иммунитетом, может быть подавлен или блокирован любым подходящим способом или методикой, известными из уровня техники. Известные способы подавления

экспрессии генов или снижения активности гена, связанного с иммунитетом, включают без ограничения CRISPR/Cas (в том числе факторы, вносящие изменения по цитозиновым и адениновым основаниям), микроРНК, shRNA, RNAi, TALEN, нуклеазы с цинковыми пальцами, мегануклеазы, нейтрализующие антитела, низкомолекулярные ингибиторы, химические ингибиторы, блокирующие последующие сигнальные пути, и другие. Подавление эндогенного гена, связанного с иммунитетом, может представлять собой полное подавление, частичное подавление, подавление экспрессии гена или снижение активности фактора. В некоторых аспектах активность эндогенного гена, связанного с иммунитетом, или экспрессия гена снижены на 1%-100% (т. е. на 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100%). Термин "ген, связанный с иммунитетом", включает ген, который кодирует белок, участвующий в осуществлении иммунного ответа. Ген, связанный с иммунитетом, может кодировать белок, который участвует в аллогенных иммунных ответах по типу "хозяин против трансплантата" (HvG) и "трансплантат против хозяина" (GvH). В конкретных аспектах один или несколько эндогенных генов, связанных с иммунитетом, представляют собой ген бета-2-микроглобулина (B2M) или константного участка α-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC). В конкретных аспектах один или несколько эндогенных генов, связанных с иммунитетом, представляют собой гены главного комплекса гистосовместимости (MHC), гены человеческого лейкоцитарного антигена I класса (например, HLA-A, HLA-B, HLA-C), гены человеческого лейкоцитарного антигена II класса (HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP), Т-клеточных рецепторов (например, Т-клеточного αβ-рецептора), интерлейкина 1 (IL-1), интерлейкина 2 (IL-2), интерлейкина 4 (IL-4), интерлейкина 6 (IL-6), интерлейкина 10 (IL-10), интерлейкина 23 (IL-23), интерферона-γ (IFNγ), CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL2, CXCL9-11, CCL17, CCL27, фактора запрограммированной смерти-1 (PD-1), TIM3 или TIGIT.

[00071] В дополнительных аспектах раскрытые в данном документе способы включают подавление экспрессии кластера дифференцировки 38 (CD38) в первичных иммунных клетках, за счет чего активность CD38 устраняется или снижается. CD38 может быть подавлен или блокирован любым подходящим способом или методикой, известными из уровня техники. Известные способы подавления экспрессии генов или снижения активности CD38 включают без ограничения CRISPR/Cas (в том числе факторы, вносящие изменения по цитозиновым и адениновым основаниям), микроРНК, shRNA, RNAi, TALEN, нуклеазы с цинковыми пальцами, мегануклеазы, нейтрализующие антитела, низкомолекулярные ингибиторы, химические ингибиторы, блокирующие последующие сигнальные пути, и другие. В некоторых аспектах активность CD38 или экспрессия генов

снижены на 1%-100% (т. е. на 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100%).

[00072] В дополнительных аспектах раскрытые в данном документе способы включают подавление экспрессии гомолога фосфатазы и тензина (PTEN) в первичных иммунных клетках, за счет чего активность PTEN устраняется или снижается. PTEN может быть подавлен или блокирован любым подходящим способом или методикой, известными из уровня техники. Известные способы подавления экспрессии генов или снижения активности PTEN включают без ограничения CRISPR/Cas (в том числе факторы, вносящие изменения по цитозиновым и адениновым основаниям), микроРНК, shRNA, RNAi, TALEN, нуклеазы с цинковыми пальцами, мегануклеазы, нейтрализующие антитела, низкомолекулярные ингибиторы, химические ингибиторы, блокирующие последующие сигнальные пути, и другие. В некоторых аспектах активность PTEN или экспрессия генов снижены на 1%-100% (т. е. на 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100%).

[00073] Термин "T_{REX}" относится к "Т-клетке, способной к возобновляемому размножению", с помощью, например, методик и генетических модификаций, представленных в данном документе. Более конкретно, T_{REX}-клетки относятся к клеткам с пониженной или устраненной экспрессией некоторых или всех из ингибитора циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитора циклинзависимой киназы 2B CDKN2B и S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазы (MTAP).

[00074] В некоторых аспектах подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных регуляторных факторов происходит после введения в клетки одного или нескольких трансгенов. В некоторых аспектах первичные иммунные клетки, в которые был введен один или несколько трансгенов, культивируют в течение по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 16 дней, по меньшей мере 17 дней, по меньшей мере 18 дней, по меньшей мере 19 дней, по меньшей мере 20 дней, прежде чем осуществляют подавление одного или нескольких эндогенных регуляторных факторов. В дополнительных аспектах подавление экспрессии PTEN происходит после введения в клетки одного или нескольких трансгенов. В некоторых аспектах способ включает следующие последовательные стадии: I) введение одного или нескольких трансгенов в иммунные клетки, а затем культивирование клеток в течение по меньшей мере 2 дней, 5 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 16 дней, по меньшей мере 17 дней, по

меньшей мере 18 дней, по меньшей мере 19 дней, по меньшей мере 20 дней; ii) подавление одного или нескольких эндогенных регуляторных факторов, культивирование клетки в течение по меньшей мере 2 дней, 5 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 16 дней, по меньшей мере 17 дней, по меньшей мере 18 дней, по меньшей мере 19 дней, по меньшей мере 20 дней и iii) подавление экспрессии PTEN.

[00075] Первичные иммунные клетки культивируют в условиях, подходящих для стимулирования пролиферации и размножения. Размножение *in vitro* с применением стадии культивирования обеспечивает активацию и индуцирует пролиферацию первичных иммунных клеток с получением размноженной популяции, содержащей первичные иммунные клетки, достаточные в отношении количеств для применения в терапии.

[00076] Раскрытые в данном документе способы осуществляют *ex vivo*, что означает, что данные способы имеют место вне организма. Обработка иммунных клеток *ex vivo* означает воздействие на клетки определенными биологическими молекулами *in vitro*, предпочтительно в стерильных условиях. В некоторых случаях способы *ex vivo* дополнительно включают культивирование иммунных клеток, которые были выделены от человека перед введением обратно тому же или иному субъекту-человеку.

[00077] Первичные иммунные клетки, в том числе размноженные популяции и/или сконструированные Т-клетки по настоящему изобретению, могут включать общие Т-клетки, CD4-положительные Т-клетки, CD8-положительные Т-клетки, регуляторные Т-клетки, гамма-дельта-Т-клетки, инвариантные Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой (MAIT), натуральные клетки-киллеры (NK) или натуральные Т-клетки-киллеры (NKT). Т-клетки в широком смысле разделяются на клетки, экспрессирующие CD4 на своей поверхности (также называемые CD4-положительными клетками), и клетки, экспрессирующие CD8 на своей поверхности (также называемые CD8-положительными клетками). Т-клетки, подходящие для применения в соответствии с представленными в данном документе способами, представляют собой мононуклеарные лимфоциты, полученные из костного мозга (BM), периферической крови (PB) или пуповинной крови (CB) донора-человека. Данные клетки можно собирать непосредственно из BM, PB или CB или после мобилизации или стимуляции посредством введения факторов роста и/или цитокинов, таких как гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) или гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) в случае аллогенных или аутологичных доноров. Специалисты в данной области техники признают, что существует много установленных протоколов для выделения из периферической крови

мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Выделение PBMC можно облегчить с помощью протоколов разделения в градиенте плотности обычно с применением методики центрифугирования в градиенте плотности с помощью Ficoll®-Hypaque или Histopaque® для отделения лимфоцитов от других элементов крови. Предпочтительно выделение PBMC выполняют в стерильных условиях. Выделение PBMC также может предусматривать использование наборов для отрицательного отбора. Альтернативно можно применять способы элютриации клеток для разделения популяций мононуклеарных клеток. В некоторых аспектах первичные иммунные клетки являются человеческими.

[00078] В некоторых случаях способы по настоящему изобретению дополнительно включают введение генетически сконструированного или химерного антигенного рецептора в активированные Т-клетки, где в результате реализации данного способа получают размноженную популяцию, содержащую Т-клетки, экспрессирующие генетически сконструированный или химерный антигенный рецептор. Химерные антигенные рецепторы (CAR), также известные как химерные Т-клеточные рецепторы, искусственные Т-клеточные рецепторы и химерные иммунорецепторы, являются сконструированными рецепторами, которые придают специфичность в отношении иммунной эффекторной клетки. В целом, химерный антигенный рецептор представляет собой трансмембранный белок, содержащий связывающийся с целевым антигеном домен, который слит посредством спейсера и трансмембранного домена с сигнальным эндодоменом. При связывании CAR со своим целевым антигеном в Т-клетку передается активирующий сигнал. В одном варианте осуществления полинуклеотид, который кодирует химерный антигенный рецептор, вводят в первичные клетки. В одном варианте осуществления вектор нуклеиновой кислоты, кодирующий химерный антигенный рецептор или генетически сконструированный рецептор, вводят в Т-клетки, в результате чего Т-клетки экспрессируют химерный антигенный рецептор. В некоторых аспектах CAR связывает глипикан 3 (GPC3), рецептор 2 эпидермального фактора роста человека ((HER2), также известный как рецепторная тирозинкиназа 2 ERB-B2 (ERBB2)), антиген созревания В-клеток (BCMA). В определенных аспектах CAR может связывать любую мишень для применения в иммунотерапии.

[00079] *Схема конструкции с CAR.* Конструкции с CAR по настоящему изобретению могут иметь несколько компонентов, многие из которых могут быть отобраны на основе требуемой или уточненной функции конструкции с CAR, получаемой в результате. В дополнение к антигенсвязывающему домену конструкции с CAR могут иметь спейсерный домен, шарнирный домен, домен сигнального пептида, трансмембранный домен и один или

несколько костимулирующих доменов. Отбор одного компонента по сравнению с другим (т. е. отбор конкретного костимулирующего домена из одного рецептора по сравнению с костимулирующим доменом из другого рецептора) может влиять на клиническую эффективность и профили безопасности.

[00080] *Антигенсвязывающий домен.* Предусмотренные в данном документе антигенсвязывающие домены могут включать антитела или один или несколько их антигенсвязывающих фрагментов. В одном варианте осуществления конструкция с CAR нацеливается на GPC3. В одном варианте осуществления конструкция с CAR нацеливается на BCMA. В одном варианте осуществления конструкция с CAR нацеливается на HER2. В одном варианте осуществления конструкция с CAR нацеливается на любую молекулу, применимую в иммунотерапии. В определенных аспектах антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий вариабельные области легкой и тяжелой цепей из одного или нескольких антител, специфических в отношении GPC3, BCMA или HER2, которые либо непосредственно связаны друг с другом, либо связаны друг с другом посредством гибкого линкера (например, повтора G4S, имеющего 1, 2, 3 и больше повторов).

[00081] *Спейсерный домен.* Конструкция с CAR может содержать спейсерный домен для обеспечения конформационной свободы для облегчения связывания с целевым антигеном на клетке-мишени. Оптимальная длина спейсерного домена может зависеть от близости связывающего эпитопа к поверхности клетки-мишени. Например, для ближних эпитопов могут потребоваться более длинные спейсеры, а для дальних эпитопов могут потребоваться более короткие. Помимо стимулирования связывания CAR с целевым антигеном, достижение оптимального расстояния между клеткой с CAR и раковой клеткой может также помочь стерически окклюзировать более крупные ингибирующие молекулы из иммунологического синапса, образованного между клеткой с CAR и раковой клеткой-мишенью. CAR может иметь длинный спейсер, промежуточный спейсер или более короткий спейсер. Длинные спейсеры могут включать домен CH2CH3 (приблизительно 220 аминокислот) иммуноглобулина G1 (IgG1) или IgG4 (либо нативного, либо с модификациями, обычными для терапевтических антител, такими как мутация S228P), тогда как область CH3 может применяться сама по себе для конструирования промежуточного спейсера (приблизительно 120 аминокислот). Более короткие спейсеры могут быть получены из сегментов (менее 60 аминокислот) CD28, CD8α, CD3 или CD4. Короткие спейсеры также могут быть получены из шарнирных областей молекул IgG. Эти шарнирные области могут быть получены из любого изотипа IgG и могут содержать или не

содержать мутации, обычные для терапевтических антител, такие как упомянутая выше мутация S228P.

[00082] *Шарнирный домен*. CAR также может иметь шарнирный домен. Гибкий шарнирный домен представляет собой короткий пептидный фрагмент, который обеспечивает конформационную свободу для облегчения связывания с целевым антигеном на опухолевой клетке. Его можно применять отдельно или в сочетании со спейсерной последовательностью. Термины "шарнир" и "спейсер" часто применяются взаимозаменяемо, например, последовательности IgG4 можно считать как "шарнирными", так и "спейсерными" последовательностями (т. е. шарнирными/спейсерными последовательностями).

[00083] *Сигнальный пептид*. Конструкция с CAR может дополнительно включать последовательность, содержащую сигнальный пептид. Сигнальные пептиды побуждают клетку перемещать CAR к клеточной мембране. Примеры включают сигнальный полипептид тяжелой цепи IgG1, сигнальные пептиды легкой цепи Ig каппа или лямбда, сигнальный пептид рецептора 2 гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSFR2 или CSFR2), сигнальный полипептид CD8a или сигнальный пептид CD33.

[00084] *Трансдермальный домен*. Конструкция с CAR может дополнительно включать последовательность, содержащую трансмембранный домен. Трансмембранный домен может включать гидрофобную α-спираль, которая охватывает клеточную мембрану. Свойства трансмембранного домена не были изучены столь тщательно, как другие аспекты конструкций с CAR, однако они потенциально могут влиять на экспрессию CAR и связывание с эндогенными мембранными белками. Трансмембранные домены могут быть получены, например, из CD4, CD8α или CD28.

[00085] *Костимулирующий домен*. Конструкция с CAR может дополнительно включать одну или несколько последовательностей, которые образуют костимулирующий домен. Костимулирующий домен представляет собой домен, способный усиливать или модулировать ответную реакцию иммунных эффекторных клеток. Костимулирующие домены могут включать последовательности, например, из одного или нескольких CD3-дзета (или CD3z), CD28, 4-1BB, OX-40, ICOS, CD27, GITR, CD2, IL-2Rβ и MyD88/CD40. Выбор костимулирующего домена влияет на фенотип и метаболическую сигнатуру клеток с CAR. Например, костимуляция CD28 дает высокоактивный, но недолговечный эффектороподобный фенотип с высокими уровнями цитолитической способности, секреции интерлейкина-2 (IL-2) и гликолиза. Напротив, Т-клетки, модифицированные с помощью CAR, несущих костимуляторные домены 4-1BB, имеют тенденцию к увеличению

количества и сохранению in vivo дольше, имеют повышенный окислительный метаболизм, менее склонны к истощению и имеют повышенную способность создавать Т-клетки центральной памяти.

[00086] В конкретных аспектах раскрытые в данном документе способы обеспечивают ослабление ранней стимуляции первичных иммунных клеток для обеспечения того, чтобы клетки оставались в цикле до введения одного или нескольких генетических изменений в клетки. В других аспектах раскрытые в данном документе способы обеспечивают ослабление поздней стимуляции первичных иммунных клеток (также называемую "повторной стимуляцией"). После выхода первичных иммунных клеток из клеточного цикла клетки повторно стимулируют, вызывая повторное вхождение клеток в клеточный цикл (т. е. пролиферацию).

[00087] В конкретных аспектах раскрытые в данном документе способы дополнительно включают стимуляцию первичных иммунных клеток до введения одного или нескольких генетических изменений в первичные иммунные клетки. В конкретных аспектах первичные иммунные клетки стимулируют по меньшей мере за 1 день, по меньшей мере за 2 дня, по меньшей мере за 5 дней, по меньшей мере за 10 дней, по меньшей мере за 15 дней, по меньшей мере за 20 дней или по меньшей мере за 30 дней до введения одного или нескольких генетических изменений в первичную иммунную клетку. Таким образом, в конкретных аспектах в данном документе предусмотрен способ получения популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS), включающий i) стимуляцию первичных иммунных клеток; ii) введение одного или нескольких генетических изменений в первичные иммунные клетки; и iii) культивирование первичных иммунных клеток в культуральной среде; где культивирование обеспечивает индуцирование пролиферации первичных иммунных клеток с получением популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS).

[00088] В конкретных аспектах раскрытые в данном документе способы дополнительно включают стимуляцию первичных иммунных клеток после введения одного или нескольких генетических изменений в первичные иммунные клетки. В конкретных аспектах первичные иммунные клетки стимулируют по меньшей мере через 1 день, по меньшей мере через 2 дня, по меньшей мере через 5 дней, по меньшей мере через 10 дней, по меньшей мере через 15 дней, по меньшей мере через 20 дней или по меньшей мере через 30 дней после введения одного или нескольких генетических изменений в первичную иммунную клетку. Таким образом, в конкретных аспектах в данном документе предусмотрен способ получения популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS), включающий i) введение одного или нескольких

генетических изменений в первичные иммунные клетки; ii) культивирование первичных иммунных клеток в культуральной среде; iii) стимуляцию первичных иммунных клеток и iv) культивирование первичных иммунных клеток в культуральной среде; где культивирование обеспечивает индуцирование пролиферации первичных иммунных клеток с получением популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS). В дополнительных аспектах первичные иммунные клетки повторно стимулируют по меньшей мере один раз, по меньшей мере два раза, по меньшей мере три раза, по меньшей мере четыре раза или по меньшей мере пять раз. Таким образом, в конкретных аспектах в данном документе предусмотрен способ получения популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS), включающий i) введение одного или нескольких генетических изменений в первичные иммунные клетки; ii) культивирование первичных иммунных клеток в культуральной среде; iii) стимуляцию первичных иммунных клеток; iv) культивирование первичных иммунных клеток в культуральной среде; v) повторную стимуляцию первичных иммунных клеток и vi) культивирование первичных иммунных клеток в культуральной среде; где культивирование обеспечивает индуцирование пролиферации первичных иммунных клеток с получением популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS). Для стимуляции иммунных клеток можно применять любой подходящий стимул, известный из уровня техники.

[00089] В конкретных аспектах первичные иммунные клетки подвергаются по меньшей мере приблизительно 50-кратному размножению, по меньшей мере приблизительно 500-кратному размножению, по меньшей мере приблизительно 5000-кратному размножению, по меньшей мере приблизительно 250000-кратному размножению, по меньшей мере приблизительно 500000-кратному размножению, по меньшей мере приблизительно 10^6-кратному размножению, по меньшей мере приблизительно 10^7-кратному размножению, по меньшей мере приблизительно 10^8-кратному размножению, по меньшей мере приблизительно 10^9-кратному размножению или по меньшей мере приблизительно 10^{10}-кратному размножению во время культивирования. В конкретных аспектах популяция размноженных первичных иммунных клеток устойчива к репликативному старению. Более того, данные клетки не являются функционально истощенными после долгосрочного размножения и могут быть направлены на выполнение цитотоксической функции посредством взаимодействия их TCR с антителом-активатором Т-клеток или посредством взаимодействия химерного антигенного рецептора (CAR) (или посредством природных или генетически введенных TCR).

[00090] В конкретных аспектах первичные иммунные клетки культивируют в культуральной среде, которая содержит поддерживающий(-ие) цитокин(-ы), но не содержит стимул для первичных иммунных клеток. В конкретных аспектах первичные иммунные клетки подвергаются размножению во время культивирования в отсутствие питающих клеток или стимуляции посредством CD3 и/или их антигенного рецептора. Возможность с помощью раскрытых способов получать иммунные клетки при отсутствии обширной повторной стимуляции Т-клеток или фидерных клеток преимущественно устраняет проблемы масштабирования способов и получения дисфункциональных популяций иммунных клеток.

[00091] Раскрытые в данном документе способы преимущественно позволяют получить популяции размноженных первичных иммунных клеток, в том числе человеческих $CD8^+$ Т-клеток, человеческих $CD4^+$ Т-клеток, человеческих регуляторных Т-клеток, человеческих гамма-дельта-Т-клеток или человеческих натуральных Т-клеток-киллеров, которые обладают способностью пролиферировать в течение значительных периодов времени при отсутствии повторной стимуляции посредством их Т-клеточных рецепторов (TCR), размножаясь в миллионы раз в долгосрочной культуре. В конкретных аспектах популяцию первичных иммунных клеток культивируют в течение по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 40 дней, по меньшей мере 50 дней, по меньшей мере 60 дней, по меньшей мере 70 дней, по меньшей мере 80 дней, по меньшей мере 90 дней, по меньшей мере 100 дней, по меньшей мере 150 дней, по меньшей мере 200 дней, по меньшей мере 300 дней или по меньшей мере 400 дней.

[00092] В дополнительных аспектах в данном документе предусмотрена сконструированная Т-клетка, экспрессирующая трансген, кодирующий сверхбольшой белок В-клеточной лимфомы (Bcl-xL), которая не экспрессирует ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитор циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B) и/или S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазу (MTAP).

[00093] В дополнительных аспектах в данном документе предусмотрена сконструированная Т-клетка, которая не экспрессирует ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитор циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B) и/или S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазу (MTAP).

[00094] В дополнительных аспекта в данном документе предусмотрена сконструированная Т-клетка, экспрессирующая трансген, кодирующий сверхбольшой белок В-клеточной лимфомы (Bcl-XL), которая не экспрессирует ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитор циклинзависимой киназы 2B

(CDKN2B), S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазу (MTAP) и/или гомолог фосфатазы и тензина (PTEN).

[00095] В определенных аспектах сконструированная Т-клетка, раскрытая в данном документе, не экспрессирует один или несколько эндогенных генов, связанных с иммунитетом, в первичных иммунных клетках. В некоторых аспектах эндогенный ген, связанный с иммунитетом, представляет собой ген бета-2-микроглобулина (B2M) или константного участка α-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC).

[00096] В определенных аспектах сконструированная Т-клетка, раскрытая в данном документе, не экспрессирует кластер дифференцировки 38 (CD38).

[00097] В дополнительных аспектах настоящим изобретением предусмотрена сконструированная Т-клетка, которая не экспрессирует ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитор циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B), S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазу (MTAP), бета-2 микроглобулин (B2M), константный участок α-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC), кластер дифференцировки 38 (CD38) и/или гомолог фосфатазы и тензина (PTEN).

[00098] В определенных аспектах раскрытая сконструированная Т-клетка содержит полинуклеотид, который кодирует химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых аспектах CAR связывает глипикан 3 (GPC3), антиген созревания В-клеток (BCMA) или рецептор 2 эпидермального фактора роста человека ((HER2), также известный как рецепторная тирозинкиназа 2 ERB-B2 (ERBB2)).

[00099] В определенных аспектах сконструированная Т-клетка, раскрытая в данном документе, представляет собой CD8+ Т-клетку, CD4+ Т-клетку, гамма-дельта-Т-клетку, инвариантную Т-клетку, ассоциированную со слизистой оболочкой (MAIT), натуральную клетку-киллера (NK), натуральную Т-клетку-киллера (NKT) или их комбинацию.

[000100] В некоторых аспектах сконструированная Т-клетка устойчива к репликативному старению (RRS). В некоторых аспектах сконструированная Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку. В некоторых аспектах сконструированная Т-клетка представляет собой $CD4^+$ Т-клетку. В некоторых аспектах сконструированная Т-клетка является человеческой.

[000101] Раскрытые в данном документе размноженные популяции Т-клеток применимы для средств клеточной иммунотерапии, в том числе без ограничения Т-клеточной терапии, адоптивной клеточной терапии (ACT) и CAR-Т-клеточной терапии.

[000102] Раскрытые в данном документе размноженные популяции из популяций Т-клеток применимы для лечения или предупреждения различных нарушений, таких как рак (например, злокачественное новообразование крови, такое как лимфома или лейкоз, или

солидные опухоли, такие как меланома или рак почки), аутоиммунные заболевания или инфекционное заболевание, такое как HIV.

[000103] Применяемые в данном документе термины "лечение" или "лечить" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам. В число нуждающихся в лечении входят субъекты, у которых имеется рак, а также субъекты, предрасположенные к раку, или субъекты, у которых рак необходимо предупредить. В некоторых аспектах раскрытые в данном документе способы, композиции и комбинации можно применять для лечения рака. В других аспектах в число нуждающихся в лечении входят субъекты, у которых имеется опухоль, а также субъекты с предрасположенностью к развитию опухоли, или субъекты, у которых необходимо предупредить развитие опухоли. В определенных аспектах раскрытые в данном документе способы, композиции и комбинации можно применять для лечения опухолей. В других аспектах лечение опухоли предусматривает подавление роста опухоли, стимулирование уменьшения опухоли или как подавление роста опухоли, так и стимулирование уменьшения опухоли.

[000104] В некоторых случаях Т-клетки, полученные в соответствии с предусмотренным в данном документе способом, можно вводить в виде фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество Т-клеток в качестве терапевтического средства (т. е. для путей терапевтического применения).

[000105] Применяемые в данном документе термины "фармацевтическая композиция" или "терапевтическая композиция" относятся к соединению или композиции, способным вызывать необходимый терапевтический эффект при правильном введении пациенту. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество по меньшей мере одной иммунной клетки по настоящему изобретению.

[000106] Применяемые в данном документе термины "фармацевтически приемлемый носитель" или "физиологически приемлемый носитель" относятся к одному или нескольким материалам состава, подходящим для осуществления или усиления доставки одной или нескольких иммунных клеток по настоящему изобретению.

[000107] Термин "субъект" подразумевается как включающий человека и животных, отличных от человека, в частности, млекопитающих. В определенных аспектах субъект представляет собой пациента-человека.

[000108] Применяемые в данном документе термины "введение" или "осуществление введения" относятся к предоставлению, приведению в контакт и/или доставке соединения

или соединений любым подходящим путем для достижения требуемого эффекта. Введение может предусматривать без ограничения пероральное, сублингвальное, парентеральное (например, внутривенную, подкожную, внутрикожную, внутримышечную, внутрисуставную, внутриартериальную, интрасиновиальную, интрастернальную, интратекальную, внутриочаговую или внутричерепную инъекцию), трансдермальное, местное, трансбуккальное, ректальное, вагинальное, назальное, офтальмическое, посредством ингаляции и имплантатов.

[000109] Без ограничения настоящего изобретения ряд аспектов настоящего изобретения описан в данном документе с целью иллюстрации.

ПРИМЕРЫ

[000110] Следующие примеры являются иллюстративными для конкретных аспектов настоящего изобретения и различных путей их применения. Они изложены исключительно в пояснительных целях и не должны истолковываться как каким-либо образом ограничивающие объем настоящего изобретения.

Пример 1. Сверхэкспрессия антиапоптотических или полученных из вируса факторов может обеспечивать селективное преимущество в отношении выживаемости трансфицированным Т-клеткам в долгосрочной культуре

[000111] Частоту встречаемости транспозонов оценивали в субпопуляциях Т-клеток в течение периода, составлявшего 66-137 дней, с помощью проточной цитометрии. Общие первичные человеческие Т-клетки выделяли из крови здоровых доноров, активировали в течение 72 часов с помощью Dynabeads (с человеческим Т-активатором CD3/CD28), а затем трансфицировали плазмидами, содержащими транспозоны, кодирующие антиапоптотические факторы, факторы, полученные из вируса, мутантные цитокиновые рецепторы, мутантные сигнальные молекулы и/или мутантные молекулы, регулирующие клеточный цикл, наряду с флуоресцентным репортером. Одновременно в клетки трансфицировали мРНК, кодирующую транспозазу, для обеспечения встраивания в хромосому мобильных элементов. Всего при различных скринингах протестировали 52 конструкции с транспозонами. Через четыре-8 дней после трансфекции клетки оценивали с помощью проточной цитометрии на предмет включения транспозонов на исходном уровне. Клетки периодически повторно стимулировали с помощью Dynabeads для стимуляции их пролиферации и оценивали обогащение транспозонами с помощью проточной цитометрии. Ожидается, что молекулы, которые повышают выживаемость размножающихся Т-клеток, будут обогащаться сверх их начальной частоты в общем пуле Т-клеток, как продемонстрировано на $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клетках

(фиг. 1, фиг. 2). Согласно данным скринингам было видно, что антиапоптотический фактор, представляющий собой сверхкрупный белок В-клеточной лимфомы (Bcl-xL), последовательно обогащался как у $CD4^+$, так и у $CD8^+$ Т-клеток, которые были простимулированы несколькими раундами пролиферации в течение периода длительного культивирования *in vitro*, что позволяет предположить, что данный фактор может способствовать увеличению выживаемости зрелых Т-клеток, которые его сверхэкспрессируют (фиг. 1). Для других факторов, таких как Bcl-2 и белки, полученные из вируса, StpA A11 (*Saimiriine gammaherpesvirus 2*), StpC и Tip (*Herpesvirus saimiri*), а также модифицированный Tio-LMP1 (*Herpesvirus Ateles*, вирус Эпштейна-Барра), также наблюдали обогащение субпопуляций Т-клеток (фиг. 1).

[000112] Несмотря на то, что у клеток, экспрессирующих трансгены, кодирующие эндогенные антиапоптотические факторы (Bcl-2 и Bcl-xL) или факторы, полученные из вируса (StpA A11, StpC и Tip, а также модифицированный Tio-LMP1), наблюдали повышенную способность выживать в долгосрочной культуре при повторной стимуляции посредством их TCR по сравнению с нетрансфицированными контрольными клетками в тех же лунках, данные клетки не характеризовались большим стойким повышением параметров своей пролиферативной способности. Эти данные позволяют предположить, что для придания требуемого фенотипа T_{REX}-клетке могут потребоваться дополнительные изменения.

Пример 2. Устранение экспрессии CDKN2A, CDKN2B и MTAP существенно увеличивает пролиферативную способность первичных человеческих Т-клеток в долгосрочной культуре

[000113] Полученные от пациентов линии лейкозных клеток уже много лет используются в лабораториях для проведения ряда клеточных анализов. Трансформированную природу данных клеток можно сопоставить с коллекцией мутаций, которые также зачастую встречаются у пациентов с Т-клеточным острым лимфобластным лейкозом (T-ALL) (таблица 1). Мутации у пациентов с T-ALL можно разбить на несколько крупных классов, каждый из которых предположительно вносит вклад в фенотип и способствует получению клеток T-ALL: усиление активирующих сигналов, потеря супрессоров сигналов, потеря регуляторов блокировки клеточного цикла, а также модификация плейотропных факторов, таких как транскрипционные факторы, эпигенетические регуляторы и другие клеточные механизмы.

Таблица 1. Потенциальные мутационные мишени T-ALL для разработки TREX-клеток			
Биологическая функция	**Путь или мишень**	**Примеры**	**Общая стратегия для TREX-клеток**
АКТИВИРУЮЩИЙ сигнал	NOTCH	NOTCH1*, FBXW7	ИЗБЕГАТЬ генетических изменений; значительные, широкомасштабные эффекты передачи сигналов.
	PI3K/mTOR/AKT	AKT*, PI3KCA*, mTOR*	ИЗМЕНИТЬ и, если это эффективно, экспрессировать индуцируемым образом для ограничения независимости от цитокинов.
	Передача цитокинового сигнала/Jak/STAT	JAK1*, JAK3*, IL7RA*, STAT5B*	
	Ras/MAPK	KRAS*, NRAS*, NF1	
	Общий	MYC*	
СУПРЕССОР сигнала	PI3K/mTOR/AKT	PTEN	ИЗМЕНИТЬ для ограничения супрессии сигнала.
	Другое	PTPN2	
БЛОКИРОВКА клеточного цикла	CDKN2A/2B	CDKN2A/2B	ИЗМЕНИТЬ для ограничения блокировки клеточного цикла.
	RB	RB1	
Плейотропная	Транслокации	BCL11B, ETV6, GATA3, HOX11*, HOX11L2*, HOXA*	ИЗБЕГАТЬ генетических изменений в связи с разнообразным спектром

		LEF1, LMO2*, MYB*, MYC* NKX2.1/NKX 2.2*, NUP214-ABL1/ усиление ABL1 *, RUNX1, TAL1*, TLX1*, WT1	биологических эффектов.
	Эпигенетические модификаторы	DNMT3A, EED, EZH2, KDM6A/UTX, PHF6, SUZ12	
	Другое	DNM2, CNOT3, RPL5, RPL10, RPL22	

* указывает на усиление функции, например, за счет мутации белка, транслокаций или мутации промоторных/энхансерных областей, что может быть в случае такого белка, как TERT. Отсутствие звездочки указывает на потерю функции (делецию, мутации с потерей функции, вставки-делеции, укорочения и т. д.).

[000114] Как указано выше, была выдвинута гипотеза, что помимо обеспечения фактора выживаемости, такого как Bcl-XL, может быть необходимо модифицировать экспрессию в Т-клетках набора вышеупомянутых генов с целью воссоздания требуемого фенотипа (таблица 1). Поэтому из крови здоровых доноров выделяли общие $CD8^+$ Т-клетки, активировали с помощью Dynabeads с αCD3/αCD28, а через 72 часа в сборный пул очищенных $CD8^+$ Т-клеток встраивали с помощью вставки трансген, кодирующий Bcl-XL. Затем данные клетки размножали в течение периода, составляющего 17 дней, перед повторной активацией с использованием Dynabeads с αCD3/αCD28 и последующим

устранением экспрессии факторов, идентифицированных в линиях лейкозных Т-клеток и у пациентов с T-ALL. Повышенная пролиферативная способность является одной из основных характеристик, которые должны были быть сконструированы в T_{REX}-клетках, поэтому на данных клетках тестировали эффекты устранения экспрессии молекул из ячейки "БЛОКИРОВКА клеточного цикла": ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A) и CDKN2B (фиг. 3A). S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилаза (MTAP) соседствует на хромосоме с CDKN2A и CDKN2B, а также часто утрачивается у пациентов с делециями CDKN2A и CDKN2B. Соответственно, протестировали эффекты устранения экспрессии MTAP в сочетании с CDKN2A и CDKN2B (фиг. 3A). Данные клетки с Bcl-XL и измененными CDKN2A/ CDKN2B/ MTAP далее называются "T_{REX}+Bcl-xL"-клетками (таблица 2), а изменения CDKN2A/ CDKN2B/ MTAP (без Bcl-XL) называются "T_{REX}"-клетками.

Таблица 2. Терминология в отношении изменений и популяций

Термин	**Конкретные изменения**	**Донор**
T_{REX} +Bcl-xL-клетки	Изменения CDKN2A/CDKN2B/MTAP + вставка трансгена Bcl-xL	40A30 ("донор A") и 40B30 ("донор B")
T_{REX}-клетки с дефицитом по PTEN	Изменения CDKN2A/CDKN2B/MTAP + вставка трансгена Bcl-xL + устранение экспрессии PTEN	40B32 ("донор B-2")

[000115] Клетки с изменением по Bcl-xL, с Bcl-xL и изменениями по CDKN2A/CDKN2B, а также T_{REX}+Bcl-xL-клетки поддерживали в культуре в течение около 100 дней без дополнительной стимуляции посредством их TCR и оценивали общую кратность размножения каждой популяции (фиг. 3A). Пролиферация T_{REX}+Bcl-xL-клеток отличалась от других групп примерно через 31 день после внесения данных изменений, и размножение T_{REX}+Bcl-xL-клеток поддерживалось при отсутствии дополнительной стимуляции TCR, достигая более чем 400000-кратного размножения в течение этого периода. В отличие от этого, $CD8^+$ Т-клетки с изменением по Bcl-xL и с изменениями по Bcl-xL/CDKN2A/CDKN2B за это время достигали 73-286-кратно более низких уровней размножения (фиг. 3A, таблица 3). Более того, даже при неоднократной повторной стимуляции клеток без изменений или с изменением по Bcl-xL посредством их TCR с использованием Dynabeads с αCD3/αCD28 для стимулирования пролиферации они достигали лишь низких уровней общей кратности размножения (фиг. 1A, таблица 3), что значительно ниже, чем у T_{REX}+Bcl-xL-клеток.

Таблица 3. Пролиферация $CD8^+$ Т-клеток		
Популяция	**Общая кратность размножения (день 59)**	**Общая кратность размножения (день 93)**
Bcl-XL-клетки	554	5677
Bcl-XL + CDKN2A/CDKN2B CRISPR-клетки	926	1459
Bcl-XL + CDKN2A/CDKN2B/MTAP CRISPR (T_{REX}+Bcl-xL)-клетки	8306	417948
Bcl-XL-клетки (повторная стимуляция Dynabeads)	121	N/A
Нетрансфицированные клетки (повторная стимуляция Dynabeads)	689	N/A

[000116] Хотя T_{REX}+Bcl-xL-клетки демонстрировали существенно повышенную пролиферативную способность по сравнению с контрольными $CD8^+$ Т-клетками от того же донора, были проведены дополнительные эксперименты для тестирования, могут ли данные изменения придать аналогичный фенотип у других доноров и возможно ли дополнительное усиление T_{REX}+Bcl-xL-фенотипа путем устранения экспрессии супрессоров сигналов, которые часто мутированы у пациентов с T-ALL (таблица 1). В локусе гомолога фосфатазы и тензина (PTEN) наблюдаются частые мутации с утратой функции в линиях лейкозных клеток, полученных от пациентов, и у пациентов с T-ALL, и о которых известно, что они отрицательно регулирует прогрессирование клеточного цикла (таблица 1). T_{REX}+Bcl-xL-клетки получали так, как указано выше, от двух разных доноров (40A30 и 40B30), и примерно через 2 недели после "триплексного" изменения в одной из данных линий T_{REX}+Bcl-xL (40B32) устранялась экспрессия PTEN (фиг. 3B). Оба набора T_{REX}-клеток, полученных от здоровых доноров (без CDKN2A/CDKN2B/MTAP), характеризовались значительной пролиферативной способностью при отсутствии дополнительной стимуляции TCR, достигая общей кратности размножения >3,7e8 и >1,8e7 к дню 118 в культуре. Более того, в соответствии с установленной ролью в отрицательной регуляции прогрессирования клеточного цикла посредством контроля передачи сигналов AKT, устранение экспрессии PTEN в T_{REX}+Bcl-xL-клетках дополнительно усиливает пролиферативную способность T_{REX}+Bcl-xL-клеток от донора B-2, позволяя этим клеткам достичь общей кратности размножения >2,0e8 к дню 118 в культуре (фиг. 3B). Аддитивные

эффекты устранения экспрессии PTEN проявлялись через 49 дней, что отражает низкую начальную эффективность изменения или позднее конкурентное преимущество данного изменения после того, как клетки размножились в >3е6 раз.

[000117] Хотя T_{REX}+Bcl-xL-клетки с интактной экспрессией PTEN существенно размножились при отсутствии дополнительной стимуляции TCR, их пролиферация в конечном итоге замедлялась по сравнению с T_{REX}+Bcl-xL-клетками с дефицитом по экспрессии PTEN (фиг. 3B). Более того, даже T_{REX}+Bcl-xL-клетки с дефицитом по PTEN в конечном итоге продемонстрировали снижение показателей скорости пролиферации (фиг. 3B). Для определения, может ли повторная стимуляция T_{REX}+Bcl-xL-клеток в присутствии или при отсутствии совместной стимуляции служить жизнеспособной альтернативой или дополнительным подходом для устранения экспрессии PTEN, было протестировано, могут ли Dynabeads с αCD3 или с αCD3/αCD28 дать толчок для возврата клеток в клеточный цикл (фиг. 4). T_{REX}+Bcl-xL-клетки или T_{REX}+Bcl-xL-клетки с дефицитом по PTEN оставляли без обработки или повторно стимулировали с помощью Dynabeads, как указано выше, удаляли гранулы и отслеживали общую кратность размножения каждой популяции (фиг. 4). Повторная стимуляция существенно усиливала способность T_{REX}+Bcl-xL-линий и T_{REX}+Bcl-xL-линий с дефицитом по PTEN к размножению.

Пример 3. T_{REX}+Bcl-xL-клетки напоминают первичные человеческие Т-клетки в отношении зависимости от цитокинов и фенотипа клеток

[000118] Первичные Т-клетки зависят от цитокинов, таких как IL-2, для выживаемости и пролиферации *in vitro* и *in vivo*, однако некоторые линии лейкозных клеток растут независимо от IL-2. T_{REX}+Bcl-xL-клетки и T_{REX}+Bcl-xL-клетки с дефицитом по PTEN получали в среде, содержащей IL-2. Исследовали, напоминают ли данные клетки нормальные первичные человеческие Т-клетки в отношении зависимости от цитокинов, путем отслеживания пролиферации и выживаемости клеток в диапазоне концентраций IL-2 в течение периода, составляющего 6 дней, в культуре (фиг. 5). Как и нормальные Т-клетки, T_{REX}+Bcl-xL-клетки и T_{REX}+Bcl-xL-клетки с дефицитом по PTEN сильно зависели от IL-2 как для пролиферации, так и для выживаемости.

[000119] Также тестировали, сохраняют ли T_{REX}+Bcl-xL-клетки и T_{REX}+Bcl-xL-клетки с дефицитом по PTEN фенотипы, сходные с нормальными Т-клетками, после модификации и продолжительного культивирования *in vitro*, или же эти условия приводят к тому, что T_{REX}+Bcl-xL-клетки истощают свой фенотип (фиг. 6). Все три T_{REX}+Bcl-xL-линии сохраняли экспрессию CD3 и CD8 на поверхности клеток (фиг. 6A и 6B). Более того, они экспрессировали различные уровни маркеров активации, таких как PD1 и TIGIT (фиг. 6C),

и сохраняли экспрессию CD28 донорзависимым образом (фиг. 6D). Наконец, у данных T_{REX}+Bcl-xL-линий наблюдали фенотипы дифференцировки, определяемые поверхностной экспрессией CD45RO и CCR7, которые отслеживались донорзависимым образом (фиг. 6E). Эти данные позволяют предположить, что, несмотря на значительную пролиферацию и увеличенную продолжительность культивирования *in vitro*, T_{REX}+Bcl-xL-клетки напоминают нормальные Т-клетки и не проявляют фенотип поверхности, ассоциированный с дисфункциональным состоянием.

[000120] Хемокиновые рецепторы важны для миграции иммунных клеток к местам воспаления. Поэтому T_{REX}+Bcl-xL-клетки, T_{REX}+Bcl-xL-клетки с дефицитом по PTEN, повторно простимулированные T_{REX}+Bcl-xL-клетки и повторно простимулированные T_{REX}+Bcl-xL-клетки с дефицитом по PTEN были проанализированы в отношении экспрессии хемокиновых рецепторов CCR2, CCR5, CCR6, CCR7, CXCR3 и CXCR5 с помощью проточной цитометрии (фиг. 6F-K). У T_{REX}+Bcl-xL-линий и T_{REX}+Bcl-xL-линий с дефицитом по PTEN наблюдали экспрессию CCR2 (фиг. 6F), CCR5 (фиг. 6G) и CXCR3 (фиг. 6J). Экспрессия CCR6 (фиг. 6H) была гетерогенной, тогда как экспрессия CCR7 (фиг. 6I) и CXCR5 (фиг. 6K) была низкой или отсутствовала. Следовательно, T_{REX}+Bcl-xL-клетки и T_{REX}+Bcl-xL-клетки с дефицитом по PTEN сохраняют экспрессию основных хемокиновых рецепторов, что сделает возможным их миграцию к местам воспаления.

Пример 4. T_{REX}+Bcl-xL-клетки являются цитотоксическими

[000121] Установив, что T_{REX}+Bcl-xL-линии напоминают нормальные первичные человеческие Т-клетки, определяли, сохраняют ли T_{REX}+Bcl-xL-клетки мощную цитотоксическую функцию после долгосрочного культивирования и размножения. Активатор Т-клеток использовали в присутствии опухолевых клеток-мишеней и импедансной платформы xCELLigence для количественной оценки цитотоксической функции T_{REX}+Bcl-xL-клеток (фиг. 7). T_{REX}+Bcl-xL-линии в день 80 демонстрировали сравнимую способность лизировать опухолевые клетки-мишени в присутствии активатора Т-клеток, как и немодифицированные первичные общие Т-клетки, а также немодифицированные первичные $CD8^+$ Т-клетки (фиг. 7A и 7B). Надосадочные жидкости данных совместных культур собирали через 72 часа после добавления эффекторных клеток и активного активатора Т-клеток или контрольной молекулы-активатора Т-клеток и анализировали на наличие интерферона γ (IFN-γ), IL-2, фактора некроза опухоли α (TNF-α) и гранзима B (фиг. 7C-7F). T_{REX}+Bcl-xL-линии продуцировали более низкие уровни данных цитокинов по сравнению с немодифицированными первичными Т-клетками, несмотря на аналогичную способность лизировать клетки-мишени антигензависимым образом. Эти данные свидетельствуют, что даже после 80 дней в культуре и значительного размножения

T_{REX}+Bcl-xL-клетки функционально не истощаются и сохраняют свой цитотоксический потенциал.

Пример 5. T_{REX}+Bcl-xL-клетки могут давать функциональные CAR-T_{REX}-клетки

[000122] С целью разработки T_{REX}+Bcl-xL-клеток в потенциальное средство клеточной терапии данные клетки должны быть способны экспрессировать нацеливающую молекулу, такую как химерный антигенный рецептор (CAR), для запуска их цитотоксической функции. Три линии T_{REX}+Bcl-xL-клеток, полученные так, как описано выше, трансдуцировали лентивирусом, кодирующим CAR, который распознает глипикан 3 (GPC3). Поверхностную экспрессию CAR к GPC3 затем измеряли с помощью проточной цитометрии (фиг. 8A). Было обнаружено, что каждая T_{REX}+Bcl-xL-линия успешно экспрессирует CAR к GPC3 на уровнях, аналогичных таковым у нормальных первичных общих Т-клеток и нормальных первичных $CD8^+$ Т-клеток (фиг. 8A).

[000123] CAR-направленную цитотоксическую функцию T_{REX}+Bcl-xL-клеток оценивали путем проведения импедансного анализа xCELLigence с применением опухолевых клеток-мишеней с различными степенями экспрессии антигена: OE21 (отрицательные по антигену), HuH-7 (промежуточный уровень по антигену) и Hep3B (высокий уровень по антигену) (фиг. 8B и 8C). T_{REX}+Bcl-xL-клетки быстро лизировали опухолевые клетки-мишени CAR-специфичным и антигенспецифичным образом на уровнях, аналогичных таковым у нормальных CAR-Т-клеток и нормальных CAR-$CD8^+$ Т-клеток (фиг. 8B и 8C). Собирали надосадочные жидкости из этих совместных культур через 72 часа после добавления Т-клеток, а затем анализировали в отношении секреции IFN-γ, IL-2, TNF-α и гранзима B (фиг. 8D-8G). В соответствии с их мощной цитотоксической функцией, CAR-T_{REX}+Bcl-xL-клетки демонстрировали сравнимую способность секретировать эффекторные цитокины, как и у нормальных CAR-Т-клеток и нормальных CAR-$CD8^+$ Т-клеток (фиг. 8D-8G). Однако в целом уровни IFN-γ и TNF-α оказались ниже у CAR-T_{REX}+Bcl-xL-клеток.

[000124] Эти данные подтверждают, что T_{REX}+Bcl-xL-клетки и T_{REX}+Bcl-xL-клетки с дефицитом по PTEN способны экспрессировать CAR и выполнять CAR-направленную цитотоксическую функцию антигензависимым образом даже после значительного размножения *in vitro*.

Пример 6. T_{REX}-клетки мигрируют в те же локации, что и первичные $CD8^+$ Т-клетки, и способны отвечать на IL-2 *in vivo*

[000125] Цитокиновые сигналы можно использовать для модуляции активности и размножения человеческих и мышиных Т-клеток (*Zhang et al., Science Translational Medicine, 22 дек 2021 года, том 13, выпуск 625; Aspuria et al., Science Translational Medicine,*

22 дек 2021 года, том 13, выпуск 625), поэтому T_{REX}-клетки оценивали на предмет их способности отвечать на различные человеческие цитокины *in vivo*. Вкратце, первичные человеческие $CD8^+$ Т-клетки или 278-дневные T_{REX}-клетки метили люциферазным репортером и клетки, экспрессирующие люциферазу 3E6, вводили мышам NSG с добавлением или без добавления рекомбинантного слитого белка человеческого IL-2. Мышей визуализировали с помощью системы оптической визуализации IVIS для обнаружения экспрессирующих люциферазу Т-клеток (фиг. 9A и 9B). Как показано на фиг. 9A, визуализация через 216 часов показала схожую локализацию первичных человеческих CD8+ Т-клеток и T_{REX}-клеток у мышей. Кроме того, у мышей, получавших добавку рекомбинантного слитого белка человеческого IL-2, наблюдали усиленную пролиферацию T_{REX}-клеток (фиг. 9A, справа). Интенсивность излучения в брюшной полости наносили на график в зависимости от времени (фиг. 9B), и она аналогичным образом демонстрирует способность T_{REX}-клеток отвечать на экзогенно добавленный IL-2 *in vivo*. Мышей умерщвляли через 10 дней после переноса адоптивных клеток и их кровь, селезенку и костный мозг оценивали на наличие первичных CD8+ Т-клеток или T_{REX}-клеток (фиг. 9C). Хотя T_{REX}-клетки были обнаружены в тех же органах, что и первичные CD8+ Т-клетки (фиг. 9C), у них наблюдали более медленную кинетику распада, а введение рекомбинантного слитого белка человеческого IL-2 могло дополнительно увеличивать количества T_{REX}-клеток в крови и костном мозге подвергавшихся обработке мышей. Эти данные позволяют предположить, что T_{REX}-клетки возвращаются в те же участки, что и первичные CD8+ Т-клетки, и сохраняют способность к ответу к экзогенным цитокиновым сигналам.

Пример 7. CAR-T_{REX}-клетки отвечают на IL-2 и IL-15 *in vivo*

[000126] Нацеливающиеся на GPC3 CAR-T_{REX}+Bcl-xL-клетки оценивали на предмет их способности отвечать на различные человеческие цитокины *in vivo*. NSG, hIL-2 NOG или hIL-15 NOG мышам инокулировали опухолевые клетки Hep3B, экспрессирующие GPC3. После образования опухолей мышей оставляли без обработки или обрабатывали посредством 10E6 нацеливающихся на GPC3 CAR-T_{REX}+Bcl-xL-клеток. На момент инфузии CAR-T_{REX}+Bcl-xL-клетки имели возраст 121 день. Мышей умерщвляли через 8 дней после инфузии CAR-T_{REX}+Bcl-xL-клеток и измеряли значения веса тела (фиг. 10A), при этом не наблюдалось заметных различий, что указывало на отсутствие токсичности. Собирали опухоли, кровь и селезенку и анализировали их на наличие CAR-T_{REX}+Bcl-xL-клеток (фиг. 10B). Количества CAR-T_{REX}+Bcl-xL-клеток возрастали у несущих опухоль hIL-2 NOG и hIL-15 NOG мышей, что указывало на то, что CAR-T_{REX}+Bcl-xL-клетки способны отвечать на экзогенные цитокиновые сигналы *in vivo*. Профили размножения

были специфичны для конкретного предоставляемого уровня цитокиновой поддержки (фиг. 10B).

Пример 8. CAR-T_{REX}-клетки нацеливаются на солидные опухоли *in vivo*

[000127] Определяли способность нацеливающихся на GPC3 CAR-T_{REX}-клеток контролировать солидные опухоли. Выращивали опухоли Hep3B у мышей NSG и затем мышам вводили инфузией очищенные CAR-T_{REX}-клетки возрастом 92 дня (фиг. 11A). Вводили инфузией 10E6 CAR-T_{REX}-клеток или 2E6 CAR-T-клеток и затем измеряли объемы опухоли и строили графики в зависимости от времени (фиг. 11B, слева). CAR-TREX-клетки демонстрировали подавление роста опухоли и контроль опухолей Hep3B. Через 18 дней после переноса CAR-TREX-клеток мышей умерщвляли и собирали опухоли, кровь и селезенку для дополнительного анализа (фиг. 11B, 11C и 11D). Исследовали фенотипы внутриопухолевых CAR-T_{REX}-клеток (фиг. 11B) и определяли количества CAR-T_{REX}-клеток в данных различных тканях (фиг. 11C). CAR-T_{REX}-клетки были обнаружены в наибольших количествах в опухолях мышей, и у данных клеток наблюдали активированный фенотип, при котором они активно секретировали эффекторные цитокины и подвергались дегрануляции (фиг. 11D). У T_{REX}-клеток дополнительно наблюдали повышенную способность к пролиферации *in vitro*, и их можно размножать в миллионы раз и поддерживать в культуре более 100 дней без дополнительной стимуляции посредством их TCR (фиг. 12). Более того, если вышеупомянутые целевые гены были подвергнуты одновременным изменениям в $CD8^+$ Т-клетках здорового донора с помощью CRISPR/Cas9, то данные изменения воспроизводимо придавали REX-фенотип у различных доноров (фиг. 12).

[000128] Пример 9. Дополнительные генетические изменения для клинического профиля Хотя изменения REX и обеспечивают усиленную пролиферацию продукта T_{REX}-клеток, проводили дополнительное изменение локусов B2M и CD38 для задержки отторжения продукта T_{REX}-клеток иммунной системой пациента. B2M представляет собой белок, состоящий из 119 аминокислот, который у людей кодируется геном на 15-й хромосоме. Он также является компонентом молекул главного класса гистосовместимости (MHC) I, а также ассоциируется с неклассическими, MHC I-подобными молекулами, такими как CD1, MR1, неонатальный Fc-рецептор и Qa-1. Хотя он расположен за пределами локуса MHC, B2M необходим для успешной экспрессии классических и неклассических молекул MHC I на поверхности ядросодержащих клеток. Путем исключения экспрессии B2M в T_{REX}-клетках с помощью CRISPR/Cas9 клетки будут защищены от CD8+ Т-клеток пациента. Кроме того, устранение экспрессии B2M и, следовательно, экспрессии MHC-I продуктом T_{REX}-клеток сделает их восприимчивыми к отторжению NK-клетками пациента.

Нокаут B2M осуществляли одновременно с нокином нацеливающего на CAR фактора (например, GPC3, HER2, BCMA) в продукте T_{REX}-клеток.

[000129] NK-клетки экспрессируют высокие уровни CD38 и истощаются у определенных пациентов с раком, например, у пациентов с множественной миеломой, получающих моноклональные антитела к CD38, такие как даратумумаб и изатуксимаб. С целью увеличения продолжительности существования данной аллогенной популяции клеток у пациентов CD38 подвергали нокауту в T_{REX}-клетках с помощью CRISPR/Cas9 и совместно с T_{REX}-клетками можно вводить даратумумаб или изатуксимаб (см. фиг. 30 и 31).

[000130] Ожидается, что как и аллогенная популяция $CD8^+$ Т-клеток, T_{REX}-клетки будут способны нацеливаться на здоровые клетки пациента с несоответствием по HLA посредством своих TCR, что приводит к GvHD. С целью предупреждения развития данной патологии популяцию T_{REX}-клеток подвергали изменению по локусу константного участка альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC), который кодирует α-цепь TCR. Изменение TRAC с помощью CRISPR/Cas9 приводит к утрате экспрессии α-цепи TCR, что, в свою очередь, предупреждает поверхностную экспрессию TCR T_{REX}-клетками.

Таблица 4. Краткое описание изменений в клетке

Ген	**Тип изменения**	**Назначение**
CDKN2A	Делеция посредством CRISPR/Cas9	Устойчивость к репликативному старению
CDKN2B	Делеция посредством CRISPR/Cas9	Устойчивость к репликативному старению
MTAP~~3~~	Делеция посредством CRISPR/Cas9	Устойчивость к репликативному старению
B2M	Делеция посредством CRISPR/Cas9	Ограничить HvG
TRAC	Делеция посредством CRISPR/Cas9	Избежать GvHD
CD38	Делеция посредством CRISPR/Cas9	Устойчивость к даратумумабу

Пример 10. Терапия с применением аллогенных T_{REX}-клеток к BCMA

[000131] Нацеливающийся на BCMA CAR экспрессировали в T_{REX}-клетках (т. е. клетках без CDKN2A/CDKN2B/MTAP) (фиг. 13A). Геном T_{REX}-клеток к BCMA подвергали дополнительному изменению для устранения экспрессии человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) I класса и αβ Т-клеточного рецептора (TCR) путем инактивации генов B2M и TRAC соответственно для минимизации развития аллогенных ответов "хозяин против

трансплантата" (HvG) и "трансплантат против хозяина" (GvH) соответственно. Кроме того, инактивировали ген CD38 в T_{REX}-клетках к BCMA с помощью CRISPR/Cas9 для придания клеткам устойчивости к истощающим моноклональным антителам к CD38. Инактивация данных трех генов увеличивает общий потенциал размножения *in vitro* $CD8^+$ Т-клеток периферической крови, так чтобы количества последующих популяций клеток намного превышали количества, достигаемые с не подвергнутыми изменениям $CD8^+$ Т-клетками периферической крови. Клетки сохраняют отличительные пролиферативные характеристики первичных Т-клеток (зависимость как от стимуляции антителами к CD3 до инактивации TRAC, так и от IL-2 для размножения/выживаемости), но с большим потенциалом для размножения. T_{REX}-клетки к BCMA сохраняют цитотоксическую функцию, но демонстрируют пониженное высвобождение цитокинов по сравнению с традиционными препаратами на основе CAR-Т-клеток, состоящими из смешанных популяций $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток.

[000132] Результаты оценки T_{REX}-клеток к BCMA указывают, что данные клетки, вероятно, обеспечивают контроль экспрессирующих BCMA опухолей аналогично первичным CAR-Т-клеткам к BCMA, при этом характеризуясь потенциально улучшенным профилем безопасности в виде уменьшения высвобождения цитокинов и потенциального снижения риска развития CRS (фиг. 13B). Вкратце, T_{REX}-клетки к BCMA и CAR-Т-клетки к BCMA культивировали с экспрессирующими BCMA опухолевыми клетками. Лизис опухолевых клеток измеряли при различных соотношениях эффекторные клетки:клетки-мишени в разные моменты времени после начала совместного культивирования (фиг. 13B, верхний ряд). Собирали надосадочные жидкости через 72 часа после начала совместного культивирования и с помощью MSD определяли уровни IFN-γ, TNF-α и IL-2 (фиг. 13B, нижний ряд).

[000133] T_{REX}-клетки к BCMA (82 дня в культуре) или CAR-Т-клетки к BCMA культивировали с экспрессирующими BCMA опухолевыми клетками. Собирали надосадочные жидкости через 72 часа после начала совместного культивирования и оценивали уровни IFN-γ с использованием наборов для MSD (фиг. 14, слева). Из данных видно 90% снижение уровней IFN-γ в совместных культурах с T_{REX}-клетками к BCMA (83 дня в культуре), нежели в совместных культурах с CAR-Т-клетками к BCMA, несмотря на схожий контроль опухолевых клеток. Из этих данных видно, что CAR-T_{REX}-клетки характеризуются профилем секреции цитокинов, который может обеспечивать меньший риск развития CRS, чем CAR-Т-клетки.

[000134] T_{REX}-клетки к (112 дней в культуре) оценивали на предмет их способности сохраняться в анализе серийного уничтожения клеток с поддержкой IL-2 или без нее.

Вкратце, T_{REX}-клетки к BCMA или CAR-T-клетки к BCMA подвергали серийному культивированию с экспрессирующими BCMA клетками JJN3 при соотношении эффекторные клетки:клетки-мишени 1:1. Контроль опухолевых клеток (% цитолиза), количество эффекторных клеток и секрецию эффекторных цитокинов измеряли после каждого раунда совместного культивирования и отображали на графике (фиг. 15). T_{REX}-клетки к BCMA выдерживали сравнимое количество раундов в данном анализе серийного уничтожения клеток, как и CAR-T-клетки к BCMA, а включение IL-2 в среду для культивирования клеток дополнительно увеличивало число раундов, в которых T_{REX}-клетки к BCMA и CAR-T-клетки к BCMA могли контролировать рост опухолевых клеток. T_{REX}-клетки к BCMA и CAR-T-клетки к BCMA демонстрировали усиленную пролиферацию в ответ на IL-2, а секреция эффекторных цитокинов поддерживалась в течение более длительного периода времени в совместных культурах, в которых IL-2 был включен в культуральную среду (фиг. 15, верхний ряд в сравнении с нижним рядом). Эти данные указывают, что T_{REX}-клетки к BCMA демонстрируют схожую цитотоксичность с CAR-T-клетками к BCMA *in vitro* и также характеризуются схожей способностью отвечать на экзогенный IL-2. Кроме того, T_{REX}-клетки к BCMA секретировали более низкие уровни эффекторных цитокинов после взаимодействия с CAR, чем CAR-T-клетки к BCMA, несмотря на сопоставимый контроль опухолей.

Пример 11. Терапия с применением аллогенных T_{REX}-клеток к HER2

[000135] CAR, нацеливающиеся на HER2, экспрессировали в T_{REX}-клетках или первичных Т-клетках (фиг. 20A) с получением CAR-T_{REX}-клеток и CAR-T-клеток. T_{REX}-клетки к HER2 и CAR-T-клетки к HER2 оценивали на предмет их способности нацеливаться на сверхэкспрессирующие HER2 клетки OE21 при различных соотношениях эффекторные клетки:клетки-мишени (фиг. 20B, слева). T_{REX}-клетки к HER демонстрировали сравнимый или улучшенный контроль экспрессирующих HER2 опухолевых клеток по сравнению с CAR-T-клетками к HER2, полученными от трех разных доноров первичных Т-клеток. Собирали надосадочные жидкости через 72 часа после начала совместного культивирования, а затем исследовали их на наличие эффекторных цитокинов (фиг. 20B, справа). Как наблюдалось ранее, несмотря на сопоставимый или улучшенный контроль опухолевых клеток, T_{REX}-клетки к HER2 секретировали более низкие уровни цитокинов (IFN-γ, TNF-α и IL-2), чем CAR-T-клетки к HER2, что позволяет предположить, что CAR-T_{REX}-клетки могут обладать меньшей склонностью вызывать CRS у пациентов. Кроме того, как показано выше для T_{REX}-клеток к BCMA, снижение секреции IFN-γ также наблюдали в надосадочных жидкостях, взятых из совместных культур экспрессирующих HER2 опухолевых клеток и T_{REX}-клеток к HER2, по сравнению с надосадочными жидкостями из

совместных культур с CAR-T-клетками к HER2 (фиг. 14, справа). Из этих данных также видно, что CAR-T_{REX}-клетки характеризуются профилем секреции цитокинов, который может обеспечивать меньший риск развития CRS, чем CAR-T-клетки.

Пример 12. Фенотип T_{REX}-клеток можно получать с помощью различных комбинаций изменений

[000136] Требования к сверхэкспрессии Bcl-xL и различных целевых генов REX для придания REX-фенотипа оценивали на выделенных $CD8^+$ Т-клетках от двух доноров (обозначенных как G и H). Вкратце, CD8+ Т-клетки подвергали отрицательному отбору, а затем активировали с помощью Dynabeads с αCD3/αCD28 в течение 3 дней. Bcl-xL вводили в некоторые клетки, тогда как другие клетки культивировали и подвергали нокауту различные комбинации целевых генов REX с помощью CRISPR/Cas9 (фиг. 16). Отслеживали размножение клеток и строили графики в зависимости от времени. (CDKN2A и CDKN2A' отражают нацеливание на одну или несколько изоформ). Было обнаружено, что Bcl-xL является несущественным для REX-фенотипа, тогда как три целевых гена REX обеспечивали получение согласованного фенотипа у всех доноров (фиг. 16, справа).

Пример 13. T_{REX}-клетки изменены в целевых локусах

[000137] T_{REX}-клетки и γδ-T_{REX}-клетки изучали на предмет устранения экспрессии целевых генов REX с помощью анализа методом вестерн-блоттинга (фиг. 17, левая и центральная панели). Как и ожидалось, у данных клеток наблюдалась утрата экспрессии MTAP, CDKN2A (p14), CDKN2A (p16) и CDKN2B (p15). И наоборот, экспрессия данных генов сохранялась в соответствующих по донору контрольных клетках без изменений. Кроме того, данные секвенирования по методу Сэнгера указывают на высокую распространенность вставок-делеций в данных трех локусах в измененных TREX-клетках (фиг. 17, справа).

Пример 14. T_{REX}-клетки демонстрируют обогащение профилей экспрессии генов, ассоциированных с клеточным циклом

[000138] T_{REX}-клетки, сверхэкспрессирующие Bcl-xL, и соответствующие по донору контрольные $CD8^+$ Т-клетки без изменений культивировали в течение некоторого времени. Проводили анализ RNAseq на клеточных осадках, полученных в различные моменты времени, и оценивали профили экспрессии генов в Bcl-xL-T_{REX}-клетках и контрольных клетках; как и ожидалось, у TREX-клеток наблюдалось обогащение профилей экспрессии генов, ассоциированных с клеточным циклом, таких как целевые гены E2F и целевые гены контрольных точек G2M (фиг. 18A). У Bcl-xL-T_{REX}-клеток также наблюдали более высокие уровни экспрессии целевых генов MYC (фиг. 18B), что согласуется с наблюдаемыми скоростями пролиферации данных клеток. Кроме того, у Bcl-xL-T_{REX}-клеток наблюдали

модуляцию экспрессии множества генов, ассоциированных с клеточным циклом (фиг. 22C). Эти данные подтверждают, что REX-фенотип ассоциирован с прогрессированием клеточного цикла и повышенной пролиферацией.

Пример 15. Выживаемость и пролиферация T_{REX}-клеток зависят от IL-2

[000139] T_{REX}-клетки культивировали с различными количествами IL-2 в течение периода, составляющего 12-14 дней. Отслеживали размножение клеток и строили графики в зависимости от данного периода времени (фиг. 19). Как показано выше для Bcl-xL-T_{REX}-клеток (см., например, фиг. 5), T_{REX}-клетки сильно зависят от уровня IL-2 в отношении пролиферации и выживаемости *in vitro*. T_{REX}-клетки характеризовались дозозависимой пролиферацией в ответ на IL-2; при отсутствии IL-2 у T_{REX}-клеток наблюдалось быстрое снижение выживаемости, при этом за первые 4 дня количество T_{REX}-клеток уменьшалось на более чем 60%.

Пример 17. Изменения REX способствуют пролиферативной способности CD4+ T_{REX}-клеток

[000140] Изменения REX воспроизводимо придают усиленную устойчивость к репликативному старению у $CD8^+$ Т-клеток. Определяли способность устранения экспрессии целевых генов REX (CDKN2A, CDKN2B и MTAP) для повышения устойчивости CD4+ Т-клеток к репликативному старению. $CD4^+$ Т-клетки выделяли от трех здоровых доноров, стимулировали с помощью Dynabeads с αCD3/αCD28, а затем подвергали изменению в данных локусах. Пролиферацию $CD4^+$ T_{REX}-клеток и соответствующих по донору $CD4^+$ Т-клеток без вносимых изменений в качестве контролей отслеживали с течением времени и отображали на графике (фиг. 21). Как было ранее продемонстрировано на $CD8^+$ Т-клетках, нацеливание на гены REX в $CD4^+$ Т-клетках обеспечивало воспроизводимое способствование пролиферативной способности данных клеток и делало их устойчивыми к репликативному старению.

Пример 18. γδ-T_{REX}-клетки можно получить с помощью изменений REX

[000141] Еще одной цитотоксической субпопуляцией Т-клеток являются γδ-Т-клетки. Способность изменений в REX придавать γδ-Т-клеткам фенотип T_{REX}-клеток изучали с использованием γδ-Т-клеток от восьми разных доноров (фиг. 22). Выделяли γδ-Т-клетки и стимулировали их Dynabeads с αCD3/αCD28 или антителом с αCD3, а затем подвергали изменению локусы REX с помощью CRISPR/Cas9. Отслеживали пролиферацию γδ-Т-клеток и γδ-T_{REX}-клеток и отображали ее на графике в зависимости от времени. Изменения REX обеспечивали воспроизводимое повышение устойчивости γδ-Т-клеток к репликативному старению и приводили к получению фенотипа γδ-T_{REX}-клеток.

[000142] Установив, что у линий γδ-T_{REX}-клеток наблюдается повышенная устойчивость к репликативному старению, определяли, сохраняют ли γδ-T_{REX}-клетки мощную цитотоксическую функцию после долгосрочного культивирования и размножения. Активатор Т-клеток использовали в присутствии опухолевых клеток-мишеней и импедансной платформы xCELLigence для количественной оценки цитотоксической функции γδ-T_{REX}-клеток (фиг. 23). Линии γδ-T_{REX}-клеток в день 79 и день 88 демонстрировали сравнимую способность лизировать опухолевые клетки-мишени в присутствии активатора Т-клеток, как и немодифицированные первичные $CD8^+$ Т-клетки (фиг. 23 сверху). Надосадочные жидкости данных совместных культур собирали через 72 часа после добавления эффекторных клеток и активного активатора Т-клеток или контрольной молекулы-активатора Т-клеток и анализировали на наличие IFN-γ, IL-2 и TNF-α (фиг. 23, внизу). Линии γδ-T_{REX}-клеток продуцировали более низкие уровни данных цитокинов, чем немодифицированные первичные $CD8^+$ Т-клетки, несмотря на аналогичную способность лизировать клетки-мишени антигензависимым образом. Эти данные свидетельствуют, что даже через 79 дней в культуре и значительного размножения γδ-T_{REX}-клетки функционально не истощаются и сохраняют свой цитотоксический потенциал.

[000143] Обычно γδ-Т-клетки состоят из нескольких субпопуляций, в том числе Vδ1, Vδ2, Vδ3 и Vδ5, помимо прочих (Lawand *et al., Front. Immunol., 30 июня 2017 года*). У людей Vδ1 и Vδ2 составляют большую часть γδ-Т-клеток, при этом клетки Vδ2 встречаются преимущественно в крови, и клетки Vδ1 встречаются в тканях.

[000144] γδ-T_{REX}-клетки, γδ-CAR-T_{REX}-клетки и соответствующие по донору γδ-Т-клетки без изменений окрашивали и анализировали в отношении экспрессии Vδ1 и Vδ2 (фиг. 24). Анализ FACS показал, что γδ-T_{REX}-клетки состояли из нескольких субпопуляций γδ-Т-клеток (Vδ1, Vδ2 и $Vδ1^-Vδ2^-$), что указывает на то, что изменения REX могут повысить устойчивость к репликативному старению для нескольких субпопуляций γδ-Т-клеток. Кроме того, разнообразие субпопуляций γδ-Т-клеток сохранялось в γδ-CAR-T_{REX}-клетках (фиг. 28, внизу).

[000145] Затем γδ-T_{REX}-клетки изучали на предмет их способности принимать инструкции от нацеливающейся на опухоль функциональной единицы, такой как CAR, нацеливающегося на BCMA (фиг. 25). γδ-T_{REX}-клетки трансдуцировали для экспрессии CAR, нацеливающегося на BCMA (фиг. 25A), и данные клетки совместно культивировали с экспрессирующими BCMA опухолевыми клетками в различных соотношениях эффекторные клетки:клетки-мишени. Лизис опухолевых клеток отслеживали с течением времени с помощью платформы xCELLigence (фиг. 25B) и собирали надосадочные жидкости через 72 часа после начала совместного культивирования. У γδ-T_{REX}-клеток

наблюдали схожую способность контролировать экспрессирующие BCMA опухолевые клетки, что и у первичных CAR-T-клеток, используемых в качестве контроля, однако они обычно секретировали более низкие уровни эффекторных цитокинов, в том числе IFN-γ, TNF-α и IL-2 (фиг. 25B, внизу). Эти данные указывают, что γδ-CAR-T_{REX}-клетки способны принимать указание от нацеливающегося на опухоль CAR, а также могут с меньшей вероятностью вызывать CRS, чем первичные CAR-T-клетки.

Пример 19. Изменения REX в NK-клетках поддерживают фенотип NK_{REX}-клеток

[000146] Изменения REX повышают устойчивость T-клеток к репликативному старению, однако было неясно, будут ли они поддерживать фенотип NK_{REX}-клеток. Поэтому выделяли NK-клетки от трех разных доноров и культивировали в среде, содержащей IL-2 или комбинацию IL-2 и IL-15. Затем NK-клетки подвергали изменению в локусах REX с помощью CRISPR/Cas9 и отслеживали с течением времени пролиферацию NK_{REX}-клеток и соответствующих по донору NK-клеток без изменений (фиг. 26). У всех доноров и условий применения цитокинов изменения REX были способны воспроизводимо повышать устойчивость NK_{REX}-клеток к репликативному старению (фиг. 26). NK_{REX}-клетки можно культивировать в течение более 90 дней, при этом они размножались в $>10^6 - >10^{10}$ раз, в то время как NK-клетки без изменений не могли размножаться и погибали за 80 дней.

[000147] Учитывая увеличение устойчивости к репликативному старению, было важно определить, сохраняют ли NK_{REX}-клетки свою зависимость от поддержки цитокинами. NK_{REX}-клетки получали в среде, содержащей IL-2 или комбинацию IL-2 и IL-15. Зависимость NK_{REX}-клеток от данных цитокинов определяли в эксперименте, в котором цитокины извлекали из среды для роста и отслеживали количества NK_{REX}-клеток в течение периода, составляющего 37 дней. NK_{REX}-клетки не смогли пролиферироваться после извлечения цитокинов, и у данных клеток наблюдали быстрое снижение жизнеспособности клеток и диаметра жизнеспособных клеток, усиление их зависимости от поддержки цитокинами, несмотря на изменение генов REX (фиг. 27).

[000148] NK_{REX}-клетки трансдуцировали для экспрессии CAR, нацеливающихся на BCMA, с целью определения, были ли данные клетки способны стабильно экспрессировать нацеливающийся на опухоль CAR (фиг. 28). Экспрессия CAR поддерживалась в CAR-NK_{REX}-клетках с течением времени, и уровни экспрессии (средняя интенсивность флуоресценции, MFI) оставались схожими с таковыми у очищенных CAR-T-клеток. Эти данные указывают, что CAR-NK_{REX}-клетки могут стабильно экспрессировать CAR и что уровни экспрессии сопоставимы с таковыми у стандартных CAR-T-клеток.

[000149] Хотя NK_{REX}-клетки можно было размножать в культуре в течение длительных периодов времени, оставалось неясным следующее: 1) сохранялся ли их

цитотоксический потенциал после долговременной пролиферации; и 2) смогут ли они принимать указание от нацеливающегося на опухоль CAR. Поэтому получали CAR-NK_{REX}-клетки из двух различных NK_{REX}-линий (фиг. 29A). Одну из данных CAR-NK_{REX}-линий очищали на основании экспрессии CAR с получением >95% CAR^+ CAR-NK_{REX}-линии (фиг. 29A, внизу справа). NK_{REX}-линии и CAR-NK_{REX}-линии от доноров 50-1 и 47-1 тестировали на предмет их способности лизировать экспрессирующие BCMA опухолевые клетки в анализе xCELLigence (фиг. 29B). Даже спустя 78 и 86 дней в культуре NK_{REX}-клетки и CAR-NK_{REX}-клетки оставались сильно цитотоксичными. Данные линии быстро лизировали экспрессирующие BCMA клетки-мишени, быстрее достигая более высокого уровня контроля, чем CAR-T_{REX}-клетки (фиг. 29B). Тогда как NK_{REX}-клетки были способны лизировать опухолевые клетки независимо от экспрессии CAR, вероятно, по причине взаимодействия с активирующими рецепторами на NK_{REX}-клетках и CAR-NK_{REX}-клетках, при более низких соотношениях эффекторные клетки:клетки-мишени, вклад CAR-управляемой цитотоксичности мог наблюдаться у обоих доноров 50-1 и 47-1. Собирали надосадочные жидкости через 48 часов совместного культивирования и определяли уровни IFN-γ, IL-2 и TNF-α с помощью MSD (фиг. 29C). NK_{REX}-клетки секретировали более низкие уровни данных цитокинов, чем CAR-NK_{REX}-клетки, при этом CAR-T_{REX}-клетки секретировали самые высокие уровни данных факторов (фиг. 29C). Эти данные указывают, что CAR-NK_{REX}-клетки способны стабильно экспрессировать и принимать указание от нацеливающегося на опухоль CAR. Кроме того, данные клетки быстро лизируют опухолевые клетки и накапливают более низкие уровни IFN-γ, IL-2 и TNF-α в надосадочных жидкостях совместных культур.

Пример 20. T_{REX}-клетки чувствительны к истощающим Т-клетки средствам и химиотерапевтическим средствам

[000150] T^{REX}-клетки были модифицированы для повышения их устойчивости к репликативному старению. Однако у данных клеток проявлялись отличительные признаки нормальных Т-клеток. Для лучшего понимания способности контроля T_{REX}-клеток определяли их восприимчивость к стандартным истощающим Т-клетки средствам и химиотерапевтическим средствам по сравнению с общими Т-клетками без вносимых изменений, которые были активированы для входа в клеточный цикл (фиг. 30). Недавно активированные общие Т-клетки без изменений или T_{REX}-клетки инкубировали с 10 мкг/мл антитела к CD52 и 10% человеческого комплемента (фиг. 30, вверху слева) или 10% кроличьего комплемента (фиг. 30, внизу слева). Спустя 3 часа выживаемость клеток оценивали с помощью анализа Cell Titer Glo. Недавно активированные общие Т-клетки без изменений или T_{REX}-клетки также инкубировали с указанными количествами мелфалана

(фиг. 30, вверху справа) или хлорамбуцила (фиг. 30, внизу справа) и через 2 дня измеряли выживаемость клеток с помощью анализа Cell Titer Glo. Во всех случаях у T_{REX}-клеток наблюдали сопоставимую восприимчивость к данным средствам, как и у недавно активированных общих Т-клеток без вносимых изменений.

Пример 21. $B2M^{KO}$ T_{REX}-клетки чувствительны к опосредованному NK-клетками истощению, и это можно модулировать с помощью антител к CD38

[000151] В качестве аллогенного клеточного продукта T_{REX}-клетки отслеживают по локусу B2M, который обеспечивает повышение их восприимчивости к опосредованному NK-клетками истощению. Данные клетки можно дополнительно модифицировать в локусе CD38 для ограничения их истощения антителами к CD38. Линии T_{REX}-клеток и линии $CD38^{KO}B2M^{KO}$ T_{REX}-клеток получали с помощью CRISPR/Cas9. T_{REX}-клетки и $CD38^{KO}B2M^{KO}$ T_{REX}-клетки совместно культивировали с PBMC, выделенными от здоровых доноров. У T_{REX}-клеток не наблюдали падения количества при совместном культивировании с PBMC, тогда как $CD38^{KO}B2M^{KO}$ T_{REX}-клетки, как и ожидалось, были восприимчивы к опосредованному NK-клетками лизису (фиг. 31, вверху). NK-клетки экспрессируют высокие уровни CD38, и при предварительной инкубации NK-клеток с нацеливающимся на CD38 антителом, даратумамабом (Dara), перед совместным культивированием с $CD38^{KO}B2M^{KO}$ общими Т-клетками или $CD38^{KO}B2M^{KO}$ T_{REX}-клетками это давало >50% снижение цитолиза. Эти данные указывают, что $CD38^{KO}B2M^{KO}$ T_{REX}-клетки восприимчивы к опосредованному NK-клетками лизису и что данную восприимчивость к истощению можно регулировать посредством введения антител к CD38.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS), включающий:

(a) введение одного или нескольких генетических изменений в первичные иммунные клетки; и

(b) культивирование первичных иммунных клеток в культуральной среде;

где культивирование обеспечивает индуцирование пролиферации первичных иммунных клеток с получением популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS).

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий стимуляцию первичных иммунных клеток до введения одного или нескольких генетических изменений в первичные иммунные клетки.

3. Способ по любому из п. 1 или п. 2, дополнительно включающий стимуляцию первичных иммунных клеток после введения одного или нескольких генетических изменений в первичные иммунные клетки.

4. Способ по любому из пп. 1-3, дополнительно включающий подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных регуляторных факторов в первичных иммунных клетках.

5. Способ по п. 4, где эндогенный регуляторный фактор представляет собой ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитор циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B) или S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазу (MTAP).

6. Способ по любому из пп. 1-5, дополнительно включающий подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных генов, связанных с иммунитетом, в первичных иммунных клетках.

7. Способ по п. 6, где эндогенный ген, связанный с иммунитетом, представляет собой ген бета-2-микроглобулина (B2M) и/или константного участка α-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC).

8. Способ по любому из пп. 1-7, где введение одного или нескольких генетических изменений предусматривает введение в первичные иммунные клетки одного или нескольких трансгенов, кодирующих антиапоптотический фактор или фактор, полученный из вируса.

9. Способ по п. 8, где антиапоптотический фактор представляет собой или сверхбольшой белок В-клеточной лимфомы (Bcl-xL), или фактор 2 В-клеточной лимфомы (Bcl-2).

10. Способ по п. 8, где фактор, полученный из вируса, представляет собой любой из StpA A11 *Saimiriine gammaherpesvirus 2*, StpC *Herpesvirus saimiri*, Tip *Herpesvirus saimiri* или модифицированного Tio-LMP1 *Herpesvirus Ateles*-вируса Эпштейна-Барра.

11. Способ по любому из пп. 1-10, дополнительно включающий подавление экспрессии кластера дифференцировки 38 (CD38).

12. Способ по любому из пп. 1-11, дополнительно включающий подавление экспрессии гомолога фосфатазы и тензина (PTEN).

13. Способ по любому из пп. 1-12, где первичные иммунные клетки предусматривают общие Т-клетки.

14. Способ по любому из пп. 1-12, где первичные иммунные клетки предусматривают $CD8^+$ Т-клетки.

15. Способ по любому из пп. 1-12, где первичные иммунные клетки предусматривают $CD4^+$ Т-клетки.

16. Способ по любому из пп. 1-15, где первичные иммунные клетки предусматривают гамма-дельта-Т-клетки, инвариантные Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой (MAIT), натуральные клетки-киллеры (NK) и/или натуральные Т-клетки-киллеры (NKT).

17. Способ по любому из пп. 1-16, где первичные иммунные клетки являются человеческими.

18. Способ по любому из пп. 1-17, дополнительно включающий введение полинуклеотида, который кодирует химерный антигенный рецептор (CAR).

19. Способ по любому из пп. 1-18, где популяцию первичных иммунных клеток возможно культивировать со стимуляцией с помощью TCR или без нее в течение по меньшей мере 100 дней.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где первичные иммунные клетки подвергаются по меньшей мере приблизительно 10^6-кратному размножению во время культивирования.

21. Способ по любому из пп. 1-20, где первичные иммунные клетки культивируют в культуральной среде, которая не содержит стимул для первичных иммунных клеток.

22. Способ по любому из п. 2 или п. 3, дополнительно включающий (c) повторную стимуляцию первичных иммунных клеток.

23. Способ по п. 22, где первичные иммунные клетки подвергаются по меньшей мере приблизительно 10^8-кратному размножению во время культивирования.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где трансген вводят с помощью ДНК-транспозона на основе плазмиды.

25. Способ по любому из пп. 1-23, где трансген вводят с помощью лентивирусной платформы.

26. Способ по любому из пп. 1-23, где трансген вводят с помощью сайтспецифической интеграции посредством CRISPR.

27. Способ получения популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS), включающий:

(a) подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных регуляторных факторов в первичных иммунных клетках,

где эндогенный регуляторный фактор представляет собой ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитор циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B) или S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазу (MTAP);

(b) подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных генов, связанных с иммунитетом, в первичных иммунных клетках,

где эндогенный ген, связанный с иммунитетом, представляет собой ген бета-2-микроглобулина (B2M) и/или константного участка α-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC); и

(c) культивирование первичных иммунных клеток в культуральной среде;

где культивирование обеспечивает индуцирование пролиферации первичных иммунных клеток с получением популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS).

28. Способ по п. 27, дополнительно включающий введение трансгена, кодирующего или сверхбольшой белок В-клеточной лимфомы (Bcl-xL), или фактор 2 В-клеточной лимфомы (Bcl-2), в первичные иммунные клетки.

29. Способ по любому из п. 27 или п. 28, дополнительно включающий стимуляцию первичных иммунных клеток до введения одного или нескольких генетических изменений в первичные иммунные клетки.

30. Способ по любому из пп. 27-29, дополнительно включающий стимуляцию первичных иммунных клеток после введения одного или нескольких генетических изменений в первичные иммунные клетки.

31. Способ по любому из пп. 27-30, дополнительно включающий подавление экспрессии кластера дифференцировки 38 (CD38).

32. Способ по любому из пп. 27-31, дополнительно включающий подавление экспрессии гомолога фосфатазы и тензина (PTEN).

33. Способ по любому из пп. 27-32, где первичные иммунные клетки предусматривают общие Т-клетки.

34. Способ по любому из пп. 27-32, где первичные иммунные клетки предусматривают $CD8^+$ Т-клетки.

35. Способ по любому из пп. 27-32, где первичные иммунные клетки предусматривают $CD4^+$ Т-клетки.

36. Способ по любому из пп. 27-32, где первичные иммунные клетки предусматривают гамма-дельта-Т-клетки, инвариантные Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой (MAIT), натуральные клетки-киллеры (NK) и/или натуральные Т-клетки-киллеры (NKT).

37. Способ по любому из пп. 27-36, где первичные иммунные клетки являются человеческими.

38. Способ по любому из пп. 27-37, дополнительно включающий введение полинуклеотида, который кодирует химерный антигенный рецептор (CAR).

39. Способ по любому из пп. 27-38, где популяцию первичных иммунных клеток возможно культивировать в течение по меньшей мере 100 дней.

40. Способ по любому из пп. 27-39, где первичные иммунные клетки подвергаются по меньшей мере приблизительно 10^6-кратному размножению во время культивирования.

41. Способ по любому из пп. 27-40, где первичные иммунные клетки культивируют в культуральной среде, которая не содержит стимул для первичных иммунных клеток.

42. Способ по любому из пп. 27-41, дополнительно включающий (d) повторную стимуляцию первичных иммунных клеток.

43. Способ по п. 42, где первичные иммунные клетки подвергаются по меньшей мере приблизительно 10^8-кратному размножению во время культивирования.

44. Способ по любому из пп. 27-43, где трансген вводят с помощью ДНК-транспозона на основе плазмиды.

45. Способ по любому из пп. 27-43, где трансген вводят с помощью лентивирусной платформы.

46. Способ по любому из пп. 27-43, где трансген вводят с помощью сайтспецифической интеграции посредством CRISPR.

47. Способ получения популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS), включающий:

(a) подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных регуляторных факторов в первичных иммунных клетках,

где эндогенный регуляторный фактор представляет собой ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитор циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B) или S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазу (MTAP); и

(b) культивирование первичных иммунных клеток в культуральной среде;

где культивирование обеспечивает индуцирование пролиферации первичных иммунных клеток с получением популяции первичных иммунных клеток, устойчивых к репликативному старению (RRS).

48. Способ по п. 47, дополнительно включающий стимуляцию первичных иммунных клеток до введения одного или нескольких генетических изменений в первичные иммунные клетки.

49. Способ по любому из п. 47 или п. 48, дополнительно включающий стимуляцию первичных иммунных клеток после введения одного или нескольких генетических изменений в первичные иммунные клетки.

50. Способ по любому из пп. 47-49, дополнительно включающий подавление экспрессии одного или нескольких эндогенных генов, связанных с иммунитетом, в первичных иммунных клетках.

51. Способ по п. 50, где эндогенный ген, связанный с иммунитетом, представляет собой ген бета-2-микроглобулина (B2M) и/или константного участка α-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC).

52. Способ по любому из пп. 47-51, дополнительно включающий подавление экспрессии кластера дифференцировки 38 (CD38).

53. Способ по любому из пп. 47-52, дополнительно включающий подавление экспрессии гомолога фосфатазы и тензина (PTEN).

54. Способ по любому из пп. 47-53, где первичные иммунные клетки предусматривают общие Т-клетки.

55. Способ по любому из пп. 47-53, где первичные иммунные клетки предусматривают $CD8^+$ Т-клетки.

56. Способ по любому из пп. 47-53, где первичные иммунные клетки предусматривают $CD4^+$ Т-клетки.

57. Способ по любому из пп. 47-53, где первичные иммунные клетки предусматривают гамма-дельта-Т-клетки, инвариантные Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой (MAIT), натуральные клетки-киллеры (NK) и/или натуральные Т-клетки-киллеры (NKT).

58. Способ по любому из пп. 47-57, где первичные иммунные клетки являются человеческими.

59. Способ по любому из пп. 47-58, дополнительно включающий введение полинуклеотида, который кодирует химерный антигенный рецептор (CAR).

60. Способ по любому из пп. 47-59, где популяцию первичных иммунных клеток возможно культивировать в течение по меньшей мере 100 дней.

61. Способ по любому из пп. 47-60, где первичные иммунные клетки подвергаются по меньшей мере приблизительно 10^6-кратному размножению во время культивирования.

62. Способ по любому из пп. 47-61, где первичные иммунные клетки культивируют в культуральной среде, которая не содержит стимул для первичных иммунных клеток.

63. Способ по любому из п. 47 или п. 48, дополнительно включающий (c) стимуляцию первичных иммунных клеток.

64. Способ по п. 63, где первичные иммунные клетки подвергаются по меньшей мере приблизительно 10^8-кратному размножению во время культивирования.

65. Способ по любому из пп. 47-64, где трансген вводят с помощью ДНК-транспозона на основе плазмиды.

66. Способ по любому из пп. 47-64, где трансген вводят с помощью лентивирусной платформы.

67. Способ по любому из пп. 47-64, где трансген вводят с помощью сайтспецифической интеграции посредством CRISPR.

68. Популяция сконструированных иммунных клеток, полученная согласно способу по любому из пп. 1-67.

69. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию сконструированных иммунных клеток по п. 68 и фармацевтически приемлемый носитель.

70. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 69.

71. Сконструированная Т-клетка, которая не экспрессирует ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитор циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B) и/или S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазу (MTAP).

72. Сконструированная Т-клетка по п. 71, где сконструированная Т-клетка дополнительно содержит трансген, кодирующий или сверхбольшой белок В-клеточной лимфомы (Bcl-xL), или фактор 2 В-клеточной лимфомы (Bcl-2).

73. Сконструированная Т-клетка по любому из п. 71 или п. 72, где сконструированная Т-клетка не экспрессирует один или несколько эндогенных генов, связанных с иммунитетом, в первичных иммунных клетках.

74. Сконструированная Т-клетка по п. 73, где эндогенный ген, связанный с иммунитетом, представляет собой ген бета-2-микроглобулина (B2M) и/или константного участка α-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC).

75. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 71-74, где сконструированная Т-клетка не экспрессирует кластер дифференцировки 38 (CD38).

76. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 71-75, дополнительно содержащая полинуклеотид, который кодирует химерный антигенный рецептор (CAR).

77. Сконструированная Т-клетка по п. 71, где сконструированная Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку, $CD4^+$ Т-клетку, гамма-дельта-Т-клетку, инвариантную Т-клетку, ассоциированную со слизистой оболочкой (MAIT), натуральную клетку-киллера (NK), натуральную Т-клетку-киллера (NKT) или их комбинацию.

78. Сконструированная Т-клетка по п. 71, где сконструированная Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку.

79. Сконструированная Т-клетка по п. 71, где сконструированная Т-клетка представляет собой $CD4^+$ Т-клетку.

80. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 71-79, где сконструированная Т-клетка является человеческой.

81. Сконструированная Т-клетка, которая не экспрессирует ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитор циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B), S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазу (MTAP), бета-2-микроглобулин (B2M) и/или константный участок α-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC).

82. Сконструированная Т-клетка по п. 81, где сконструированная Т-клетка не экспрессирует кластер дифференцировки 38 (CD38).

83. Сконструированная Т-клетка по любому из п. 81 или п. 82, дополнительно содержащая полинуклеотид, который кодирует химерный антигенный рецептор (CAR).

84. Сконструированная Т-клетка по п. 81, где сконструированная Т-клетка представляет собой гамма-дельта-Т-клетку, инвариантную Т-клетку, ассоциированную со слизистой оболочкой (MAIT), натуральную клетку-киллера (NK), натуральную Т-клетку-киллера (NKT) или их комбинацию.

85. Сконструированная Т-клетка по п. 81, где сконструированная Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку.

86. Сконструированная Т-клетка по п. 81, где сконструированная Т-клетка представляет собой $CD4^+$ Т-клетку.

87. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 81-86, где сконструированная Т-клетка является человеческой.

88. Сконструированная Т-клетка, экспрессирующая трансген, кодирующий сверхбольшой белок В-клеточной лимфомы (Bcl-XL), где сконструированная Т-клетка не экспрессирует ингибитор циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A), ингибитор циклинзависимой киназы 2B (CDKN2B), S-метил-5'-тиоаденозинфосфорилазу (MTAP) и/или гомолог фосфатазы и тензина (PTEN).

89. Сконструированная Т-клетка по п. 88, где сконструированная Т-клетка не экспрессирует один или несколько эндогенных генов, связанных с иммунитетом, в первичных иммунных клетках.

90. Сконструированная Т-клетка по п. 89, где эндогенный ген, связанный с иммунитетом, представляет собой ген бета-2-микроглобулина (B2M) или константного участка α-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC).

91. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 88-90, где сконструированная Т-клетка не экспрессирует кластер дифференцировки 38 (CD38).

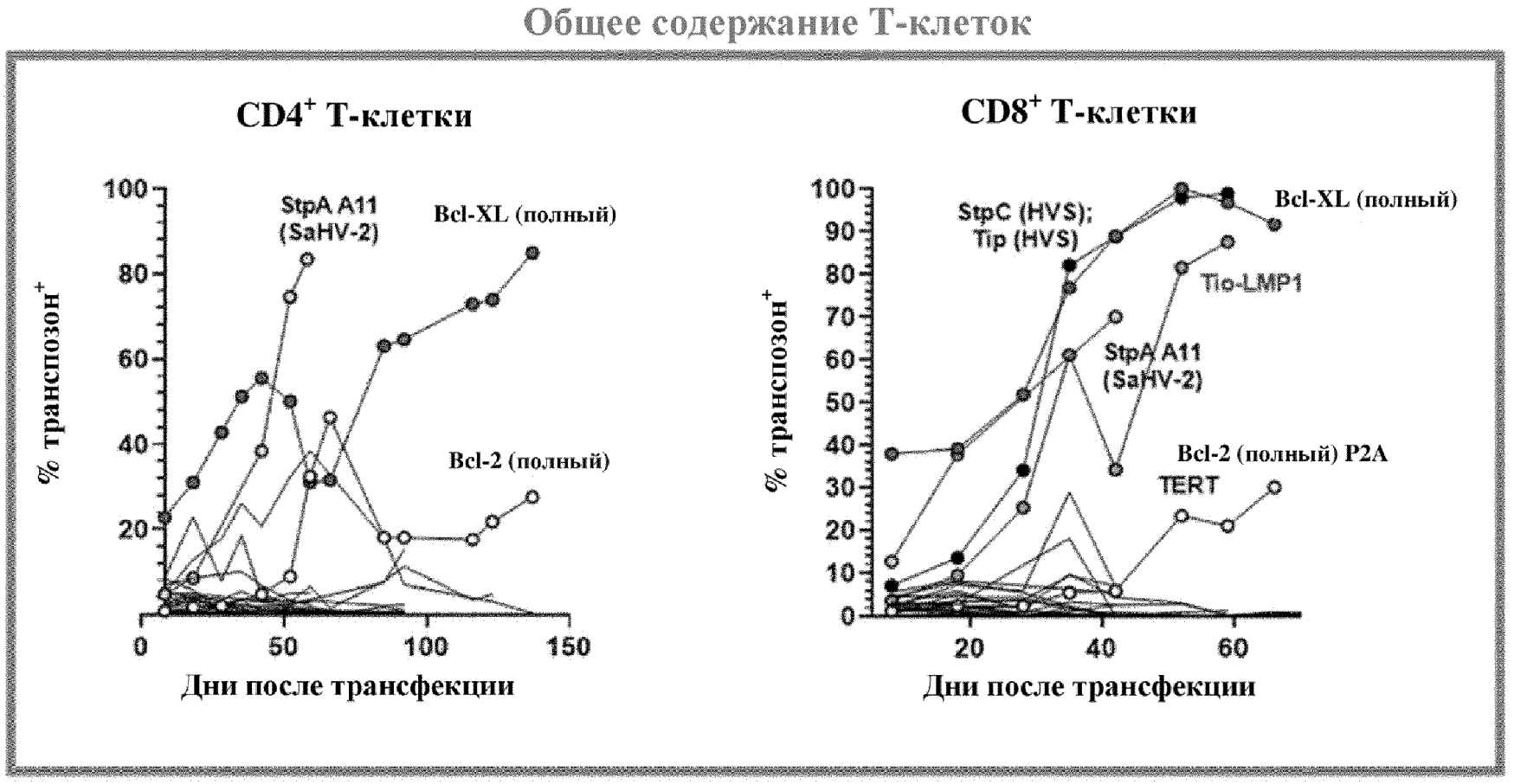
92. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 88-91, дополнительно содержащая полинуклеотид, который кодирует химерный антигенный рецептор (CAR).

93. Сконструированная Т-клетка по п. 88, где сконструированная Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку, $CD4^+$ Т-клетку, дельта-гамма-Т-клетку, инвариантную Т-клетку, ассоциированную со слизистой оболочкой (MAIT), натуральную клетку-киллера (NK) или их комбинацию.

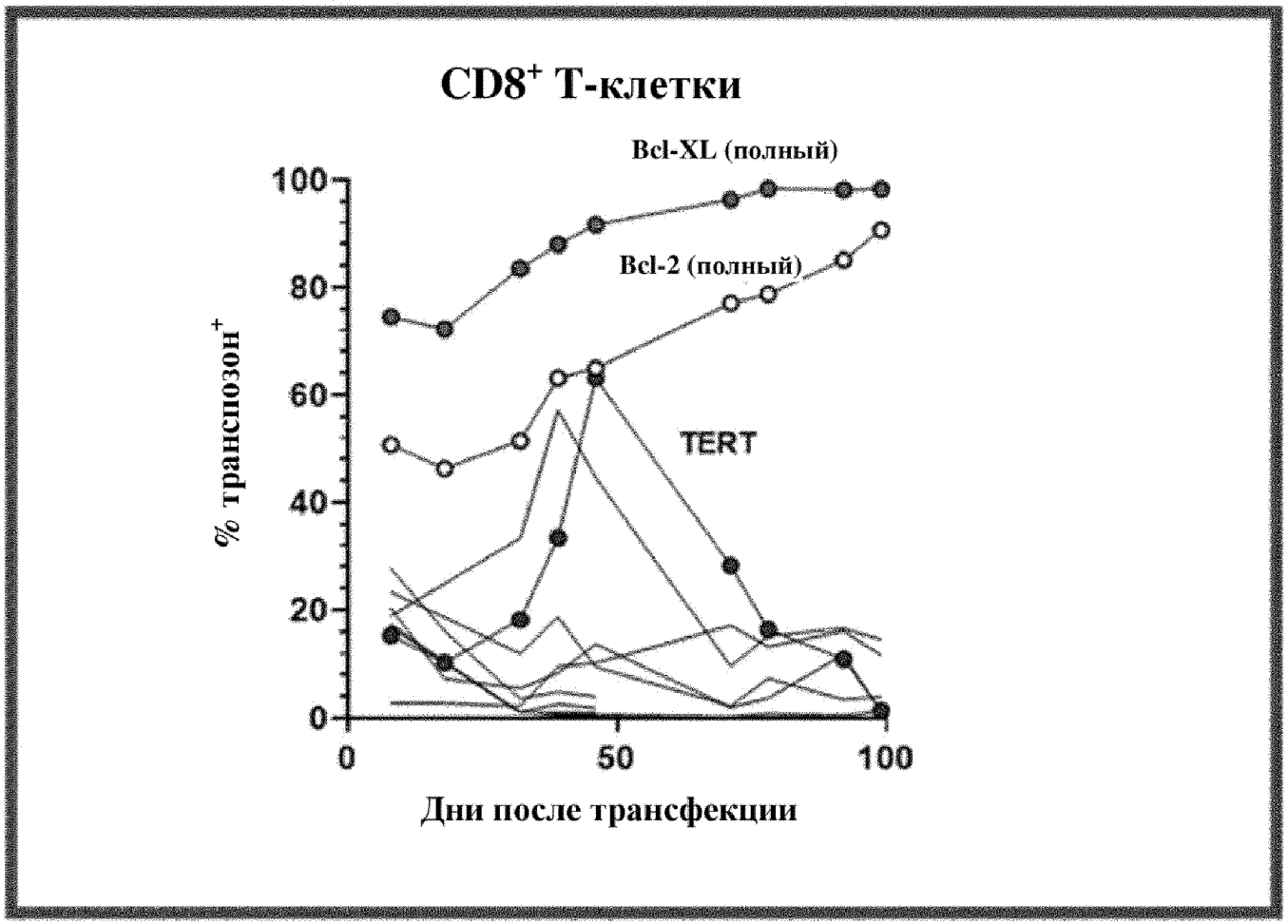
94. Сконструированная Т-клетка по п. 88, где сконструированная Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку.

95. Сконструированная Т-клетка по п. 88, где сконструированная Т-клетка представляет собой $CD4^+$ Т-клетку.

96. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 88-95, где сконструированная Т-клетка является человеческой.

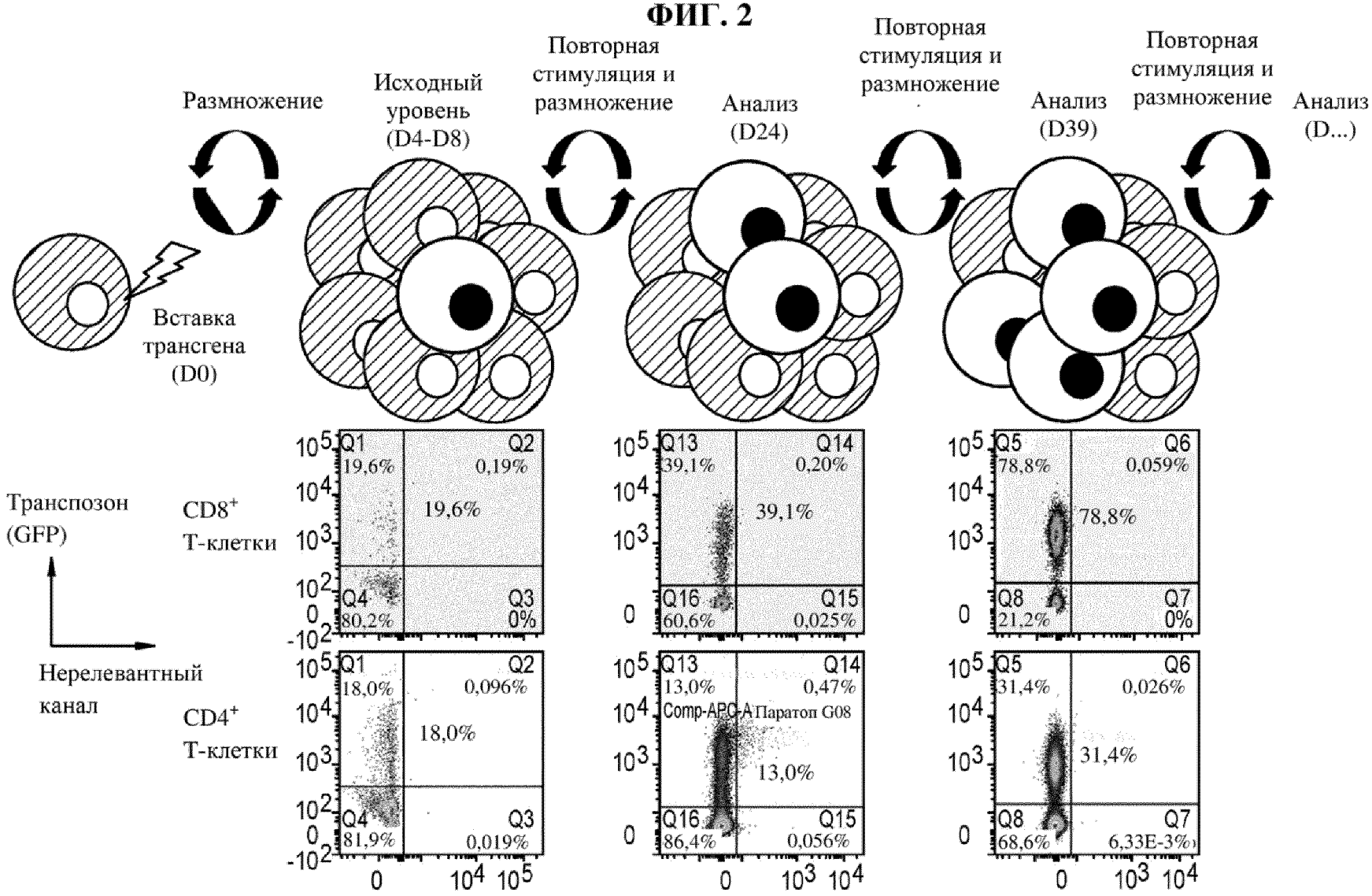

Общее содержание Т-клеток
CD4+ Т-клетки
% транспозон+
StpA A11 (SaHV-2)
Bcl-XL (полный)
Bcl-2 (полный)
Дни после трансфекции
CD8+ Т-клетки
% транспозон+
StpC (HVS); Tip (HVS)
Bcl-XL (полный)
Tio-LMP1
StpA A11 (SaHV-2)
Bcl-2 (полный) P2A
TERT
Дни после трансфекции

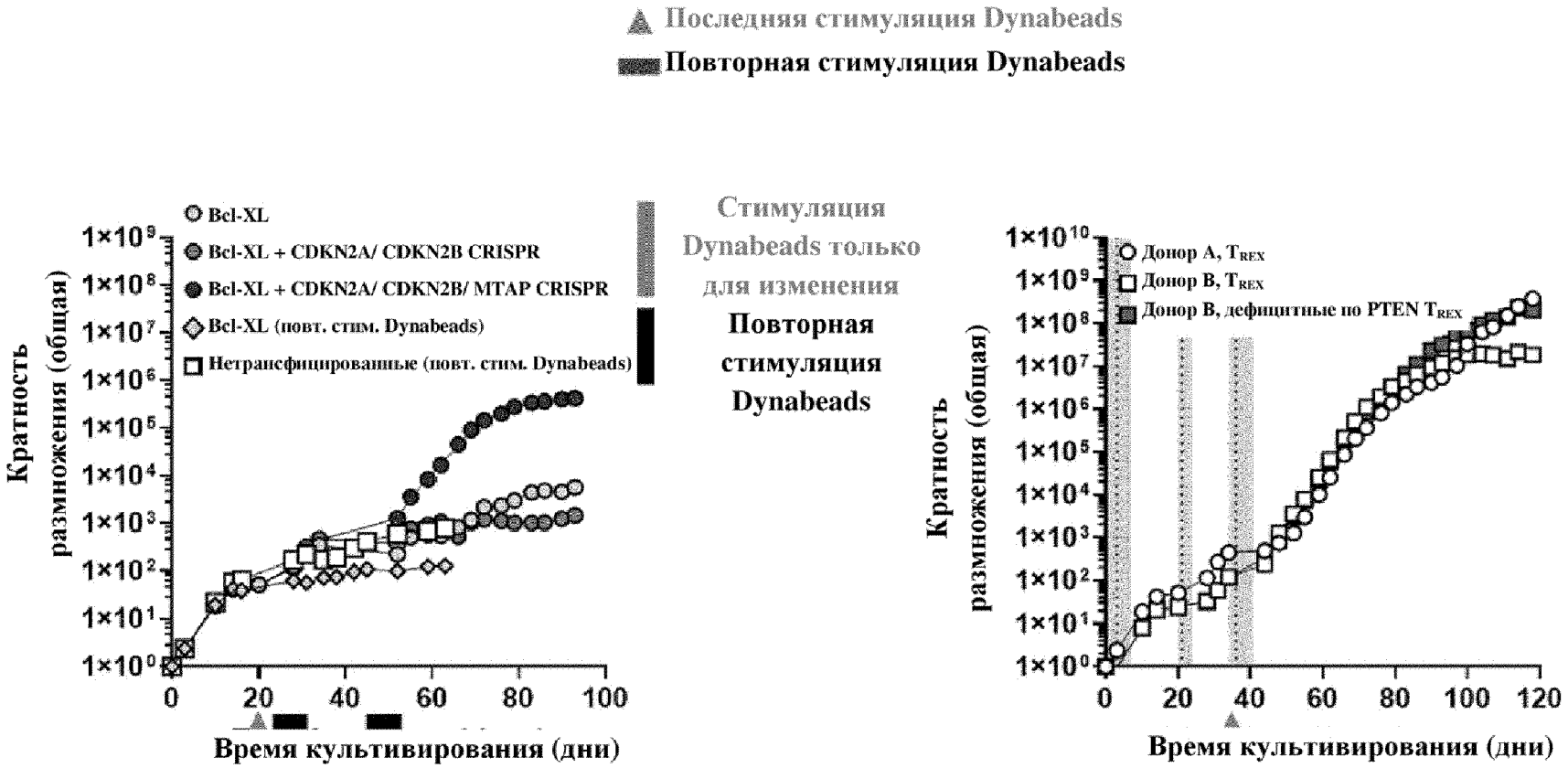
ФИГ. 1А


CD8+ Т-клетки
Bcl-XL (полный)
Bcl-2 (полный)
TERT
% транспозон+
100
80
60
40
20
0
0
50
100
Дни после трансфекции

ФИГ. 1В

ФИГ. 2

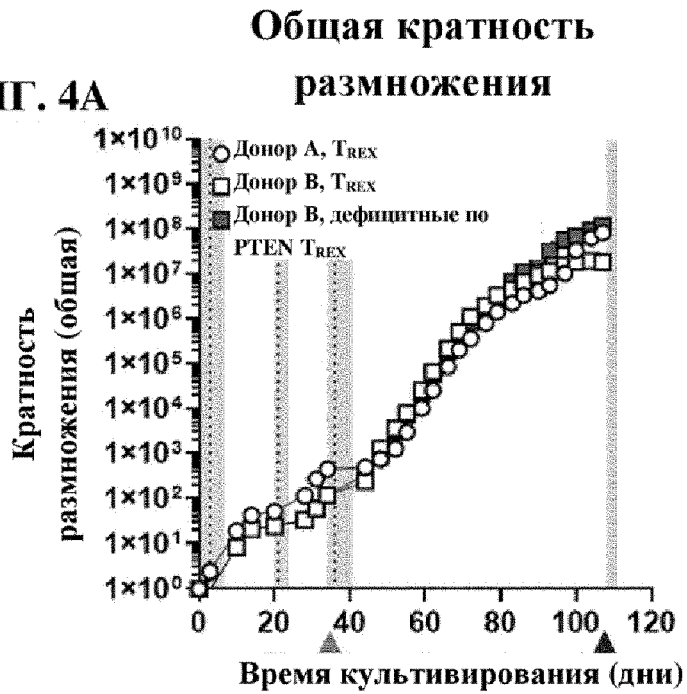

Размножение
Исходный уровень (D4-D8)
Повторная стимуляция и размножение
Анализ (D24)
Повторная стимуляция и размножение
Анализ (D39)
Повторная стимуляция и размножение
Анализ (D...)
Вставка трансгена (D0)
Транспозон (GFP)
Нерелевантный канал
CD8+ Т-клетки
CD4+ Т-клетки
Q1 19,6% Q2 0,19% 19,6% Q4 80,2% Q3 0%
Q13 39,1% Q14 0,20% 39,1% Q16 60,6% Q15 0,025%
Q5 78,8% Q6 0,059% 78,8% Q8 21,2% Q7 0%
Q1 18,0% Q2 0,096% 18,0% Q4 81,9% Q3 0,019%
Q13 13,0% Q14 0,47% Comp-APC-A Паратоп G08 13,0% Q16 86,4% Q15 0,056%
Q5 31,4% Q6 0,026% 31,4% Q8 68,6% Q7 6,33E-3%


Последняя стимуляция Dynabeads
Повторная стимуляция Dynabeads
Bcl-XL
Bcl-XL + CDKN2A/ CDKN2B CRISPR
Bcl-XL + CDKN2A/ CDKN2B/ MTAP CRISPR
Bcl-XL (повт. стим. Dynabeads)
Нетрансфицированные (повт. стим. Dynabeads)
Кратность размножения (общая)
Время культивирования (дни)
Стимуляция Dynabeads только для изменения
Повторная стимуляция Dynabeads
Донор А, TREX
Донор В, TREX
Донор В, дефицитные по PTEN TREX
Кратность размножения (общая)
Время культивирования (дни)

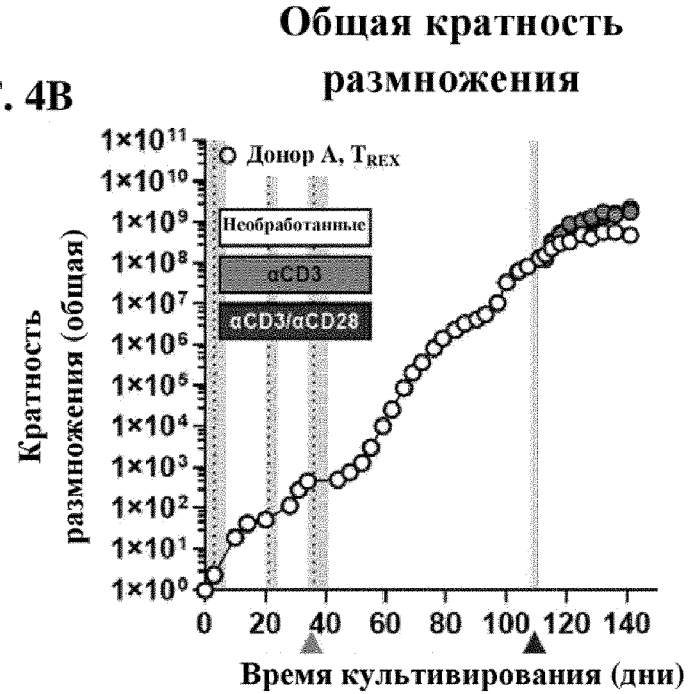
ФИГ. 3А

ФИГ. 3В

ФИГ. 4А



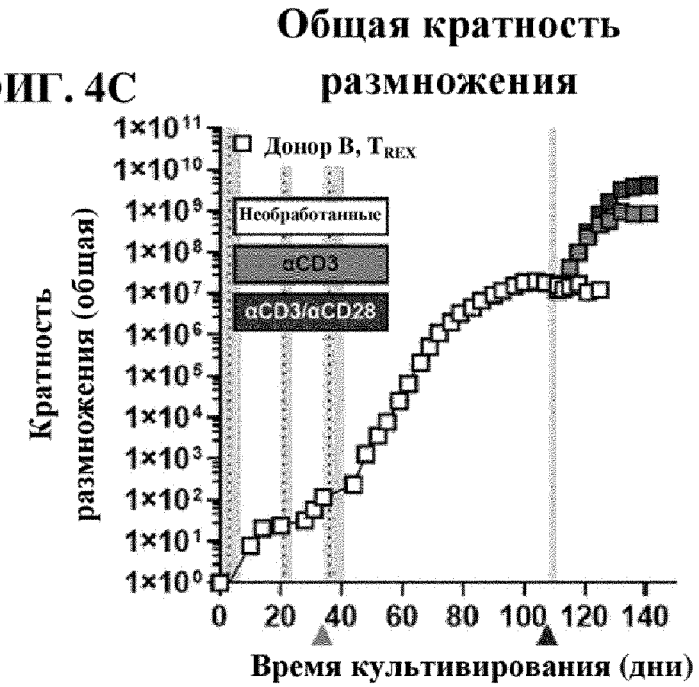
ФИГ. 4В



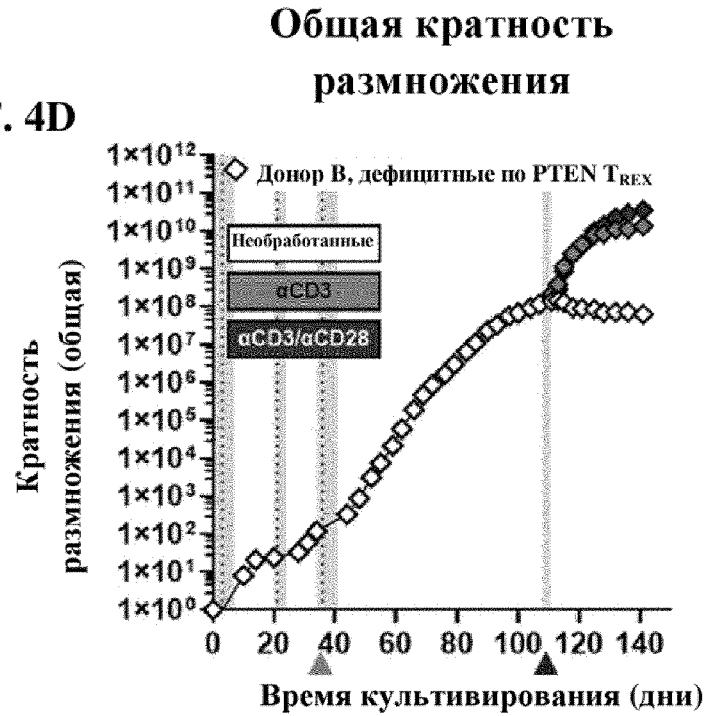
▲ Предыдущая стимуляция Dynabeads

▲ Повторная стимуляция Dynabeads

ФИГ. 4C

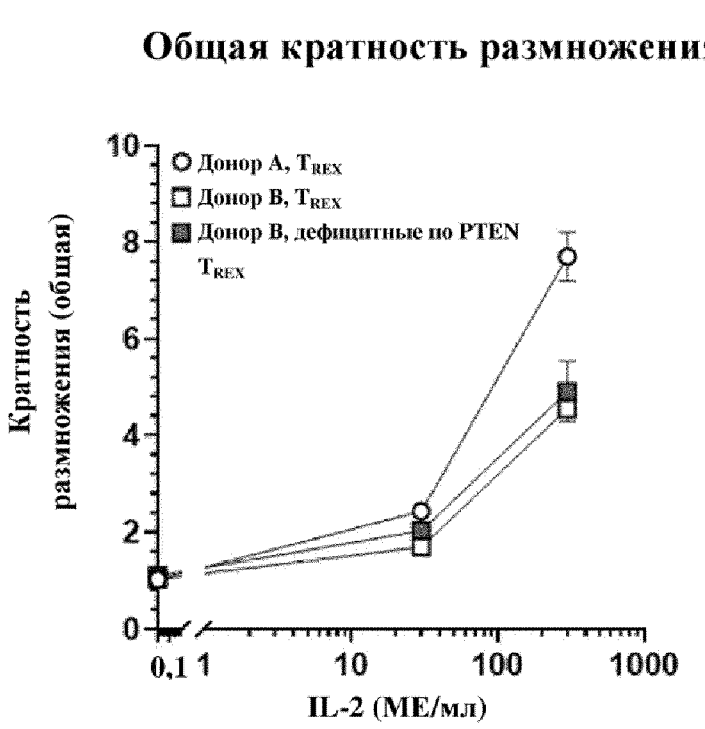


ФИГ. 4D

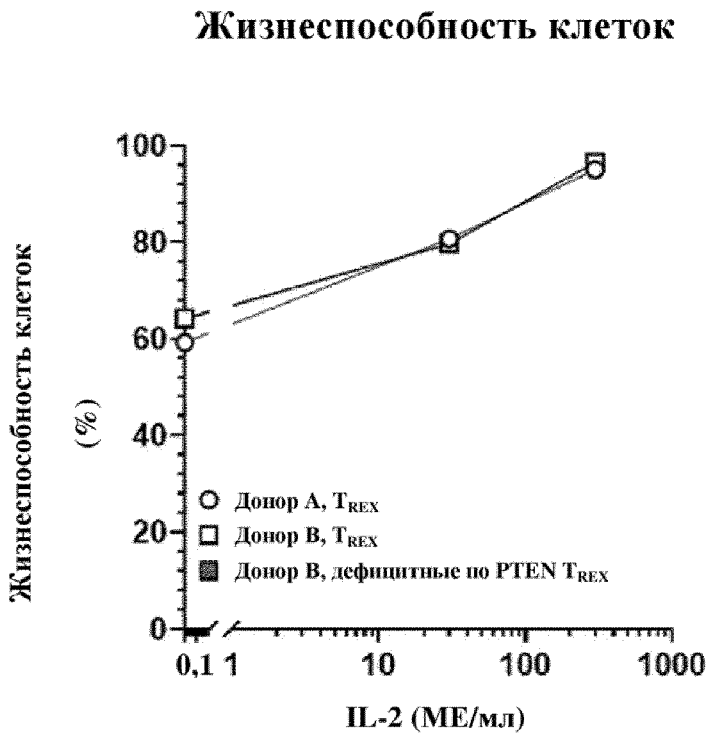


▲ Предыдущая стимуляция Dynabeads

▲ Повторная стимуляция Dynabeads

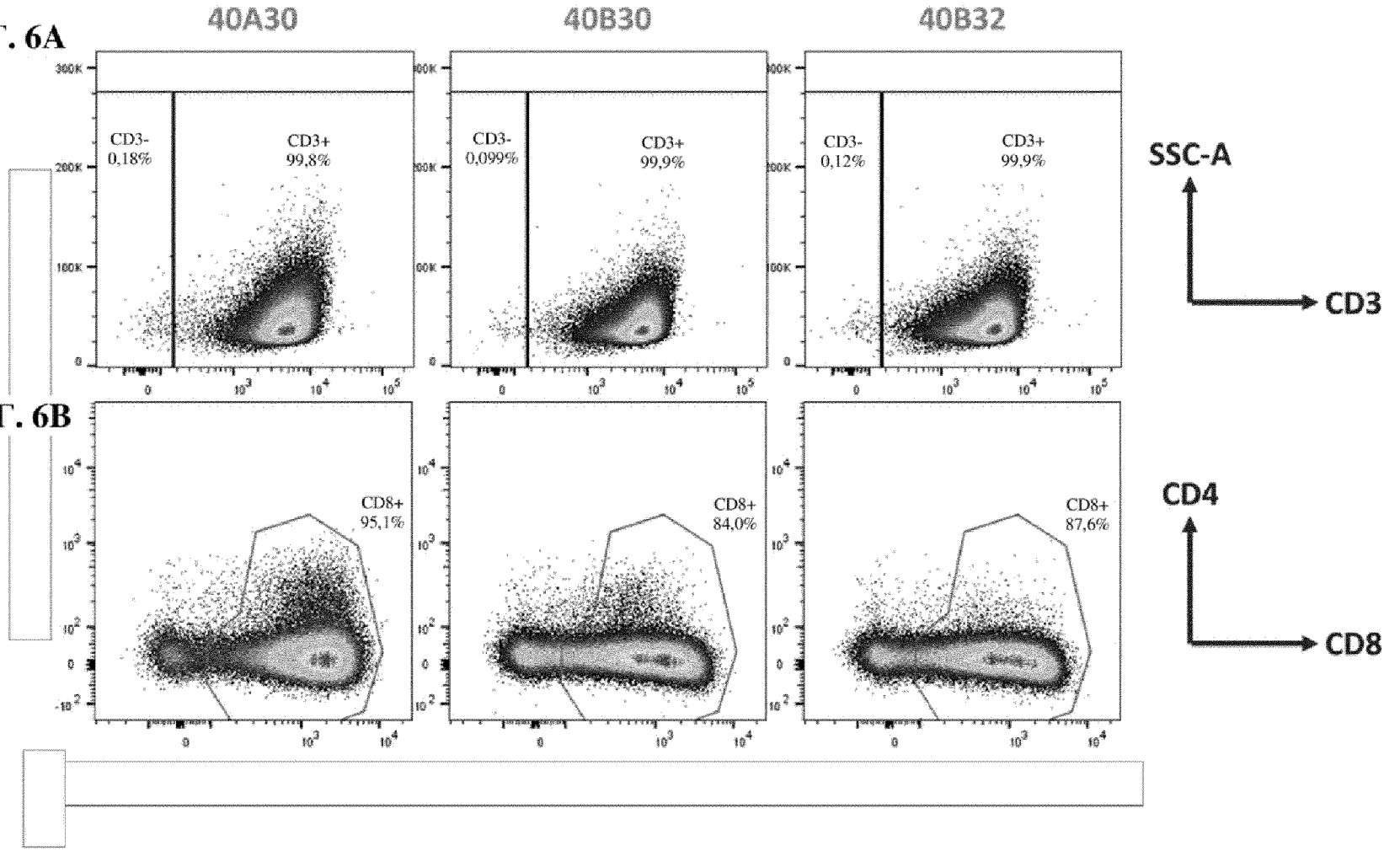

Общая кратность размножения
Кратность размножения (общая)
Донор A, TREX
Донор B, TREX
Донор B, дефицитные по PTEN TREX
0
2
4
6
8
10
0,1
1
10
100
1000
IL-2 (МЕ/мл)

ФИГ. 5A

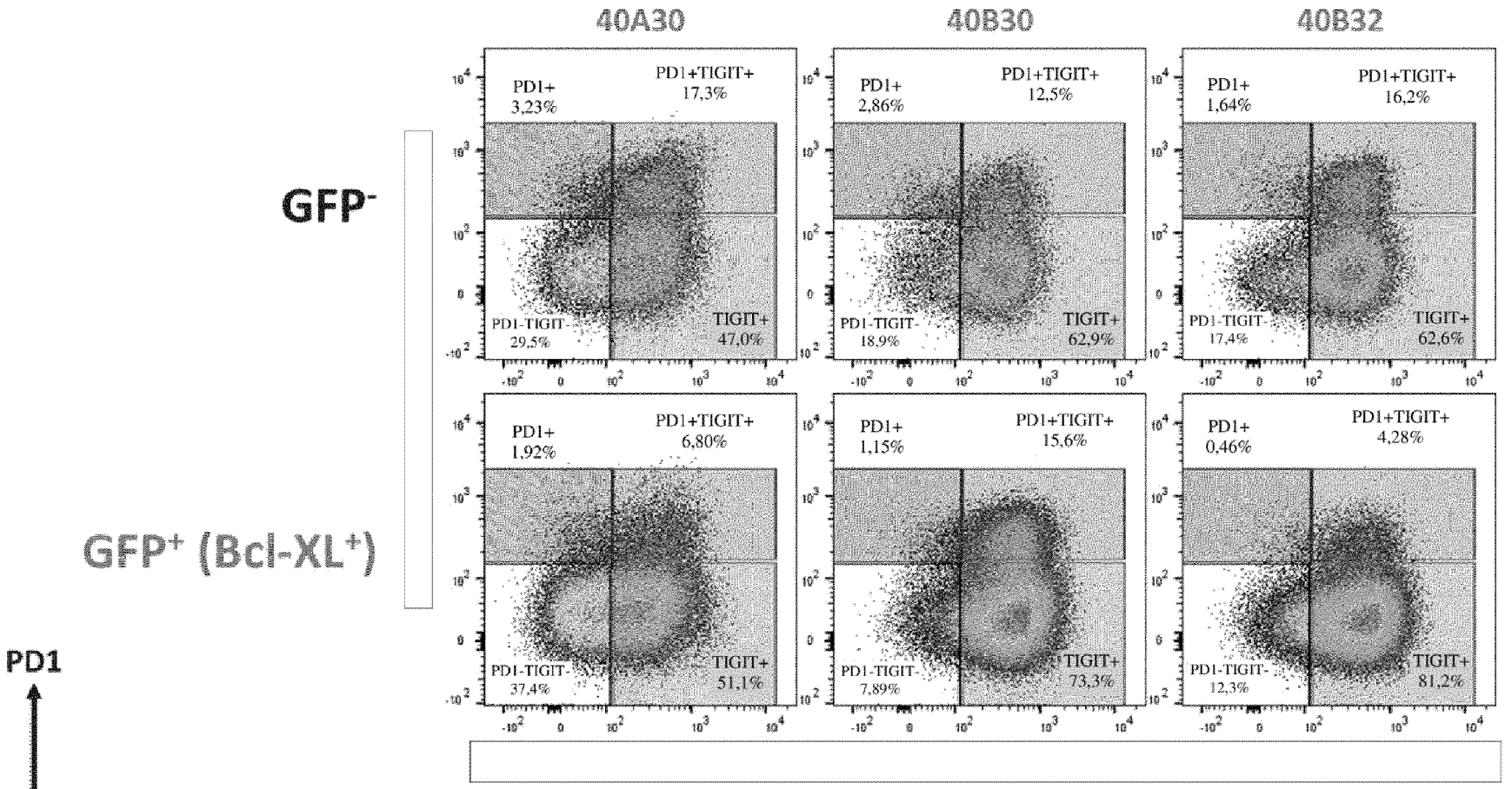

Жизнеспособность клеток
Жизнеспособность клеток (%)
Донор A, TREX
Донор B, TREX
Донор B, дефицитные по PTEN TREX
0
20
40
60
80
100
0,1
1
10
100
1000
IL-2 (МЕ/мл)

ФИГ. 5B

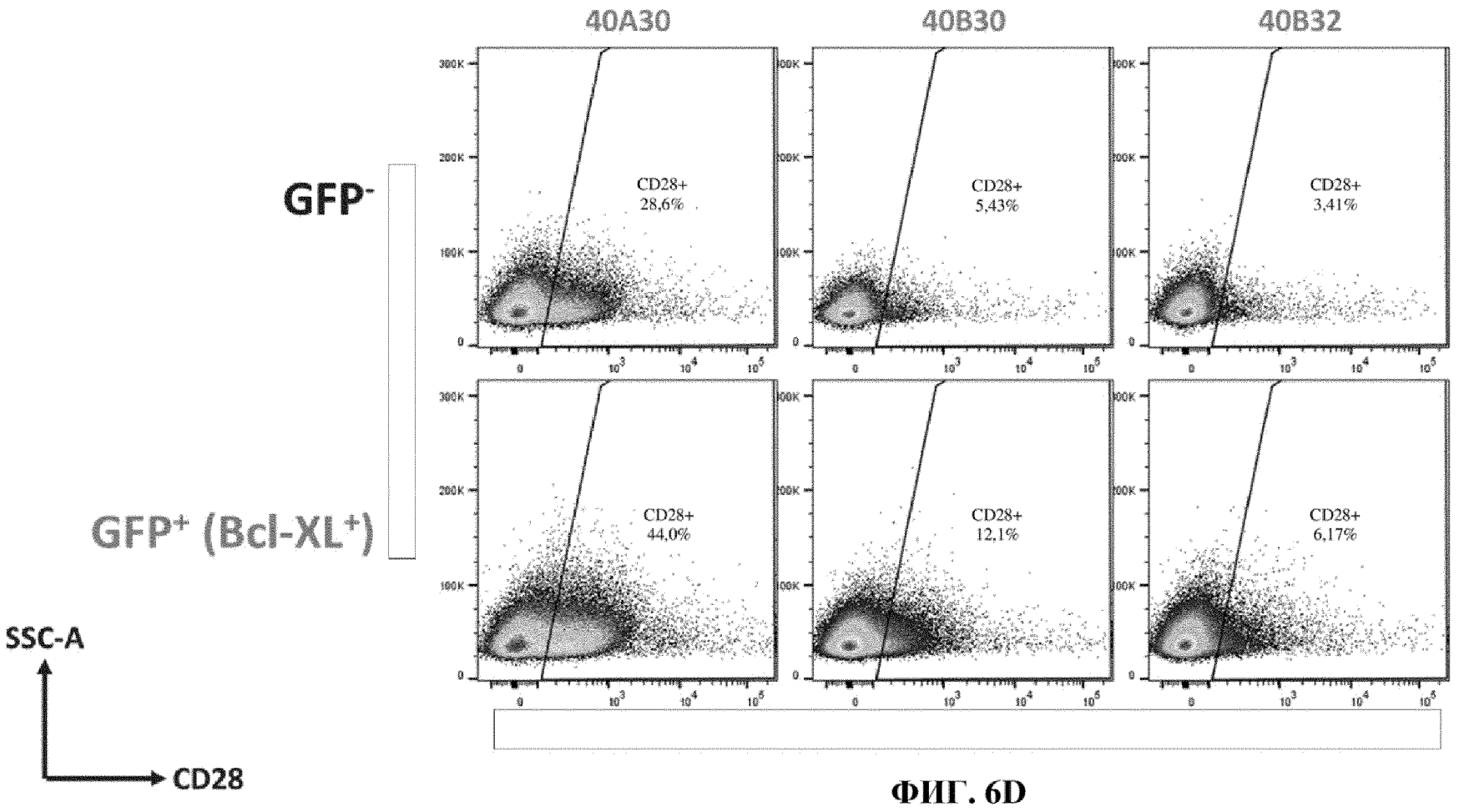
ФИГ. 6A


40A30
40B30
40B32
CD3-
0,18%
CD3+
99,8%
CD3-
0,099%
CD3+
99,9%
CD3-
0,12%
CD3+
99,9%
SSC-A
CD3
CD8+
95,1%
CD8+
84,0%
CD8+
87,6%
CD4
CD8

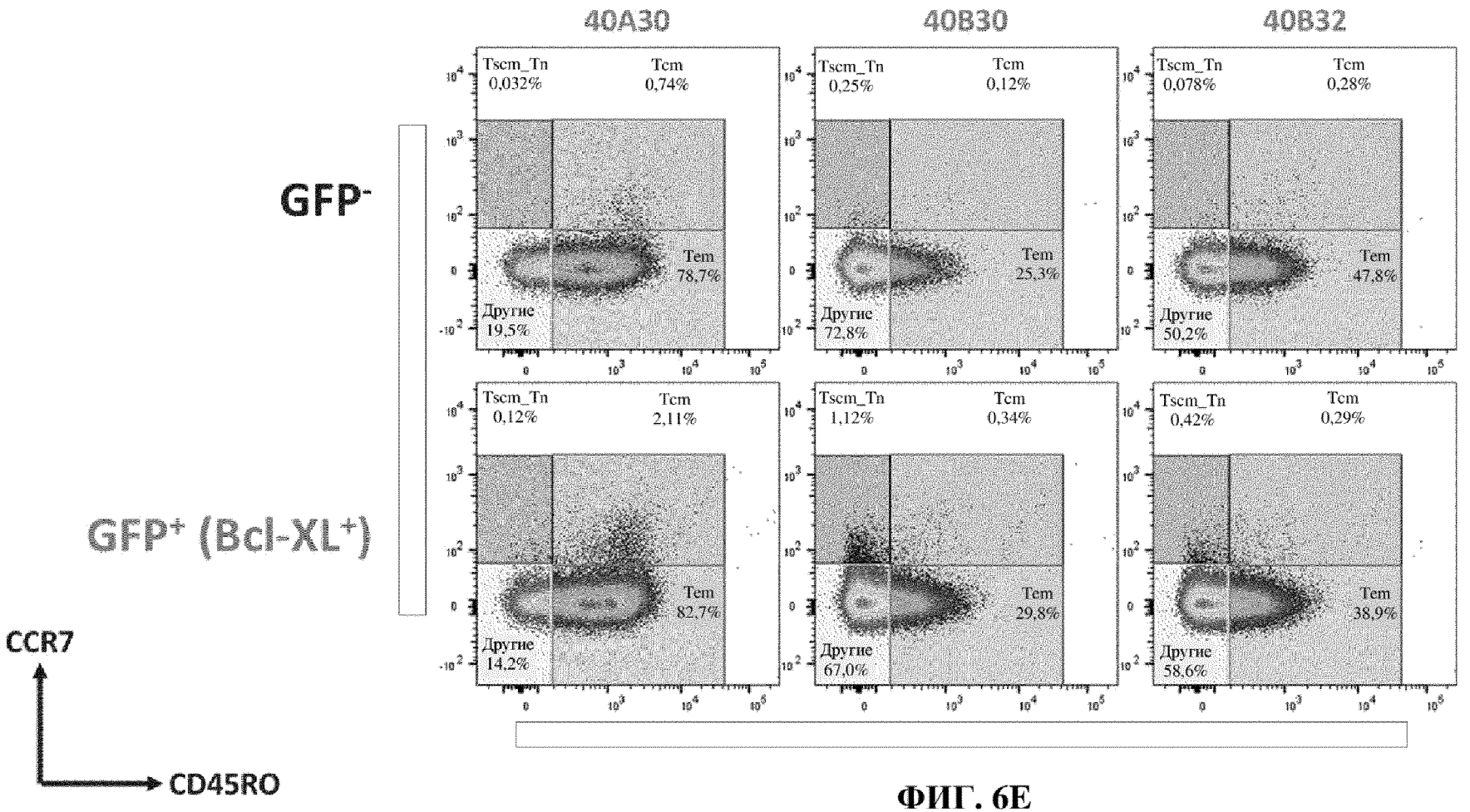
ФИГ. 6B


40A30
40B30
40B32
GFP-
GFP+ (Bcl-XL+)
PD1+ 3,23%
PD1+TIGIT+ 17,3%
PD1-TIGIT- 29,5%
TIGIT+ 47,0%
PD1+ 2,86%
PD1+TIGIT+ 12,5%
PD1-TIGIT- 18,9%
TIGIT+ 62,9%
PD1+ 1,64%
PD1+TIGIT+ 16,2%
PD1-TIGIT- 17,4%
TIGIT+ 62,6%
PD1+ 1,92%
PD1+TIGIT+ 6,80%
PD1-TIGIT- 37,4%
TIGIT+ 51,1%
PD1+ 1,15%
PD1+TIGIT+ 15,6%
PD1-TIGIT- 7,89%
TIGIT+ 73,3%
PD1+ 0,46%
PD1+TIGIT+ 4,28%
PD1-TIGIT- 12,3%
TIGIT+ 81,2%
PD1
TIGIT

ФИГ. 6С

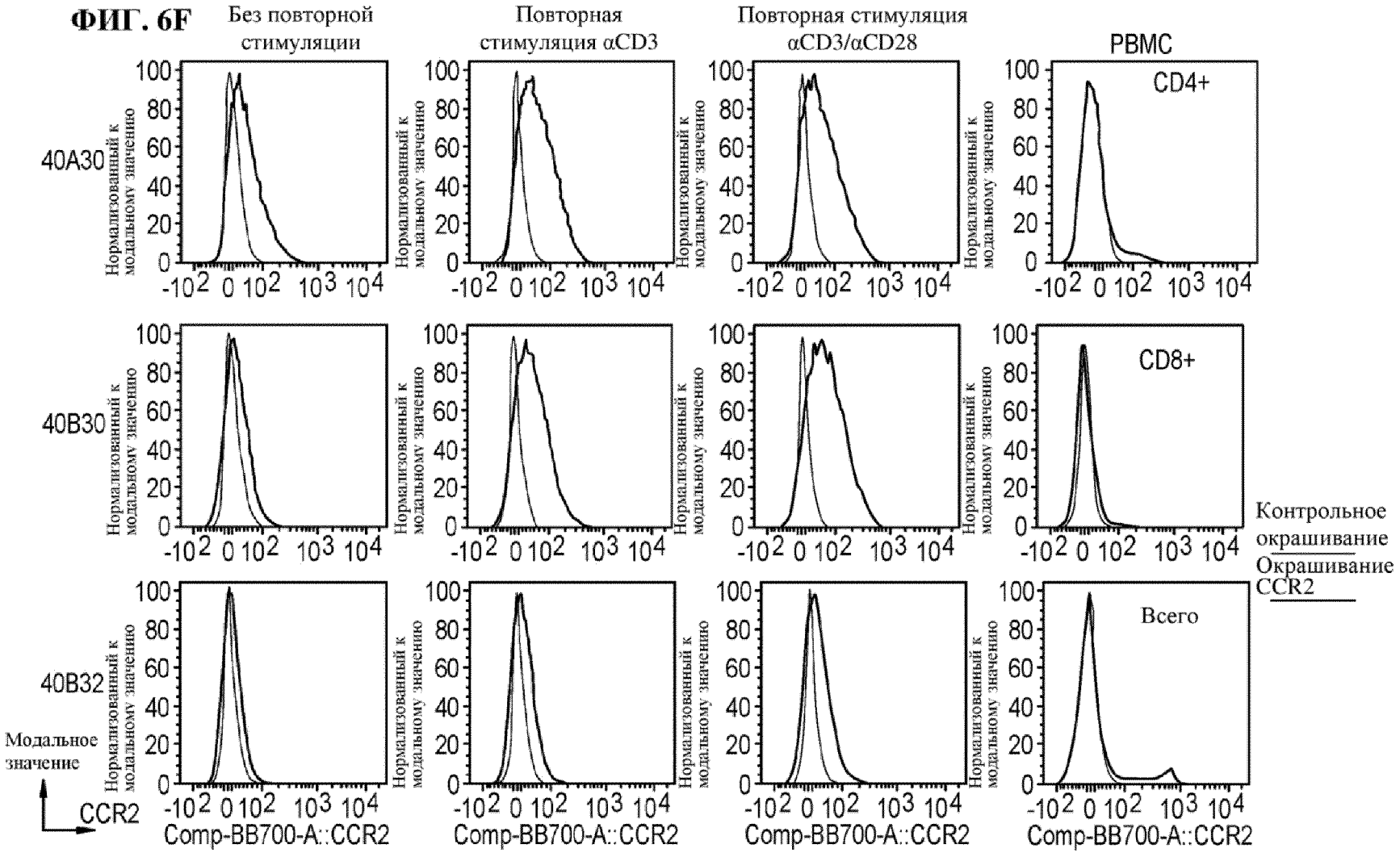

40A30
40B30
40B32
GFP-
GFP+ (Bcl-XL+)
CD28+
28,6%
CD28+
5,43%
CD28+
3,41%
CD28+
44,0%
CD28+
12,1%
CD28+
6,17%
SSC-A
CD28

ФИГ. 6D

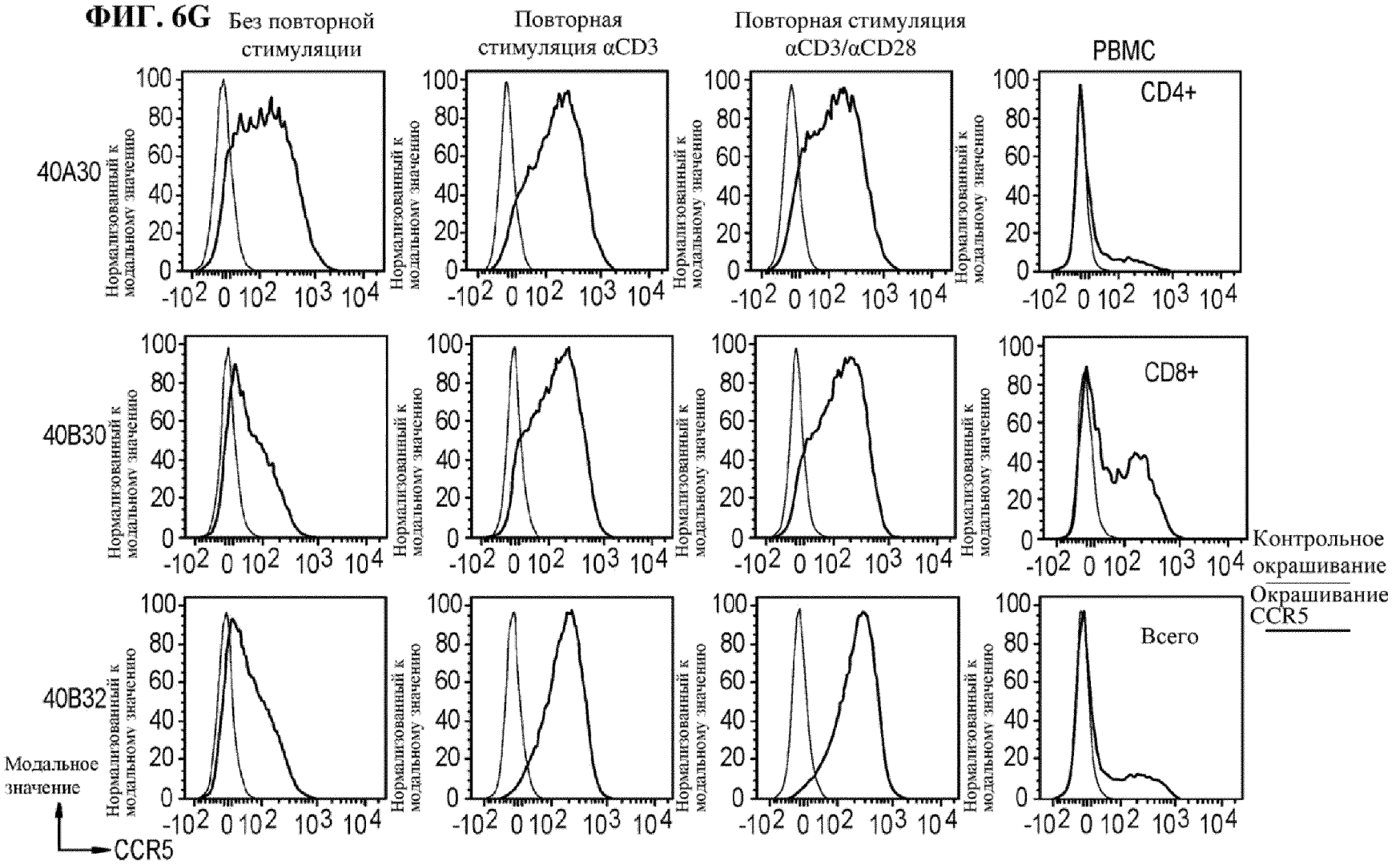

40A30
40B30
40B32
GFP-
GFP+ (Bcl-XL+)
Tscm_Tn
Tcm
Tem
Другие
0,032%
0,74%
78,7%
19,5%
0,25%
0,12%
25,3%
72,8%
0,078%
0,28%
47,8%
50,2%
0,12%
2,11%
82,7%
14,2%
1,12%
0,34%
29,8%
67,0%
0,42%
0,29%
38,9%
58,6%
CCR7
CD45RO

ФИГ. 6E

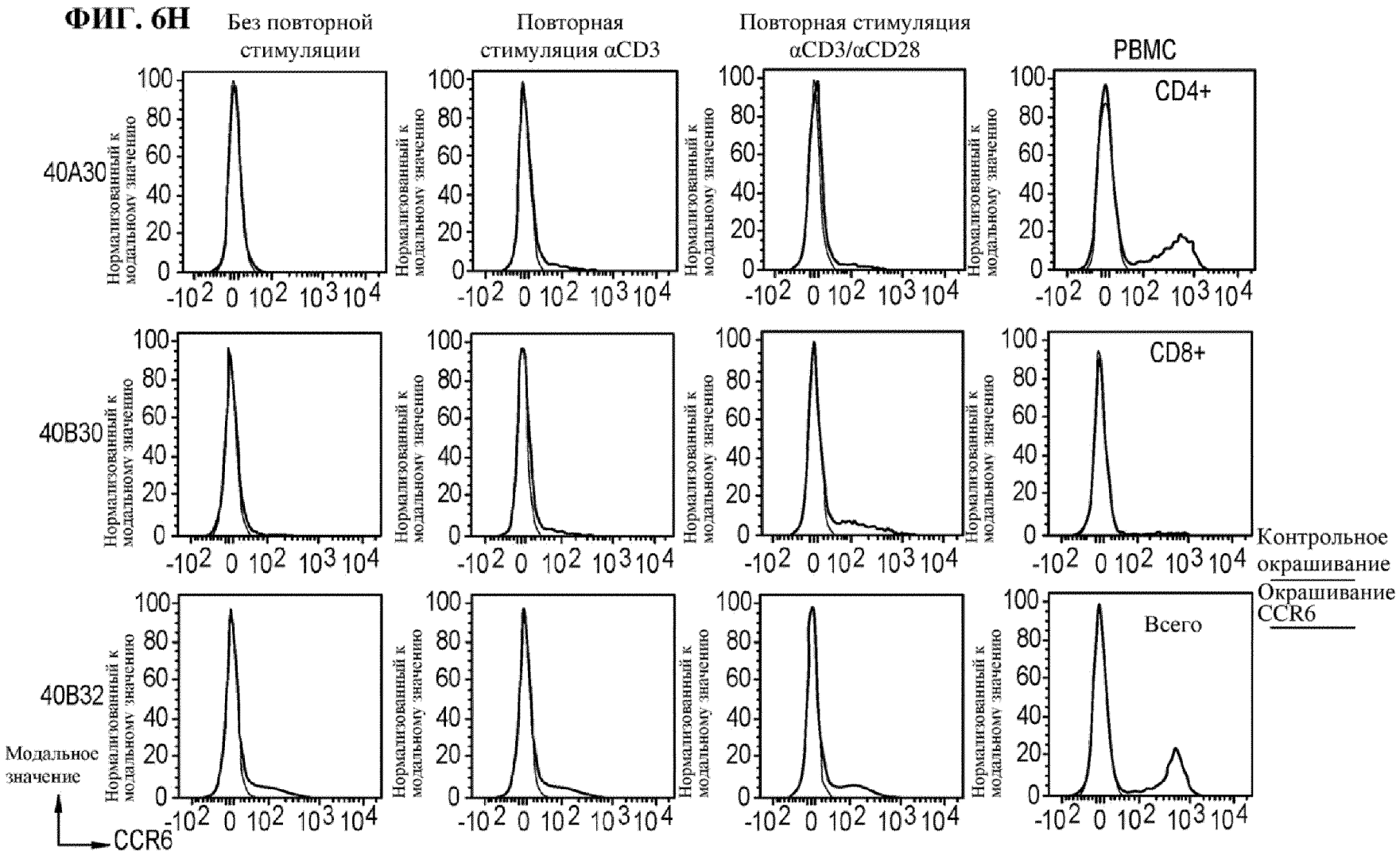
ФИГ. 6F


Без повторной стимуляции
Повторная стимуляция αCD3
Повторная стимуляция αCD3/αCD28
PBMC
CD4+
CD8+
Всего
40A30
40B30
40B32
Нормализованный к модальному значению
Модальное значение
CCR2
Comp-BB700-A::CCR2
Контрольное окрашивание
Окрашивание CCR2

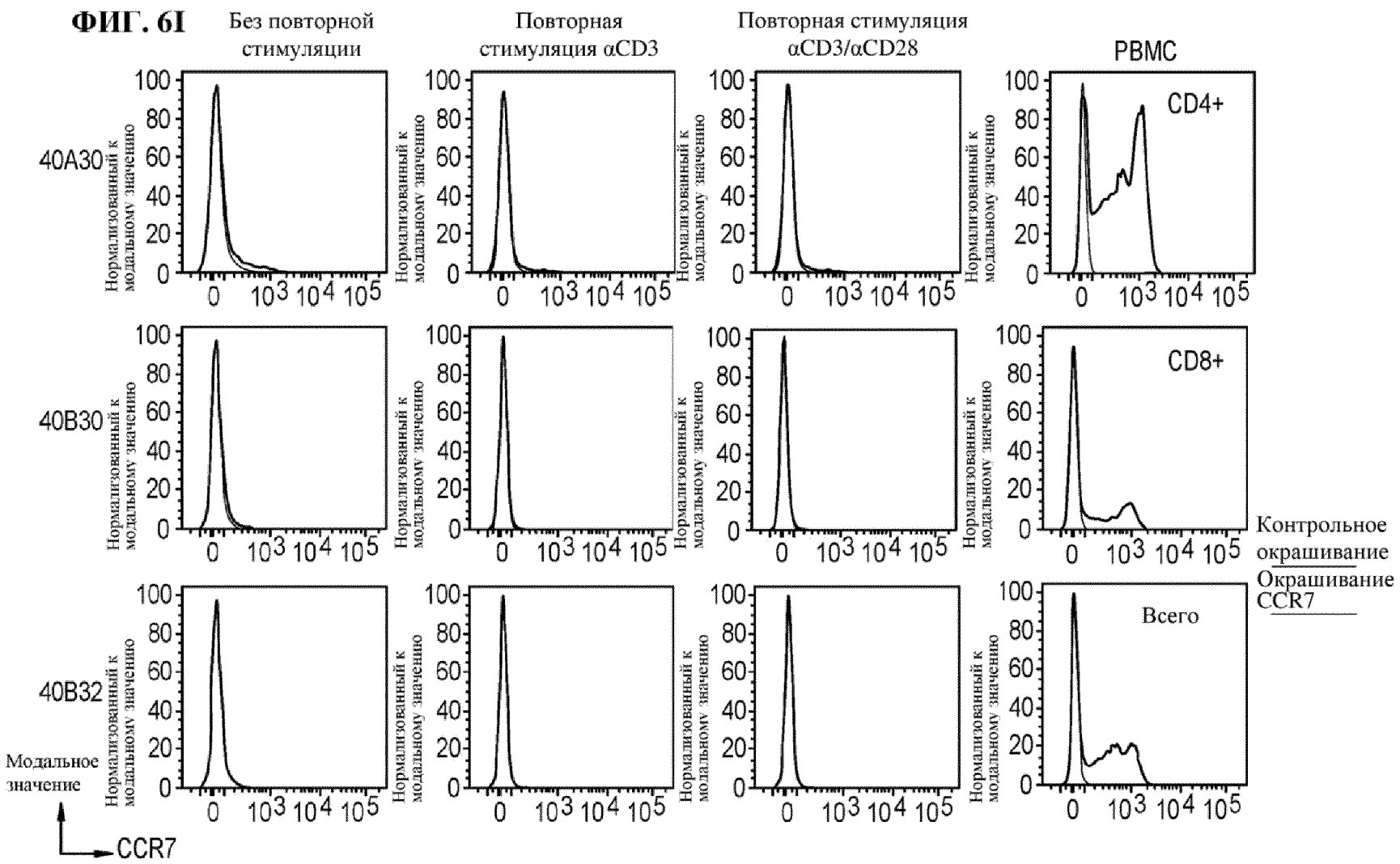
ФИГ. 6G


Без повторной стимуляции
Повторная стимуляция αCD3
Повторная стимуляция αCD3/αCD28
PBMC
40A30
40B30
40B32
CD4+
CD8+
Всего
Нормализованный к модальному значению
Модальное значение
CCR5
Контрольное окрашивание
Окрашивание CCR5

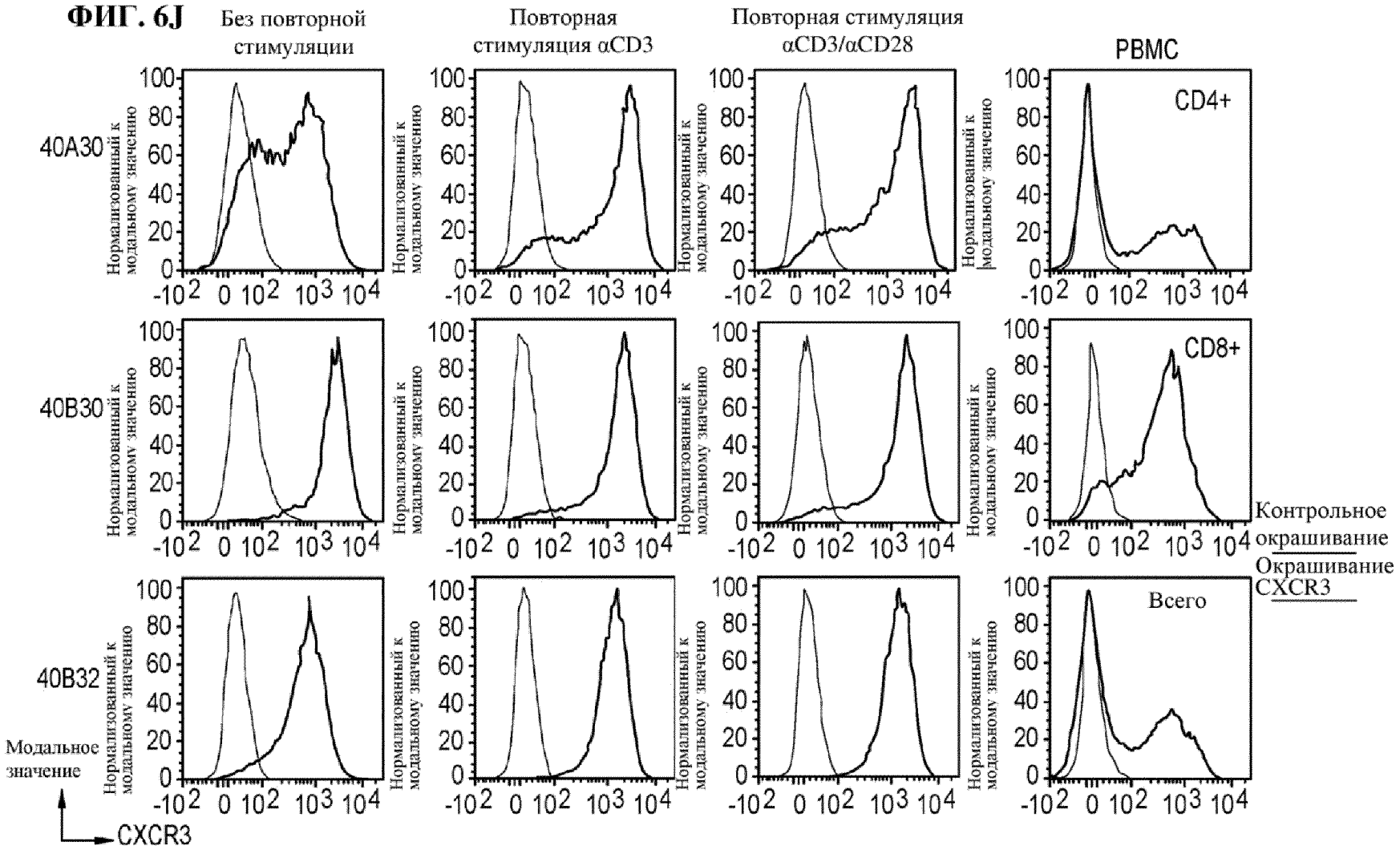
ФИГ. 6H


Без повторной стимуляции
Повторная стимуляция αCD3
Повторная стимуляция αCD3/αCD28
PBMC
CD4+
CD8+
Всего
40A30
40B30
40B32
Нормализованный к модальному значению
Модальное значение
CCR6
Контрольное окрашивание
Окрашивание CCR6

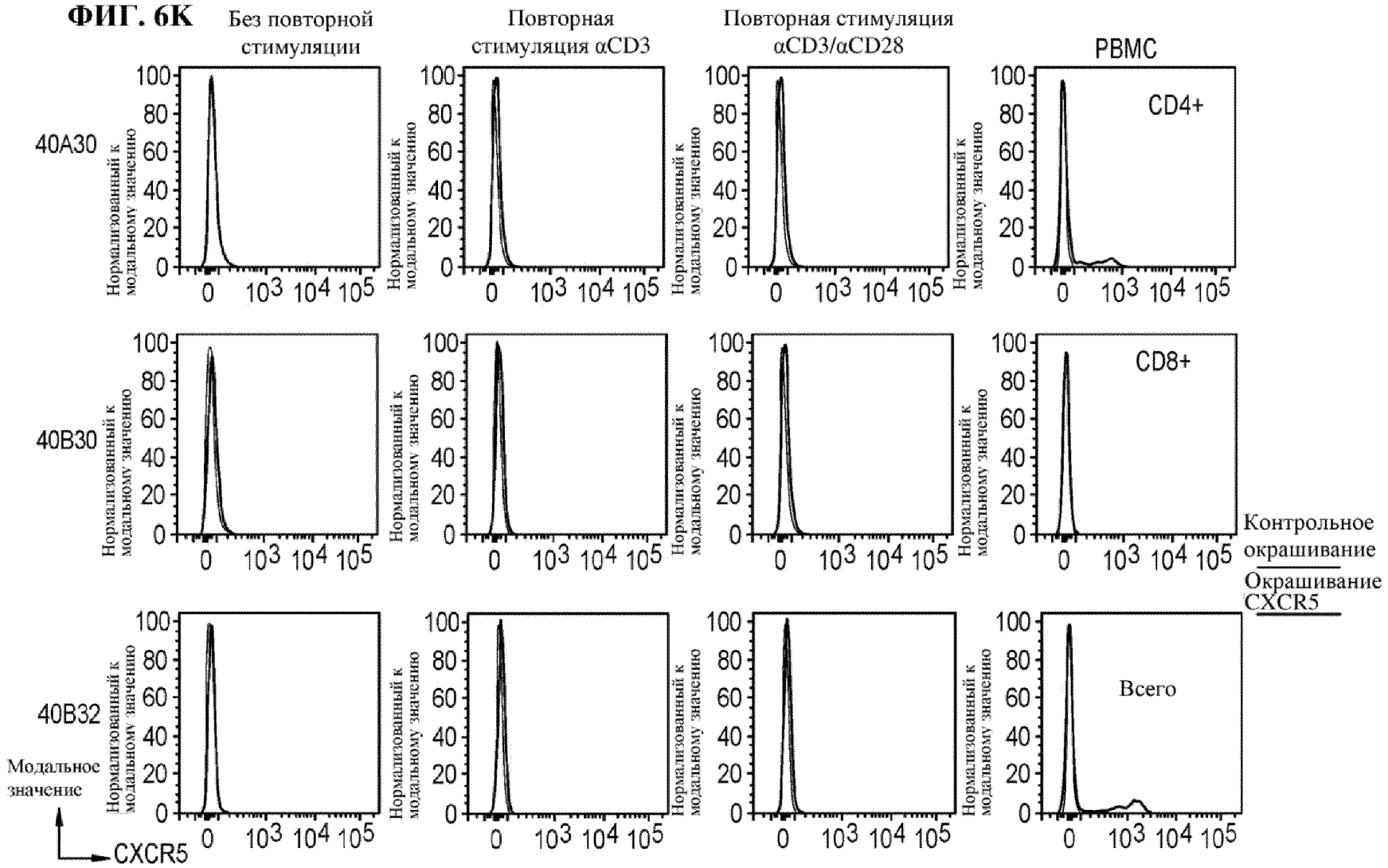
ФИГ. 6I


Без повторной стимуляции
Повторная стимуляция αCD3
Повторная стимуляция αCD3/αCD28
PBMC
40A30
40B30
40B32
CD4+
CD8+
Всего
Нормализованный к модальному значению
Модальное значение
CCR7
Контрольное окрашивание
Окрашивание CCR7

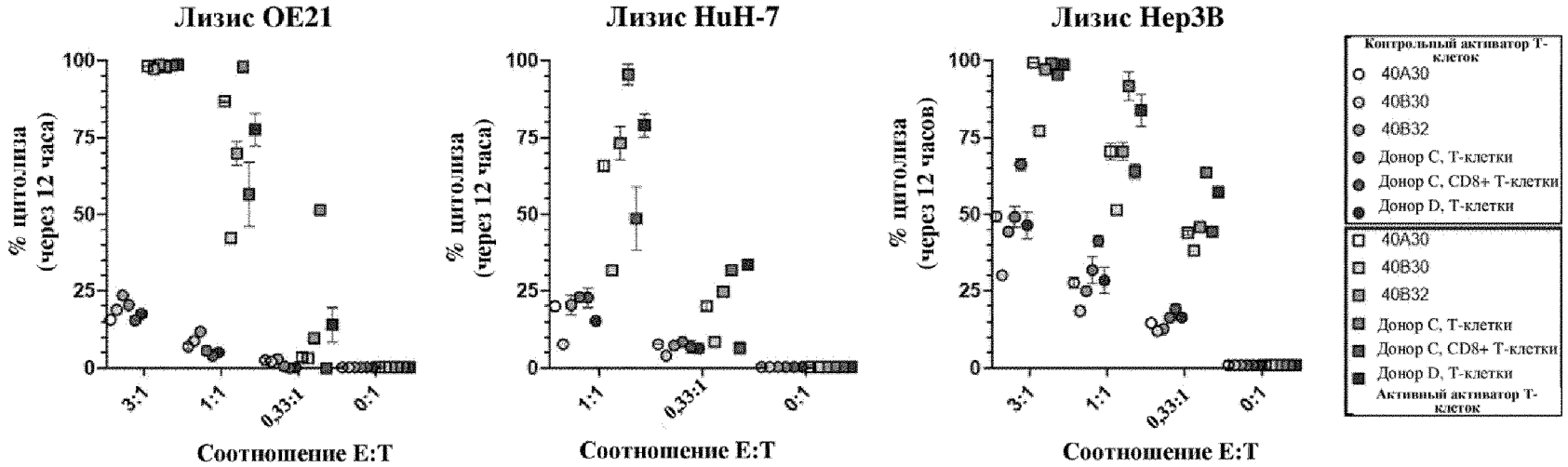
ФИГ. 6J

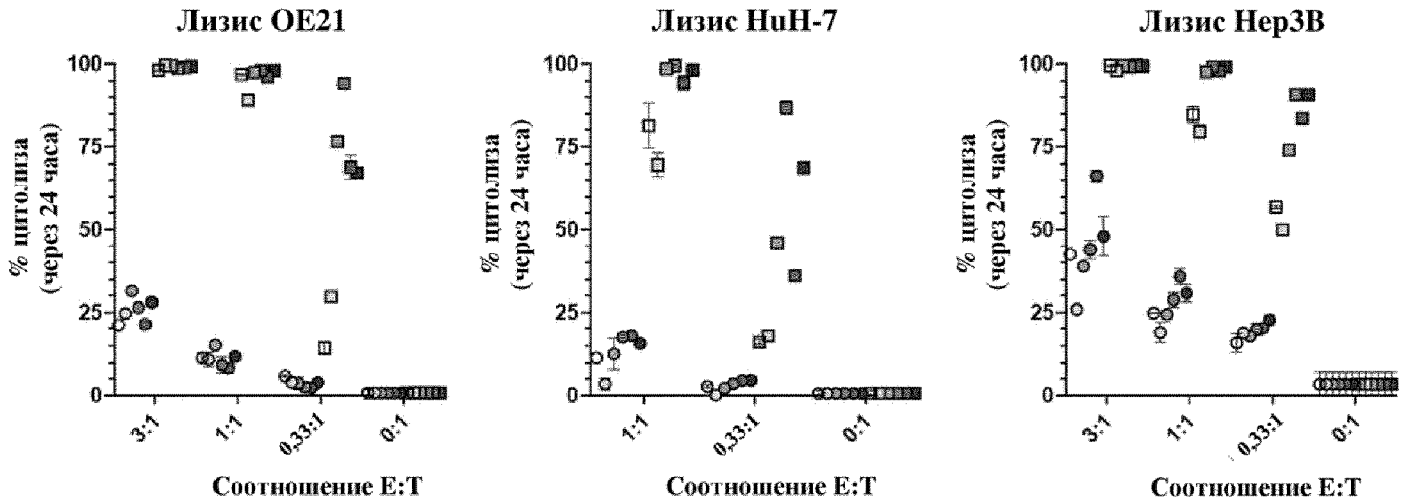

Без повторной стимуляции
Повторная стимуляция αCD3
Повторная стимуляция αCD3/αCD28
PBMC
40A30
40B30
40B32
CD4+
CD8+
Всего
Нормализованный к модальному значению
Модальное значение
CXCR3
Контрольное окрашивание
Окрашивание CXCR3

ФИГ. 6К


Без повторной стимуляции
Повторная стимуляция αCD3
Повторная стимуляция αCD3/αCD28
PBMC
40A30
40B30
40B32
CD4+
CD8+
Всего
Нормализованный к модальному значению
Модальное значение
CXCR5
Контрольное окрашивание
Окрашивание CXCR5

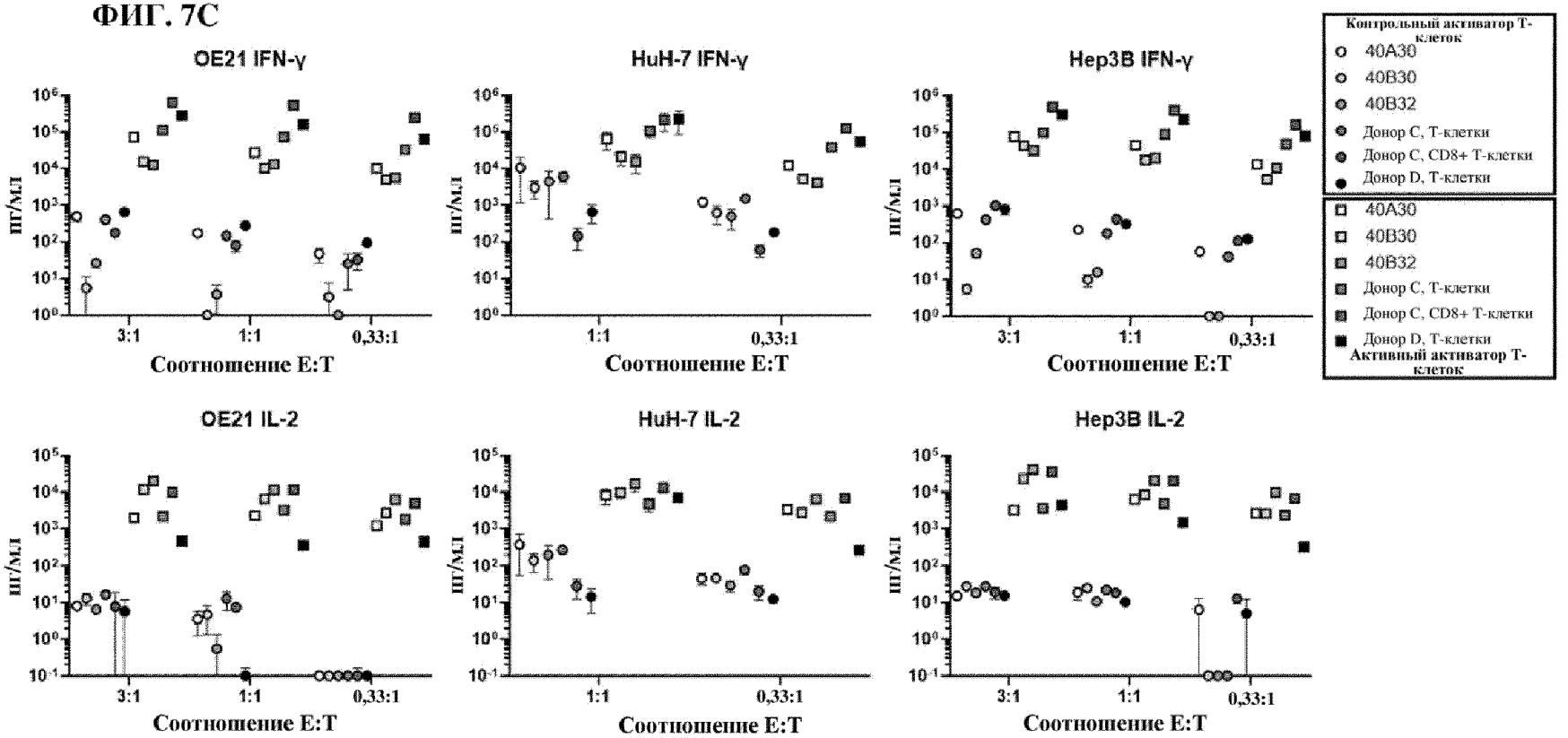
ФИГ. 7A


Лизис OE21
Лизис HuH-7
Лизис Hep3B
% цитолиза (через 12 часа)
% цитолиза (через 12 часов)
100
75
50
25
0
3:1
1:1
0,33:1
0:1
Соотношение E:T
Контрольный активатор Т-клеток
40A30
40B30
40B32
Донор C, Т-клетки
Донор C, CD8+ Т-клетки
Донор D, Т-клетки
Активный активатор Т-клеток


Лизис OE21
Лизис HuH-7
Лизис Hep3B
% цитолиза (через 24 часа)
100
75
50
25
0
3:1
1:1
0,33:1
0:1
Соотношение E:T

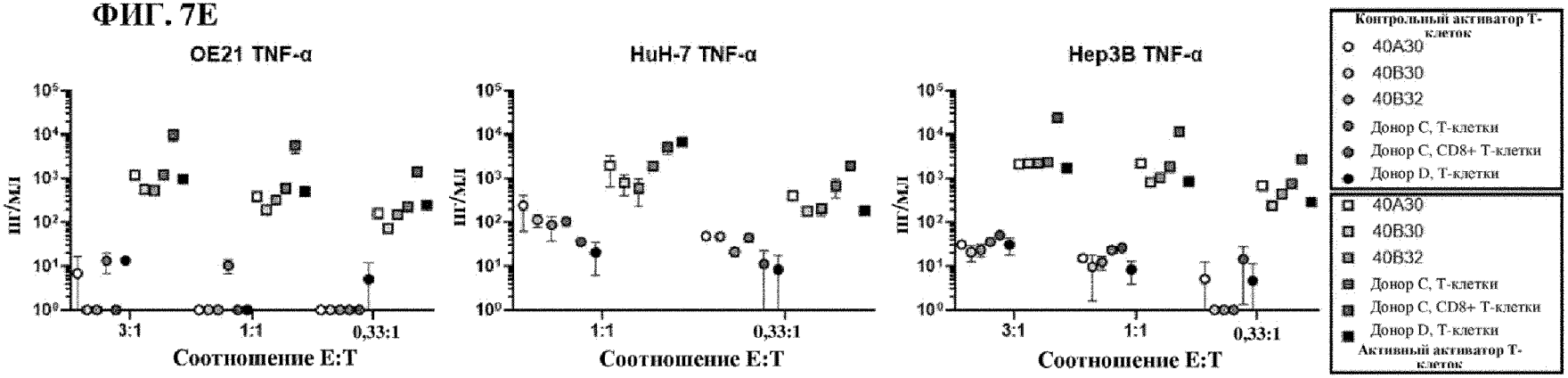
ФИГ. 7B

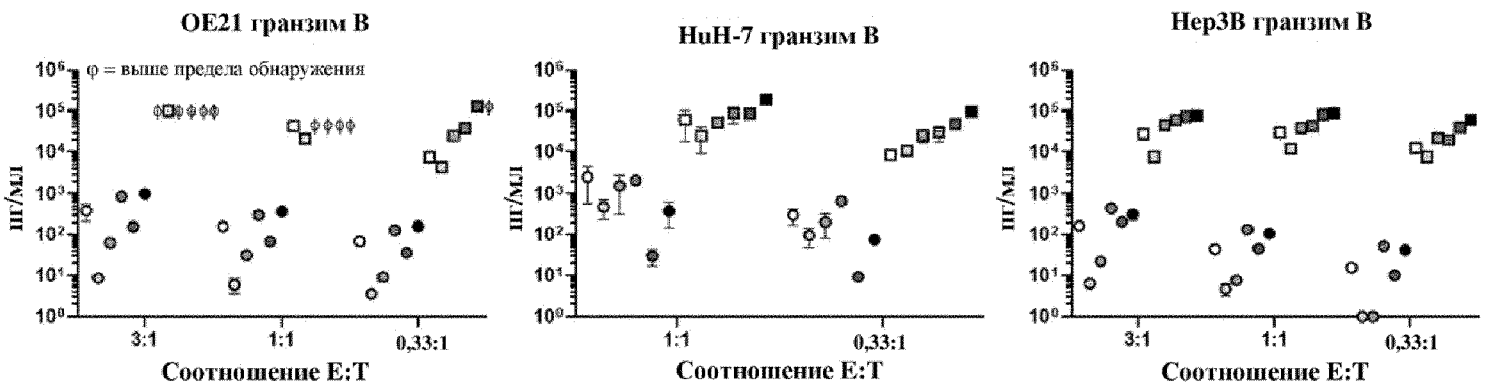
ФИГ. 7C


OE21 IFN-γ
HuH-7 IFN-γ
Hep3B IFN-γ
пг/мл
Соотношение E:T
3:1
1:1
0,33:1
Контрольный активатор Т-клеток
40A30
40B30
40B32
Донор C, Т-клетки
Донор C, CD8+ Т-клетки
Донор D, Т-клетки
Активный активатор Т-клеток
OE21 IL-2
HuH-7 IL-2
Hep3B IL-2

ФИГ. 7D

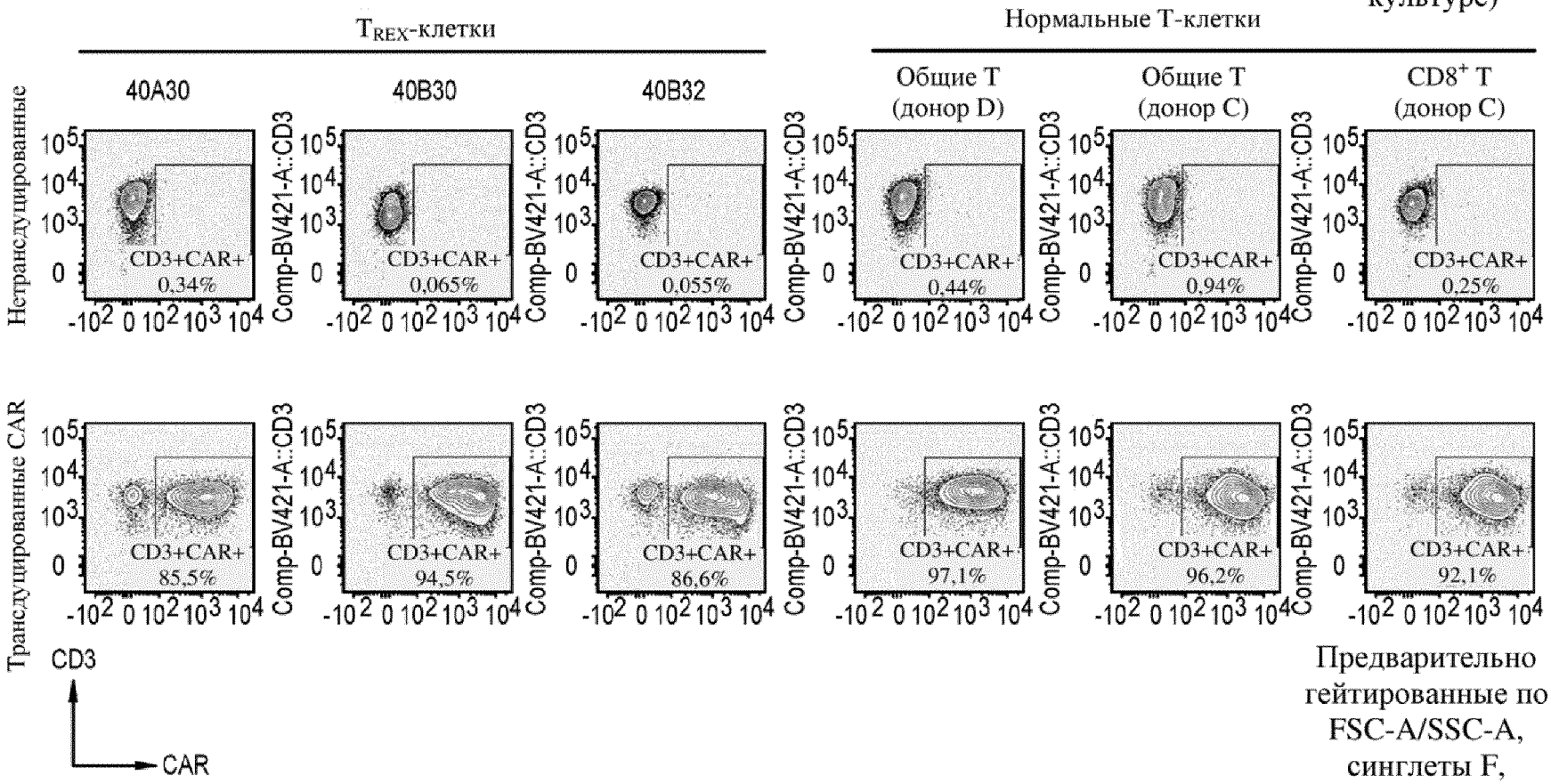
ФИГ. 7E


OE21 TNF-α
HuH-7 TNF-α
Hep3B TNF-α
пг/мл
Соотношение E:T
3:1
1:1
0,33:1
Контрольный активатор Т-клеток
40A30
40B30
40B32
Донор C, Т-клетки
Донор C, CD8+ Т-клетки
Донор D, Т-клетки
Активный активатор Т-клеток

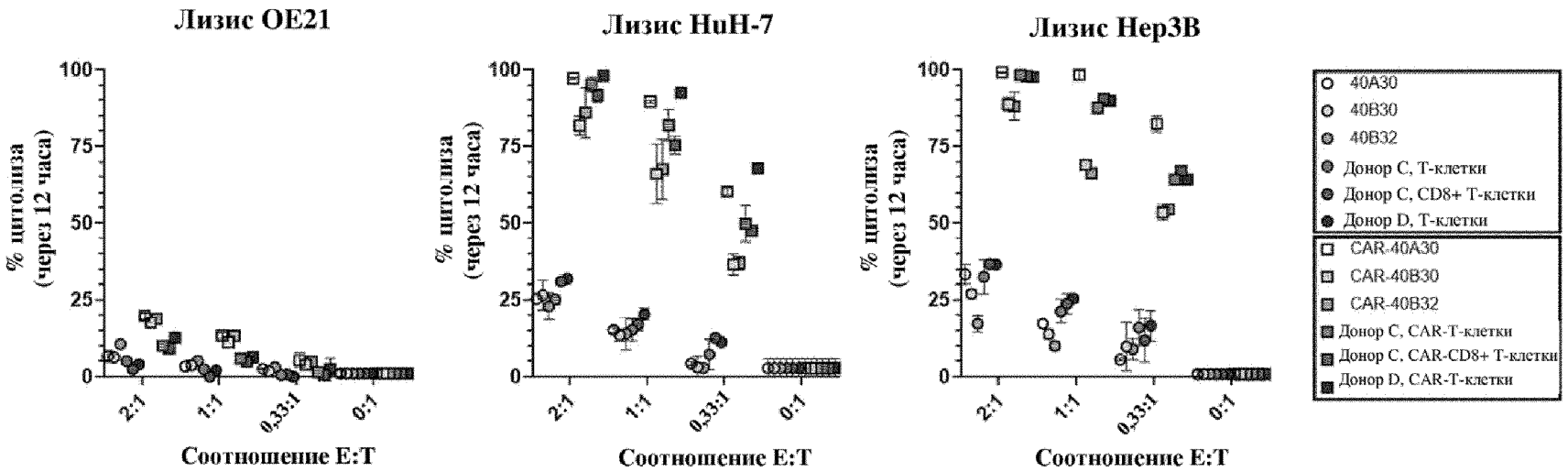

OE21 гранзим B
HuH-7 гранзим B
Hep3B гранзим B
φ = выше предела обнаружения
пг/мл
Соотношение E:T
3:1
1:1
0,33:1

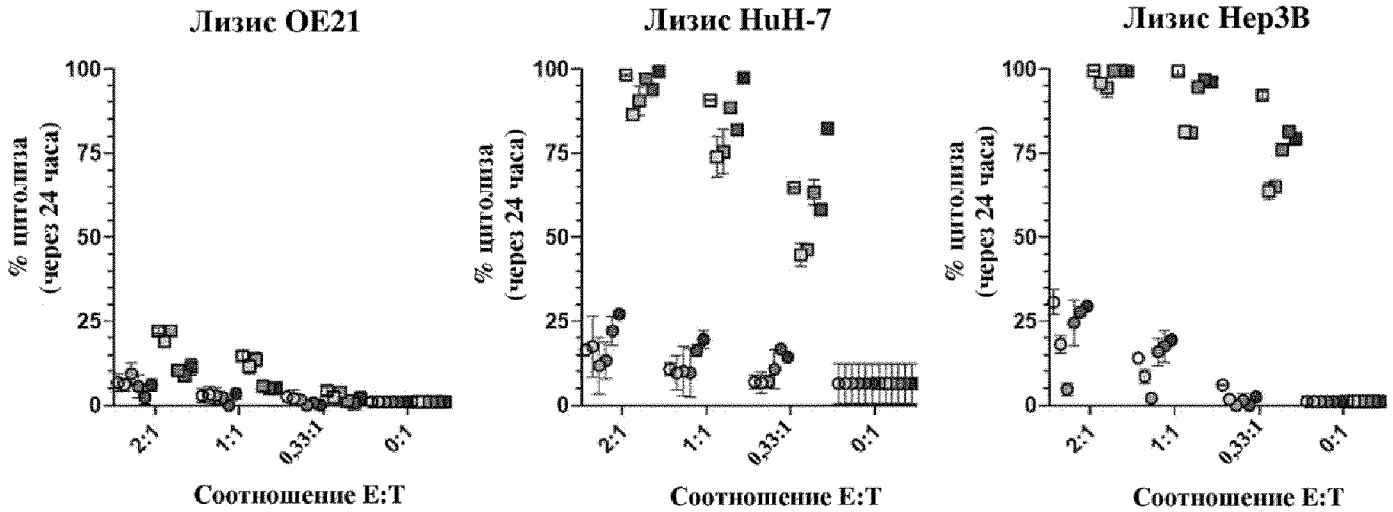
ФИГ. 7F

ФИГ. 8А


День 22 после трансдукции (день 87 в культуре)
TREX-клетки
Нормальные Т-клетки
40A30
40B30
40B32
Общие Т (донор D)
Общие Т (донор C)
CD8+ Т (донор C)
Нетрансдуцированные
Трансдуцированные CAR
Comp-BV421-A::CD3
CD3+CAR+ 0,34%
CD3+CAR+ 0,065%
CD3+CAR+ 0,055%
CD3+CAR+ 0,44%
CD3+CAR+ 0,94%
CD3+CAR+ 0,25%
CD3+CAR+ 85,5%
CD3+CAR+ 94,5%
CD3+CAR+ 86,6%
CD3+CAR+ 97,1%
CD3+CAR+ 96,2%
CD3+CAR+ 92,1%
CD3
CAR
Предварительно гейтированные по FSC-A/SSC-A, синглеты F, синглеты S, живые

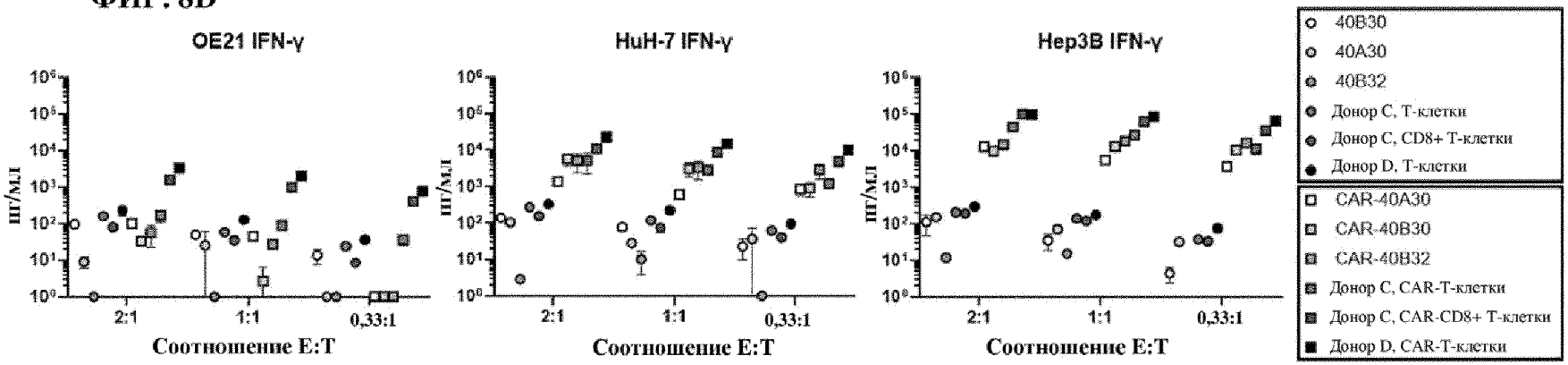
ФИГ. 8B

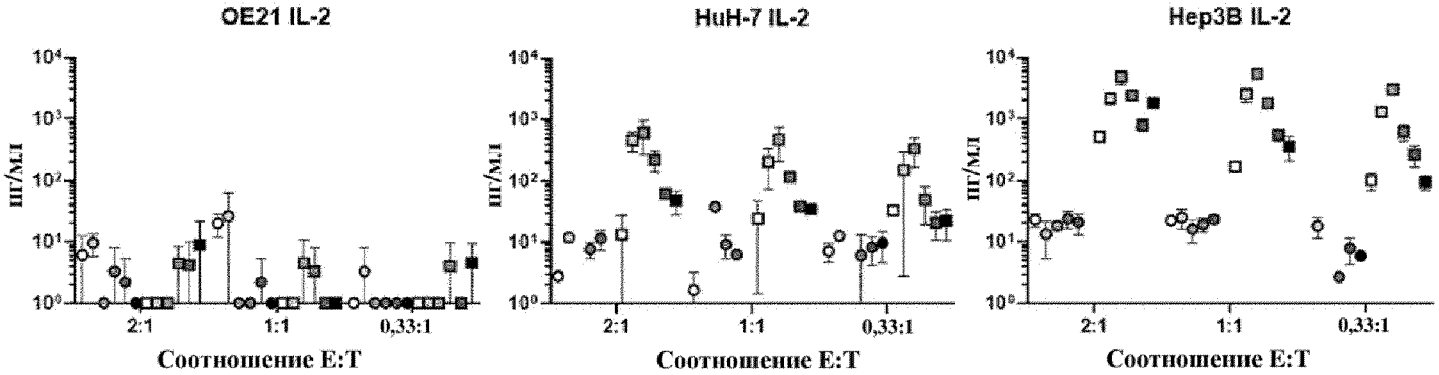

Лизис OE21
Лизис HuH-7
Лизис Hep3B
% цитолиза (через 12 часа)
100
75
50
25
0
2:1
1:1
0,33:1
0:1
Соотношение E:T
40A30
40B30
40B32
Донор C, T-клетки
Донор C, CD8+ T-клетки
Донор D, T-клетки
CAR-40A30
CAR-40B30
CAR-40B32
Донор C, CAR-T-клетки
Донор C, CAR-CD8+ T-клетки
Донор D, CAR-T-клетки


Лизис OE21
Лизис HuH-7
Лизис Hep3B
% цитолиза (через 24 часа)
100
75
50
25
0
2:1
1:1
0,33:1
0:1
Соотношение E:T

ФИГ. 8C

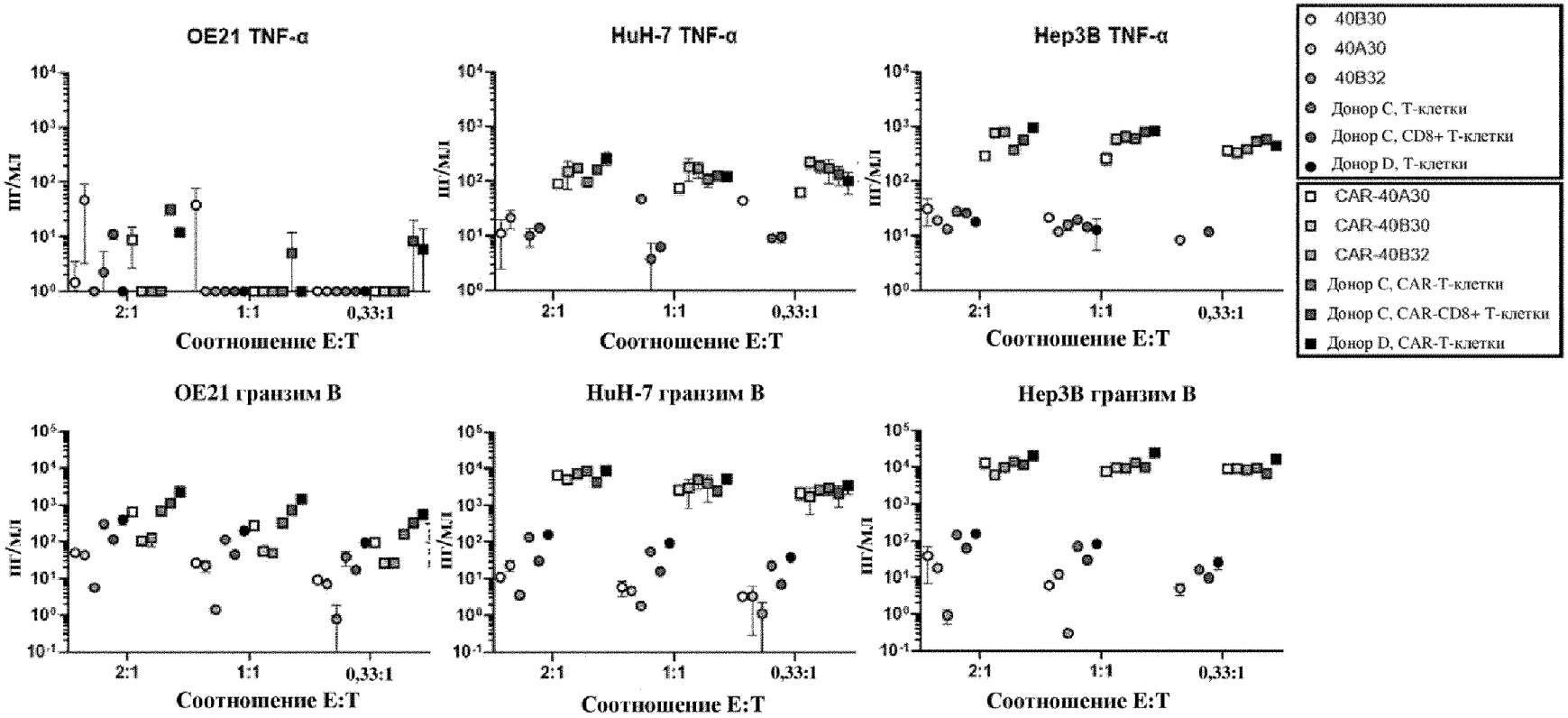
ФИГ. 8D


OE21 IFN-γ
HuH-7 IFN-γ
Hep3B IFN-γ
пг/мл
Соотношение E:T
2:1
1:1
0,33:1
40B30
40A30
40B32
Донор C, T-клетки
Донор C, CD8+ T-клетки
Донор D, T-клетки
CAR-40A30
CAR-40B30
CAR-40B32
Донор C, CAR-T-клетки
Донор C, CAR-CD8+ T-клетки
Донор D, CAR-T-клетки

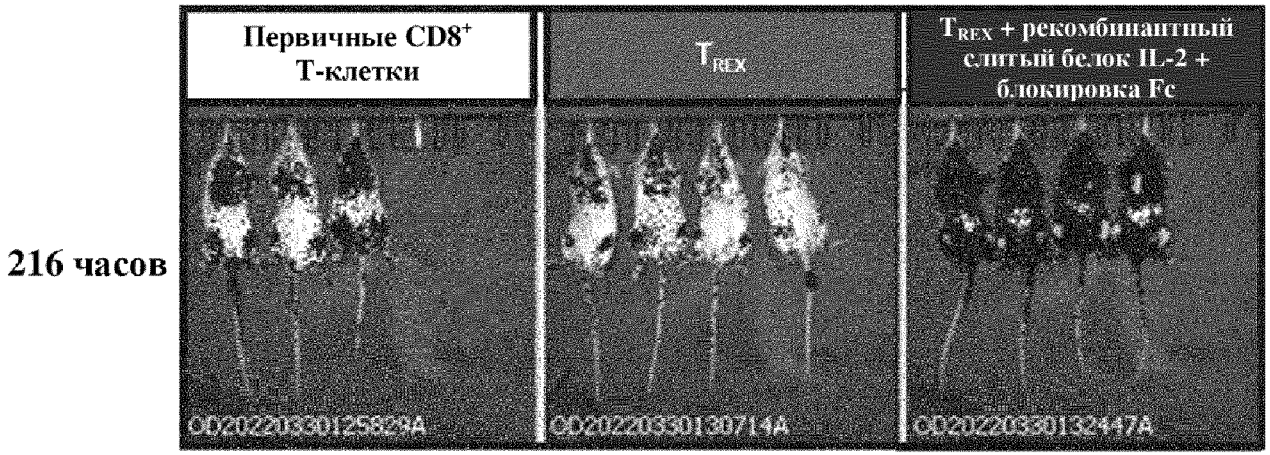

OE21 IL-2
HuH-7 IL-2
Hep3B IL-2
пг/мл
Соотношение E:T
2:1
1:1
0,33:1

ФИГ. 8E

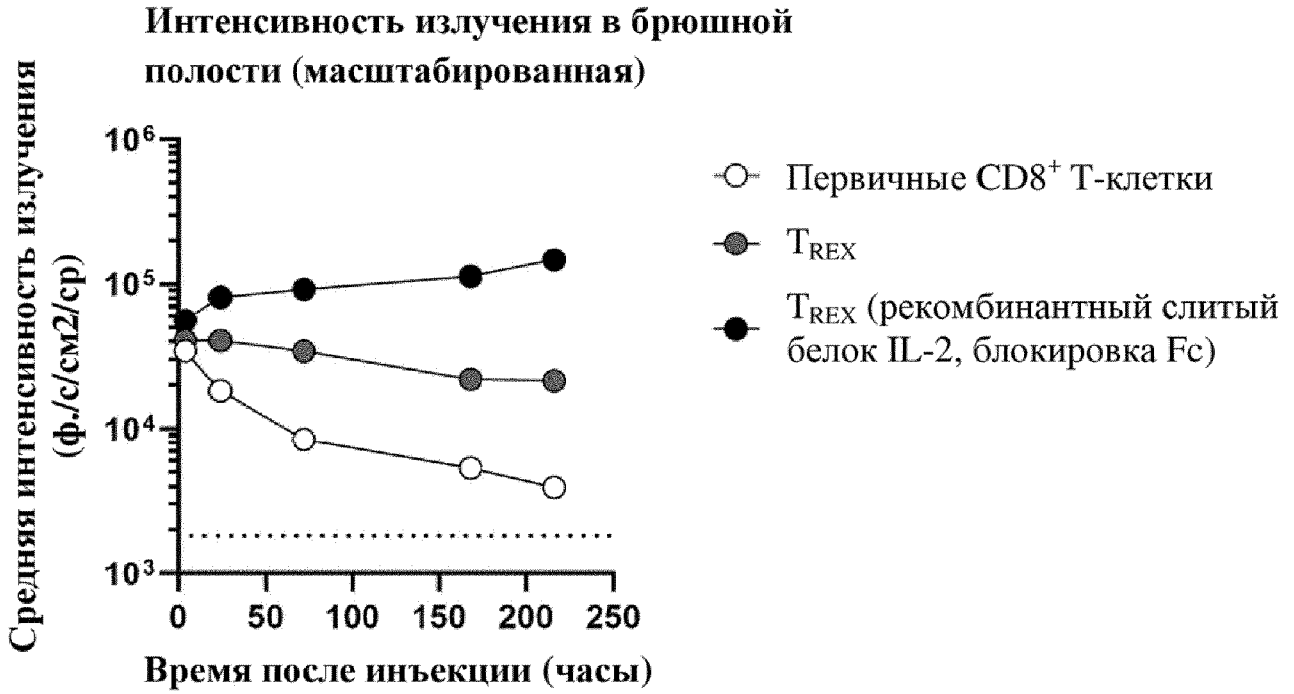
ФИГ. 8F


OE21 TNF-α
HuH-7 TNF-α
Hep3B TNF-α
пг/мл
Соотношение E:T
2:1
1:1
0,33:1
40B30
40A30
40B32
Донор C, T-клетки
Донор C, CD8+ T-клетки
Донор D, T-клетки
CAR-40A30
CAR-40B30
CAR-40B32
Донор C, CAR-T-клетки
Донор C, CAR-CD8+ T-клетки
Донор D, CAR-T-клетки
OE21 гранзим B
HuH-7 гранзим B
Hep3B гранзим B

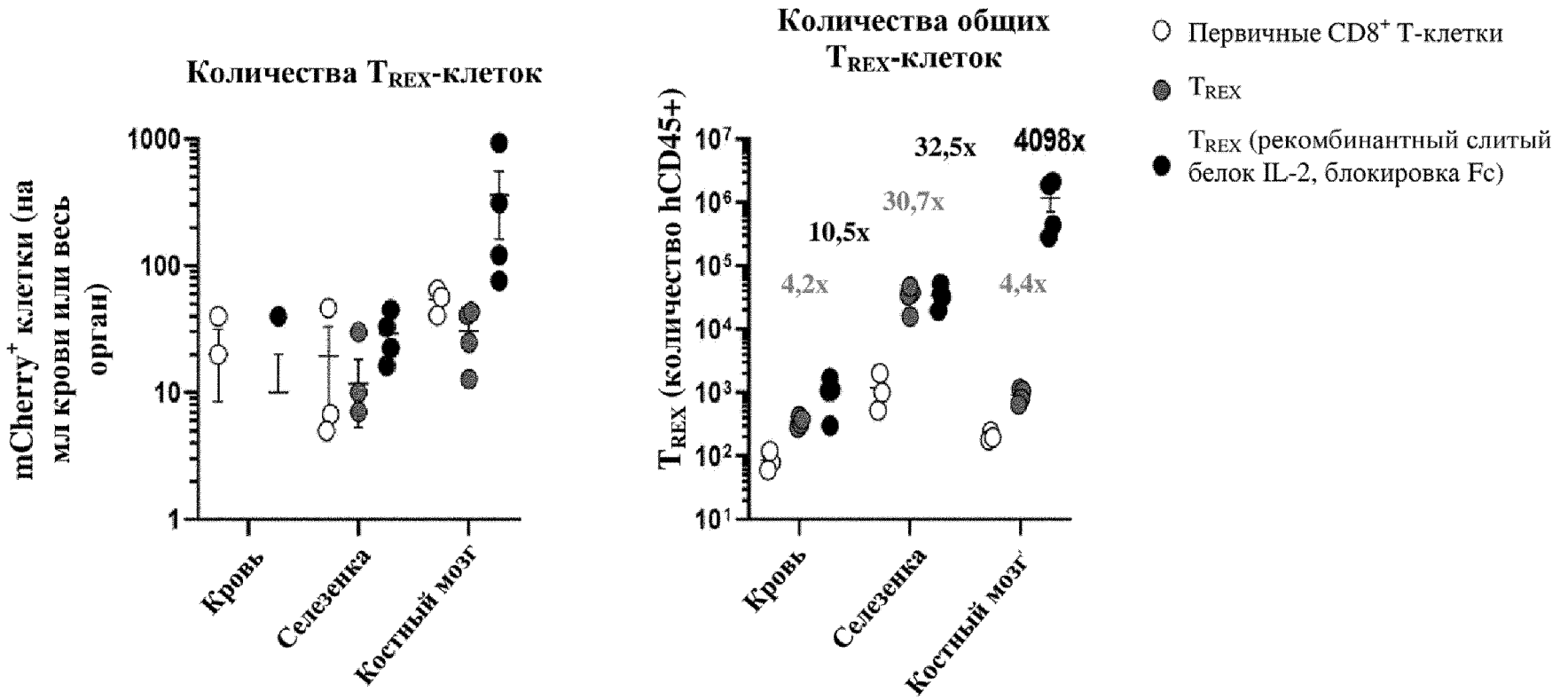
ФИГ. 8G


216 часов
Первичные CD8+ Т-клетки
TREX
TREX + рекомбинантный слитый белок IL-2 + блокировка Fc
OD20220330125829A
OD20220330130714A
OD20220330132447A

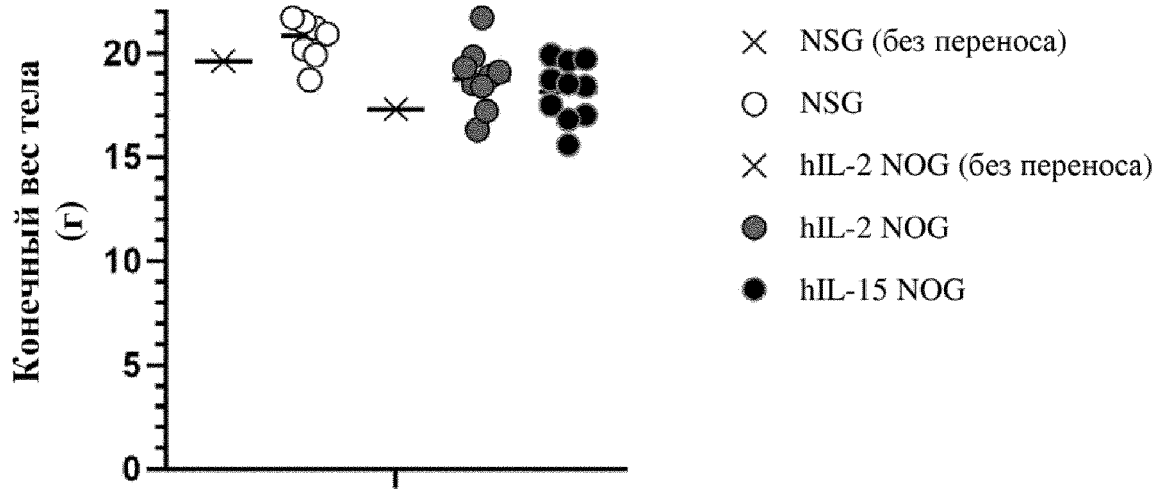
ФИГ. 9A


Интенсивность излучения в брюшной полости (масштабированная)
Средняя интенсивность излучения (ф./с/см2/ср)
10^6
10^5
10^4
10^3
0
50
100
150
200
250
Время после инъекции (часы)
Первичные CD8+ Т-клетки
TREX
TREX (рекомбинантный слитый белок IL-2, блокировка Fc)

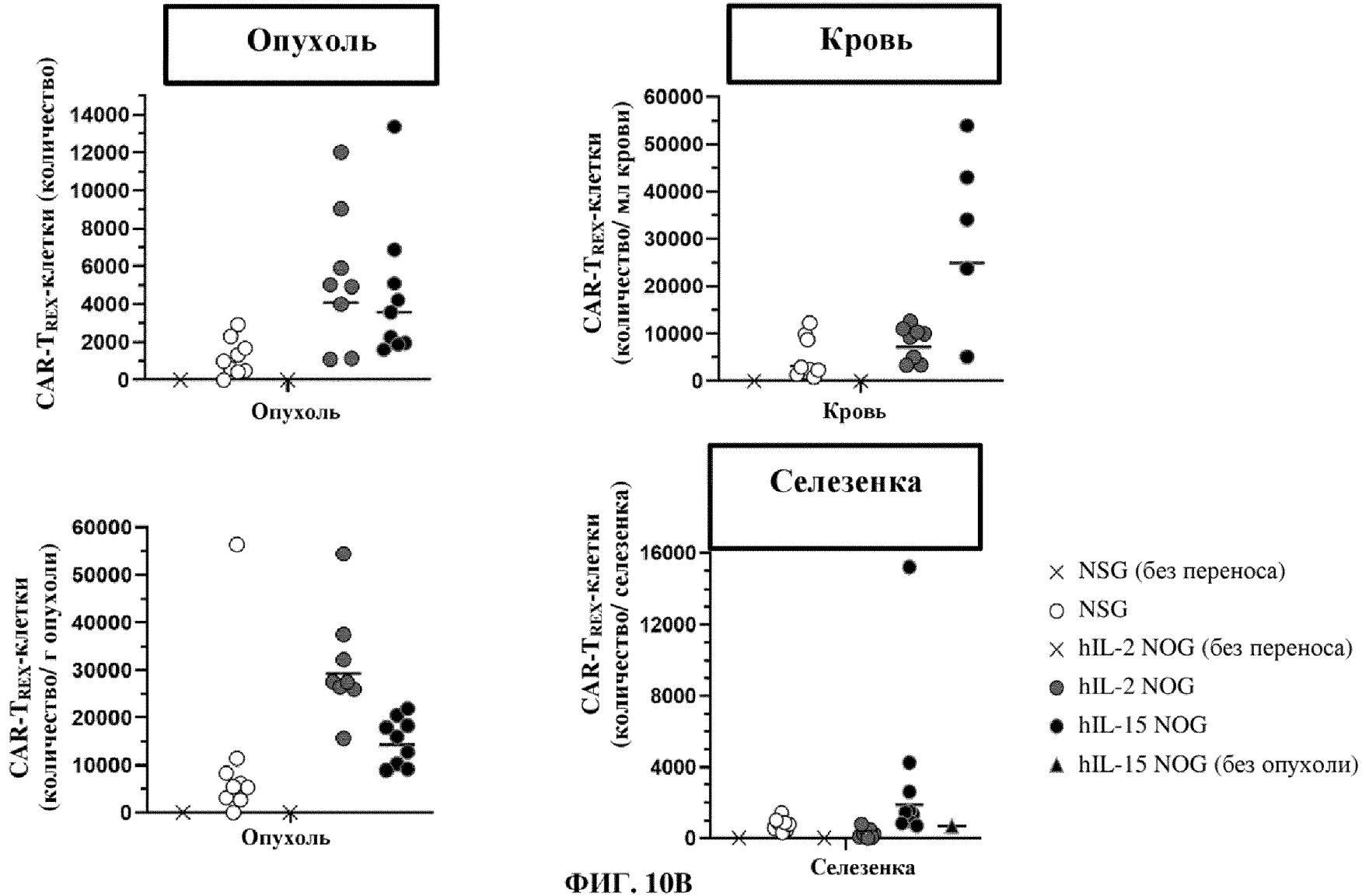
ФИГ. 9В


Количества T_{REX}-клеток
mCherry+ клетки (на мл крови или весь орган)
1000
100
10
1
Кровь
Селезенка
Костный мозг
Количества общих T_{REX}-клеток
T_{REX} (количество hCD45+)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
4,2x
10,5x
30,7x
32,5x
4,4x
4098x
Кровь
Селезенка
Костный мозг
Первичные CD8+ Т-клетки
T_{REX}
T_{REX} (рекомбинантный слитый белок IL-2, блокировка Fc)

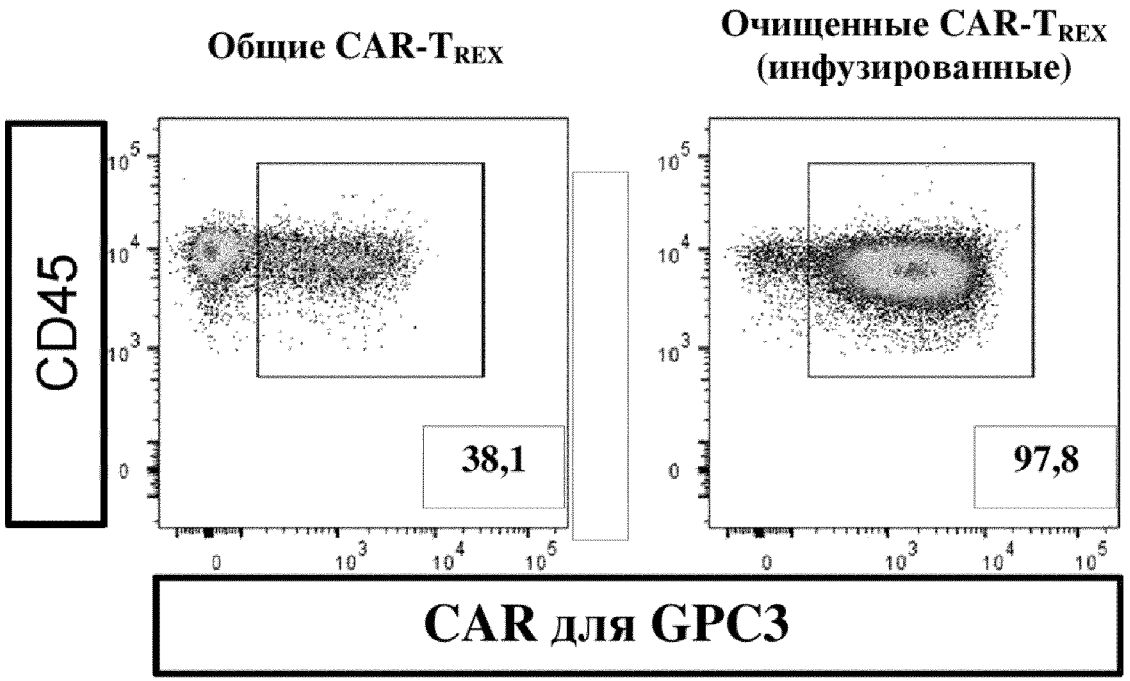
ФИГ. 9С


Конечный вес тела (г)
20
15
10
5
0
NSG (без переноса)
NSG
hIL-2 NOG (без переноса)
hIL-2 NOG
hIL-15 NOG

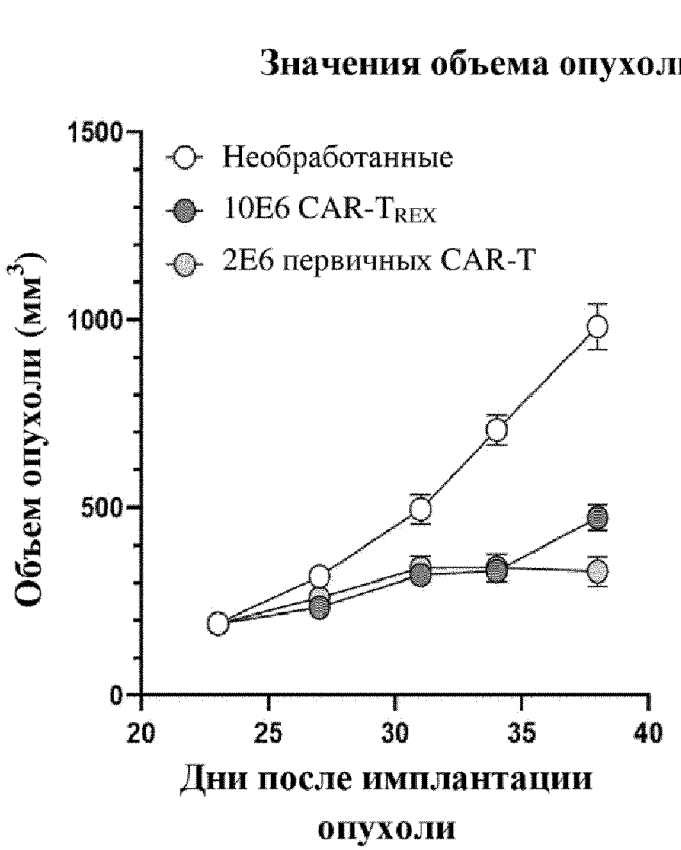
ФИГ. 10A

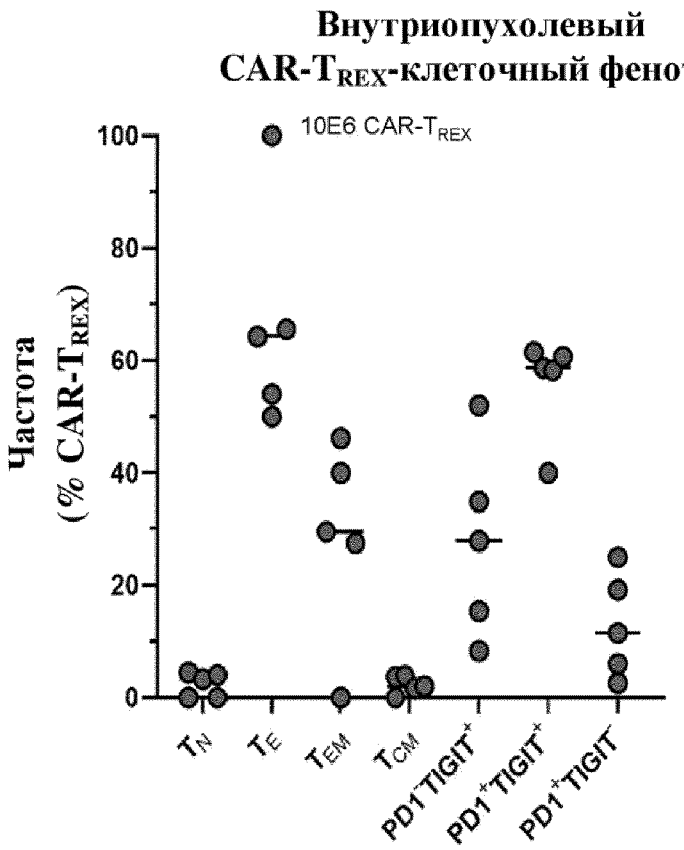

Опухоль
CAR-TREX-клетки (количество)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Опухоль
Кровь
CAR-TREX-клетки (количество/ мл крови)
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Кровь
CAR-TREX-клетки (количество/ г опухоли)
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Опухоль
Селезенка
CAR-TREX-клетки (количество/ селезенка)
16000
12000
8000
4000
0
Селезенка
NSG (без переноса)
NSG
hIL-2 NOG (без переноса)
hIL-2 NOG
hIL-15 NOG
hIL-15 NOG (без опухоли)

ФИГ. 10В

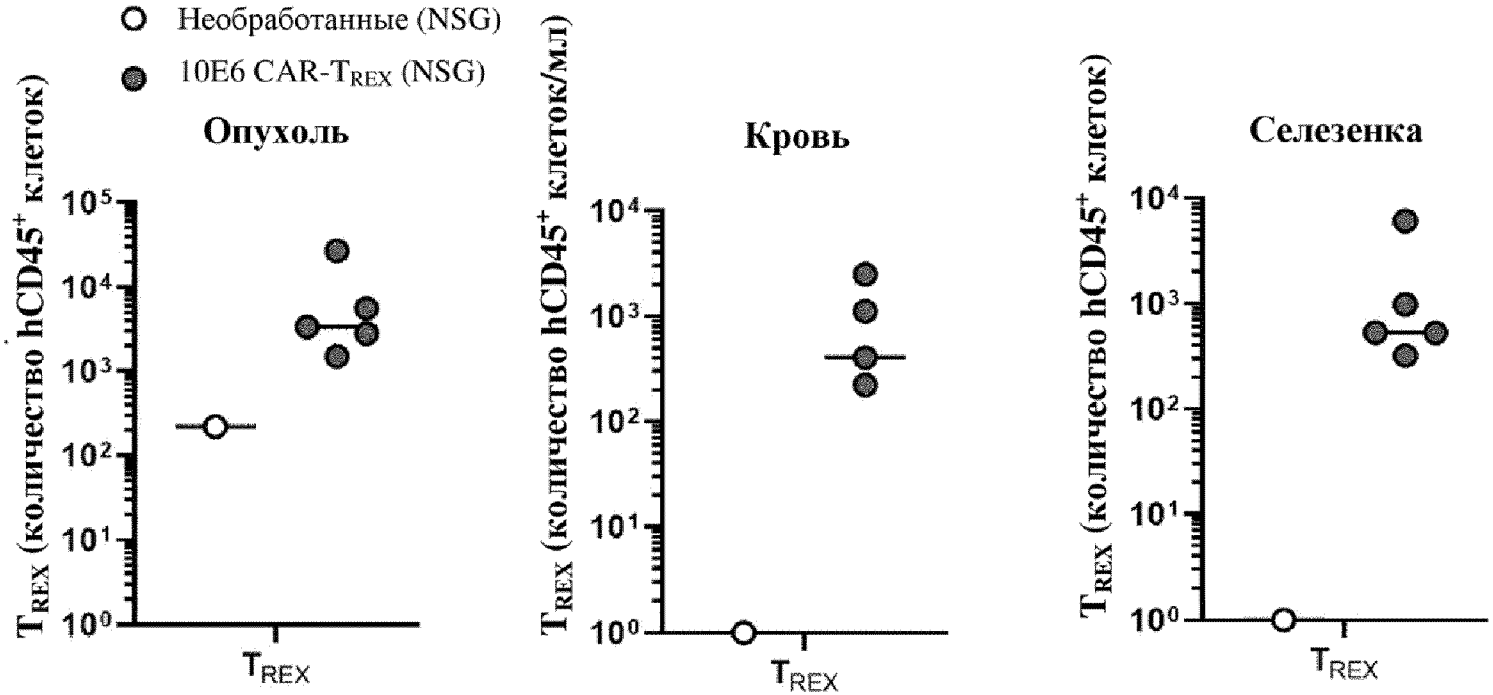

Общие CAR-T$_{REX}$
Очищенные CAR-T$_{REX}$ (инфузированные)
CD45
38,1
97,8
CAR для GPC3

ФИГ. 11A

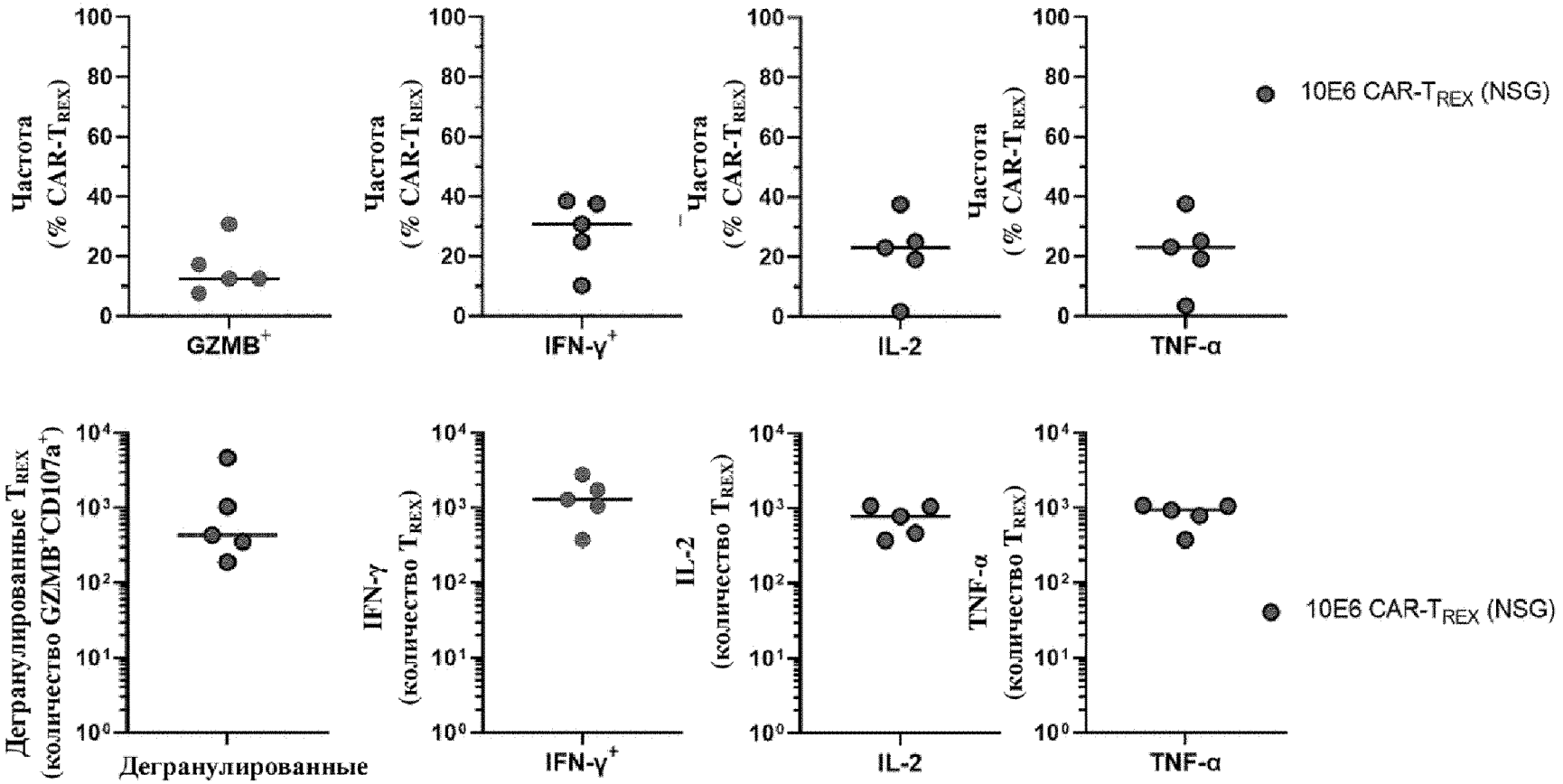

Значения объема опухоли
Необработанные
10E6 CAR-TREX
2E6 первичных CAR-T
Объем опухоли (мм3)
1500
1000
500
0
20
25
30
35
40
Дни после имплантации опухоли


Внутриопухолевый CAR-TREX-клеточный фенотип
10E6 CAR-TREX
Частота (% CAR-TREX)
100
80
60
40
20
0
TN
TE
TEM
TCM
PD1+TIGIT+
PD1+TIGIT+
PD1+TIGIT-

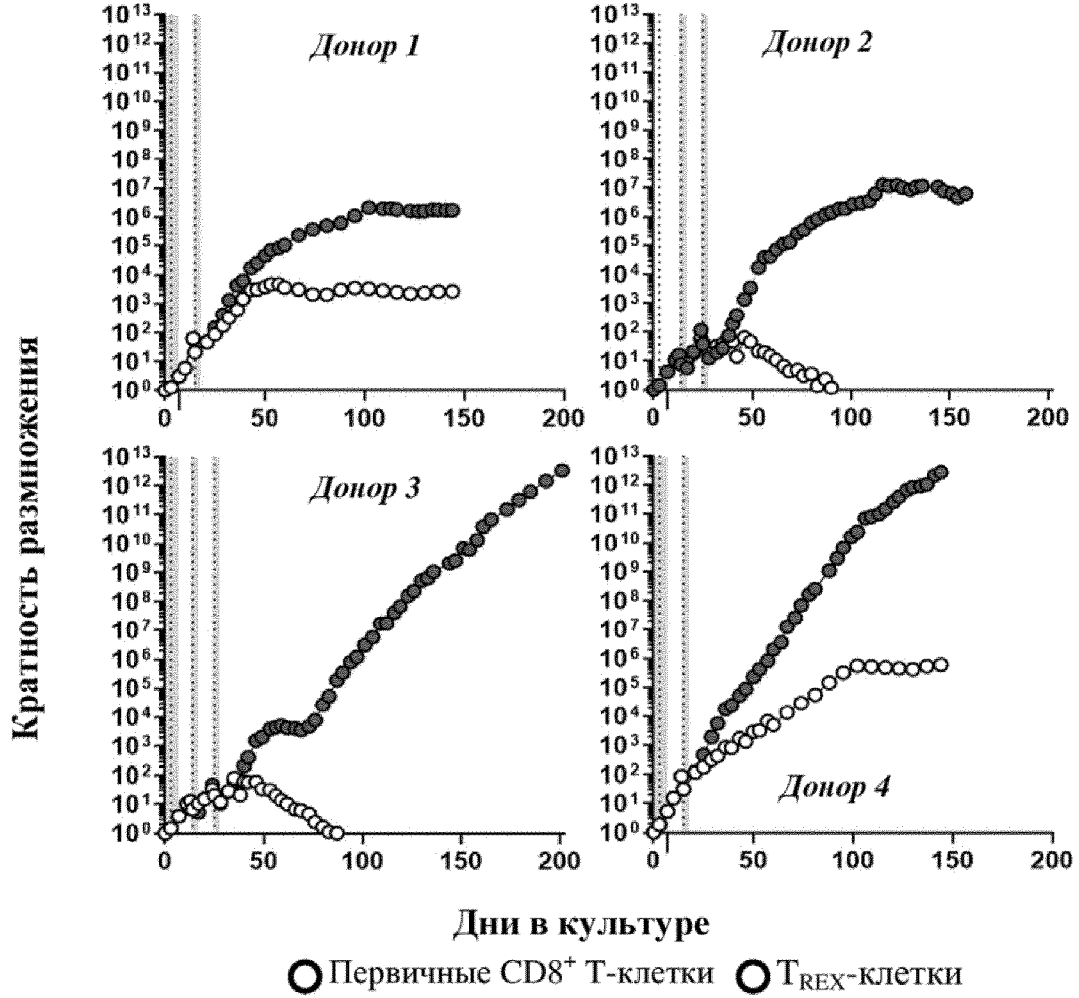
ФИГ. 11B


Необработанные (NSG)
10E6 CAR-TREX (NSG)
Опухоль
Кровь
Селезенка
TREX (количество hCD45+ клеток)
TREX (количество hCD45+ клеток/мл)
TREX (количество hCD45+ клеток)
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
TREX

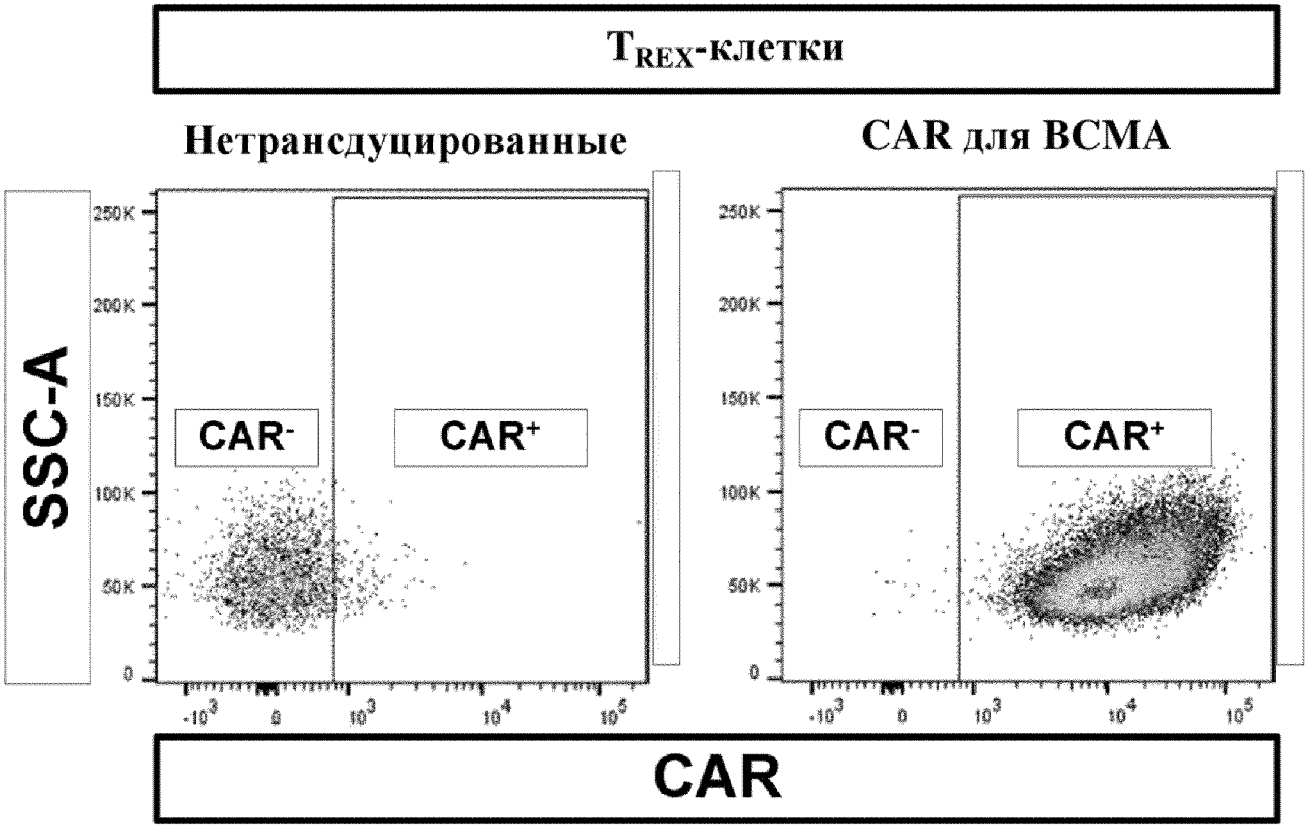
ФИГ. 11С


Частота (% CAR-T$_{REX}$)
GZMB$^+$
IFN-γ$^+$
IL-2
TNF-α
10E6 CAR-T$_{REX}$ (NSG)
Дегранулированные T$_{REX}$ (количество GZMB$^+$CD107a$^+$)
Дегранулированные
IFN-γ (количество T$_{REX}$)
IL-2 (количество T$_{REX}$)
TNF-α (количество T$_{REX}$)

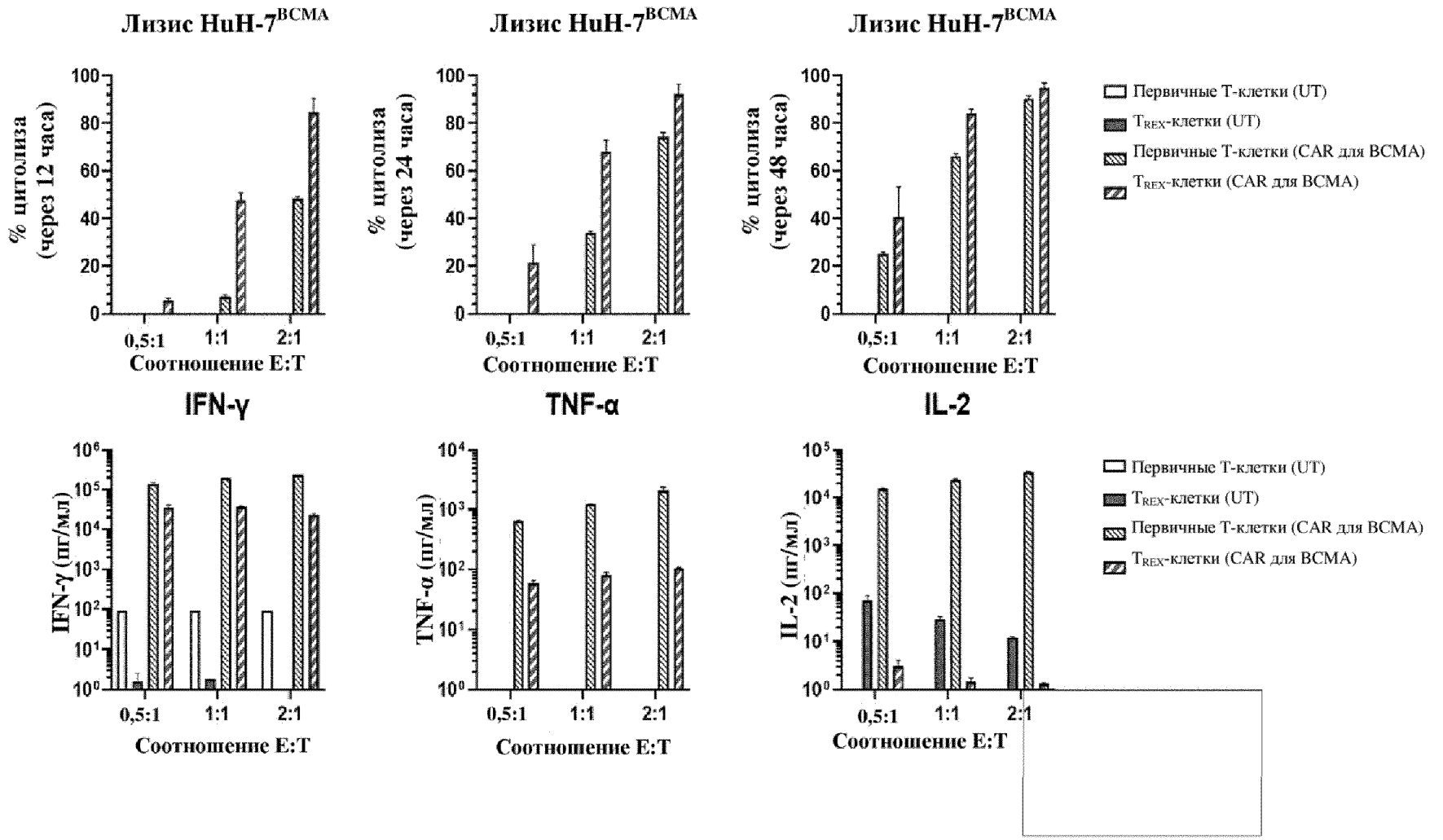
ФИГ. 11D


Кратность размножения
Донор 1
Донор 2
Донор 3
Донор 4
Дни в культуре
Первичные CD8+ Т-клетки
TREX-клетки

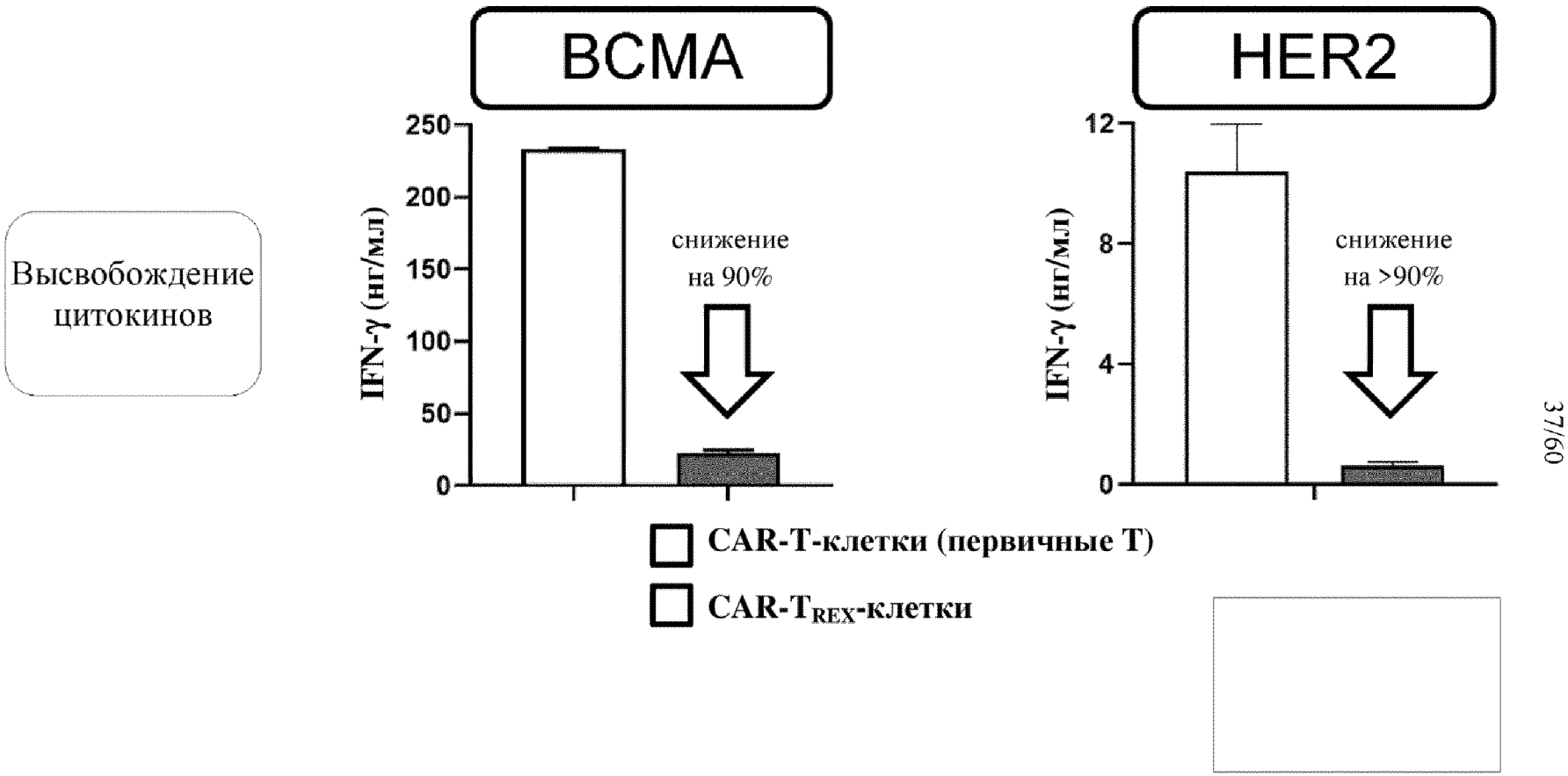
ФИГ. 12


T REX-клетки
Нетрансдуцированные
CAR для BCMA
SSC-A
250K
200K
150K
100K
50K
0
CAR-
CAR+
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
CAR

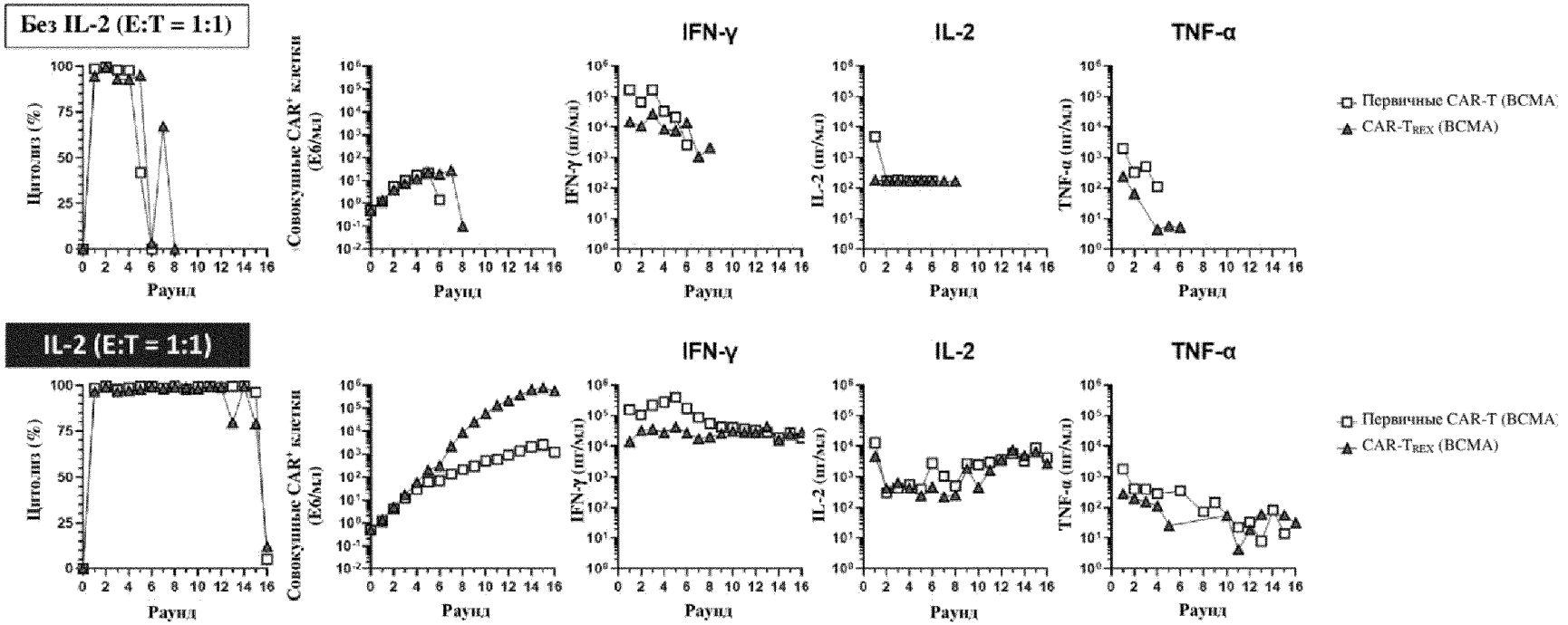
ФИГ. 13А


Лизис HuH-7BCMA
% цитолиза (через 12 часа)
Соотношение E:T
0,5:1
1:1
2:1
Лизис HuH-7BCMA
% цитолиза (через 24 часа)
Соотношение E:T
Лизис HuH-7BCMA
% цитолиза (через 48 часа)
Соотношение E:T
Первичные Т-клетки (UT)
TREX-клетки (UT)
Первичные Т-клетки (CAR для BCMA)
TREX-клетки (CAR для BCMA)
IFN-γ
IFN-γ (пг/мл)
Соотношение E:T
TNF-α
TNF-α (пг/мл)
Соотношение E:T
IL-2
IL-2 (пг/мл)
Соотношение E:T

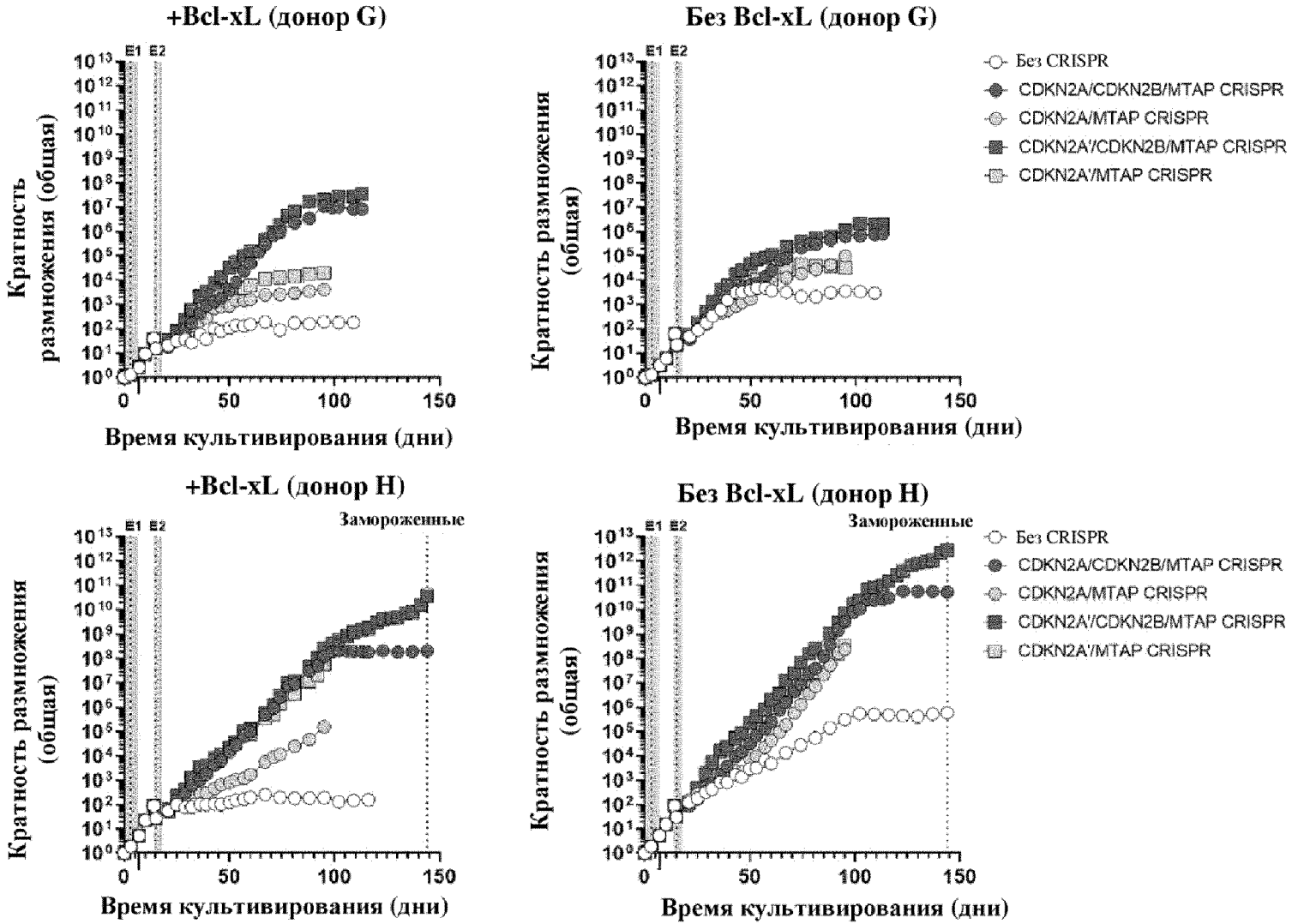
ФИГ. 13В


Высвобождение цитокинов
BCMA
HER2
IFN-γ (нг/мл)
250
200
150
100
50
0
снижение на 90%
12
8
4
0
снижение на >90%
CAR-T-клетки (первичные T)
CAR-TREX-клетки

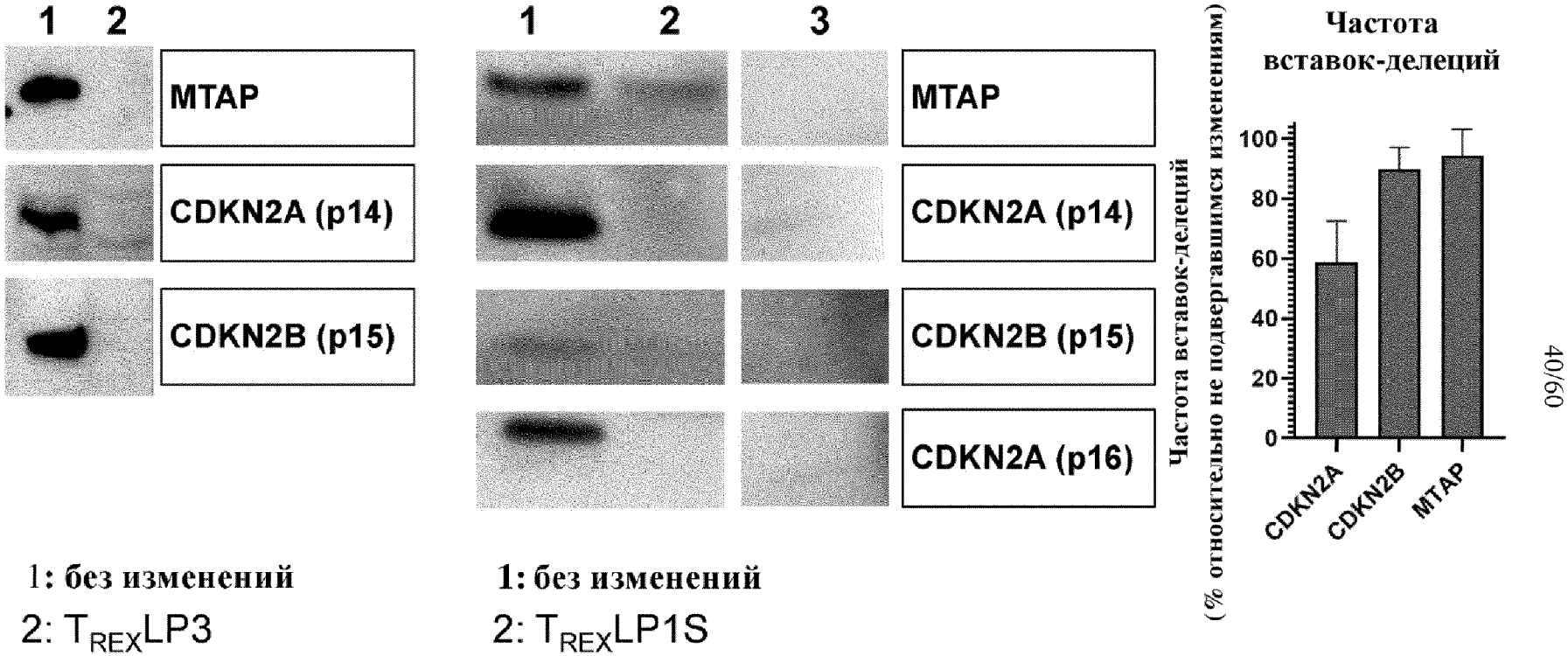
ФИГ. 14


Без IL-2 (E:T = 1:1)
IL-2 (E:T = 1:1)
Цитолиз (%)
Совокупные CAR+ клетки (Е6/мл)
IFN-γ
IL-2
TNF-α
IFN-γ (пг/мл)
IL-2 (пг/мл)
TNF-α (пг/мл)
Раунд
Первичные CAR-T (BCMA)
CAR-TREX (BCMA)

ФИГ. 15


+Bcl-xL (донор G)
Без Bcl-xL (донор G)
+Bcl-xL (донор H)
Без Bcl-xL (донор H)
Кратность размножения (общая)
Время культивирования (дни)
E1
E2
Замороженные
Без CRISPR
CDKN2A/CDKN2B/MTAP CRISPR
CDKN2A/MTAP CRISPR
CDKN2A'/CDKN2B/MTAP CRISPR
CDKN2A'/MTAP CRISPR

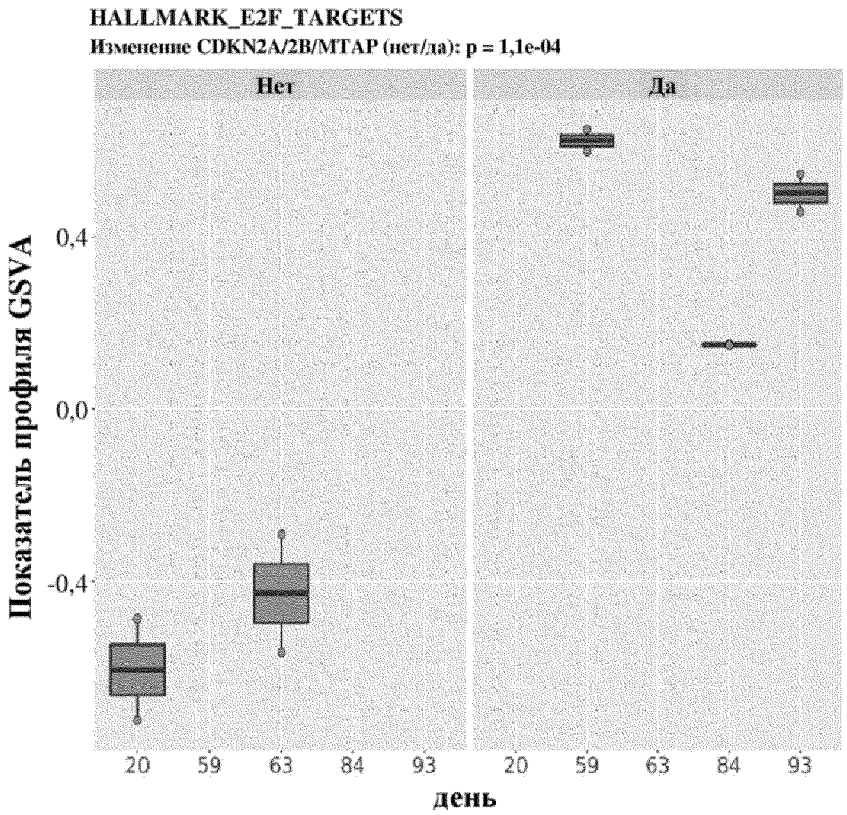
ФИГ. 16

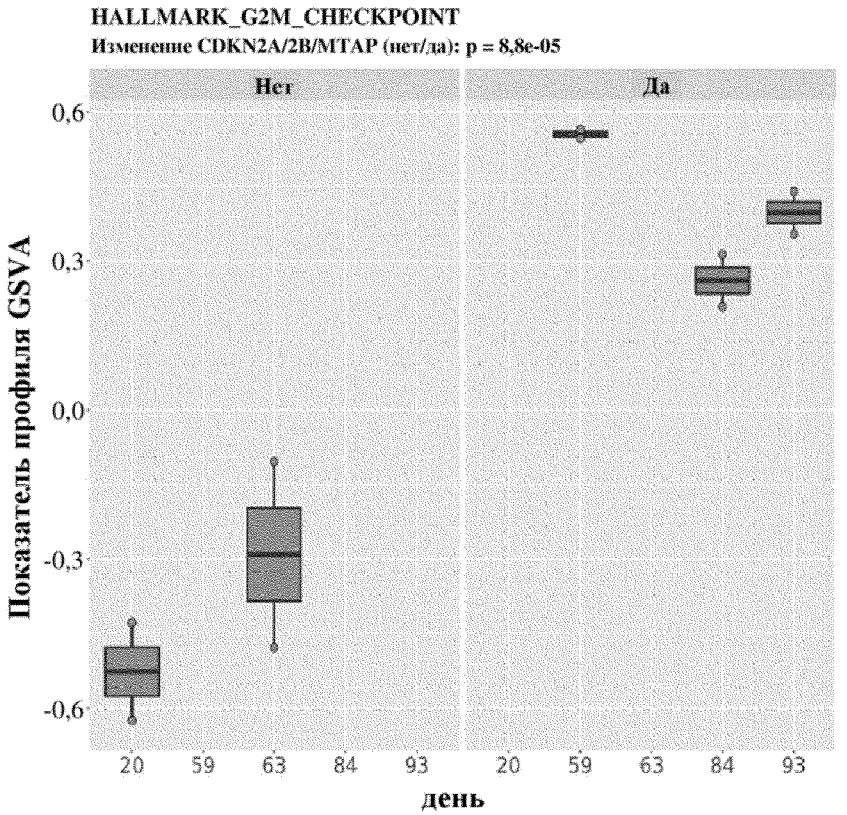


1: без изменений
2: T_{REX}LP3

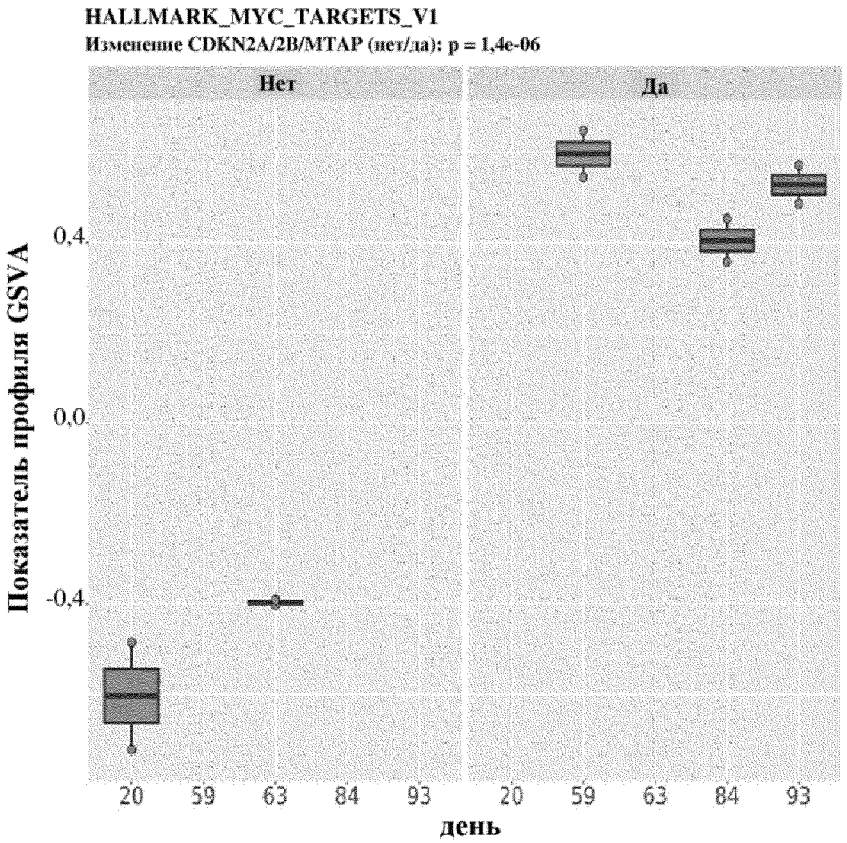
1: без изменений
2: T_{REX}LP1S
3: γδ T_{REX}AB

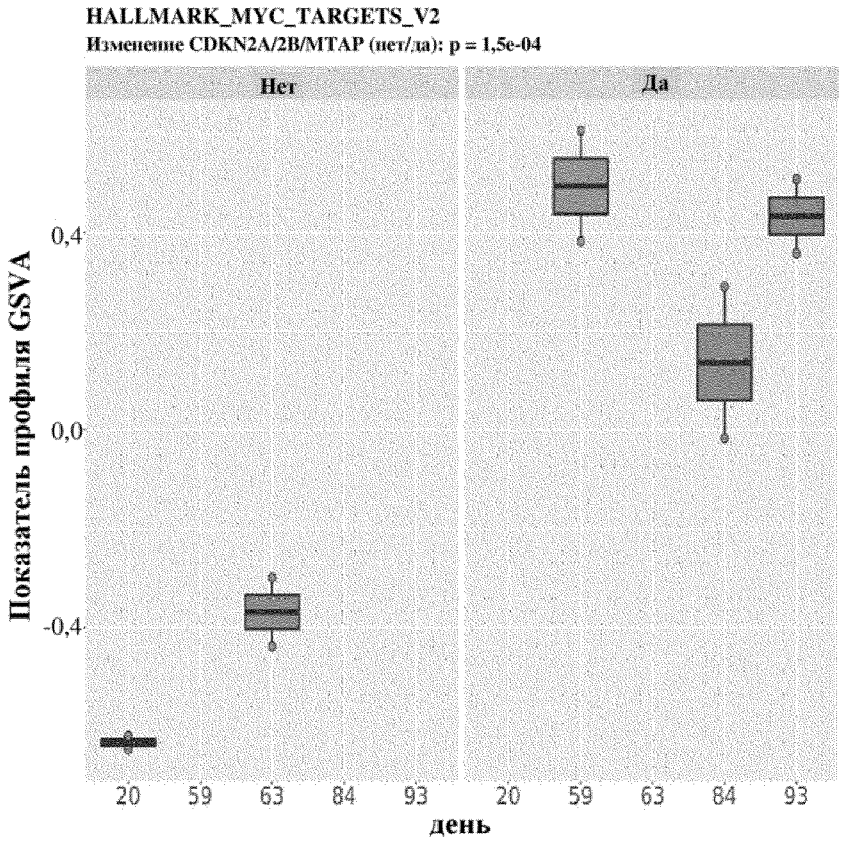
ФИГ. 17


HALLMARK_E2F_TARGETS
Изменение CDKN2A/2B/MTAP (нет/да): p = 1,1e-04
Нет
Да
Показатель профиля GSVA
0,4
0,0
-0,4
20
59
63
84
93
день

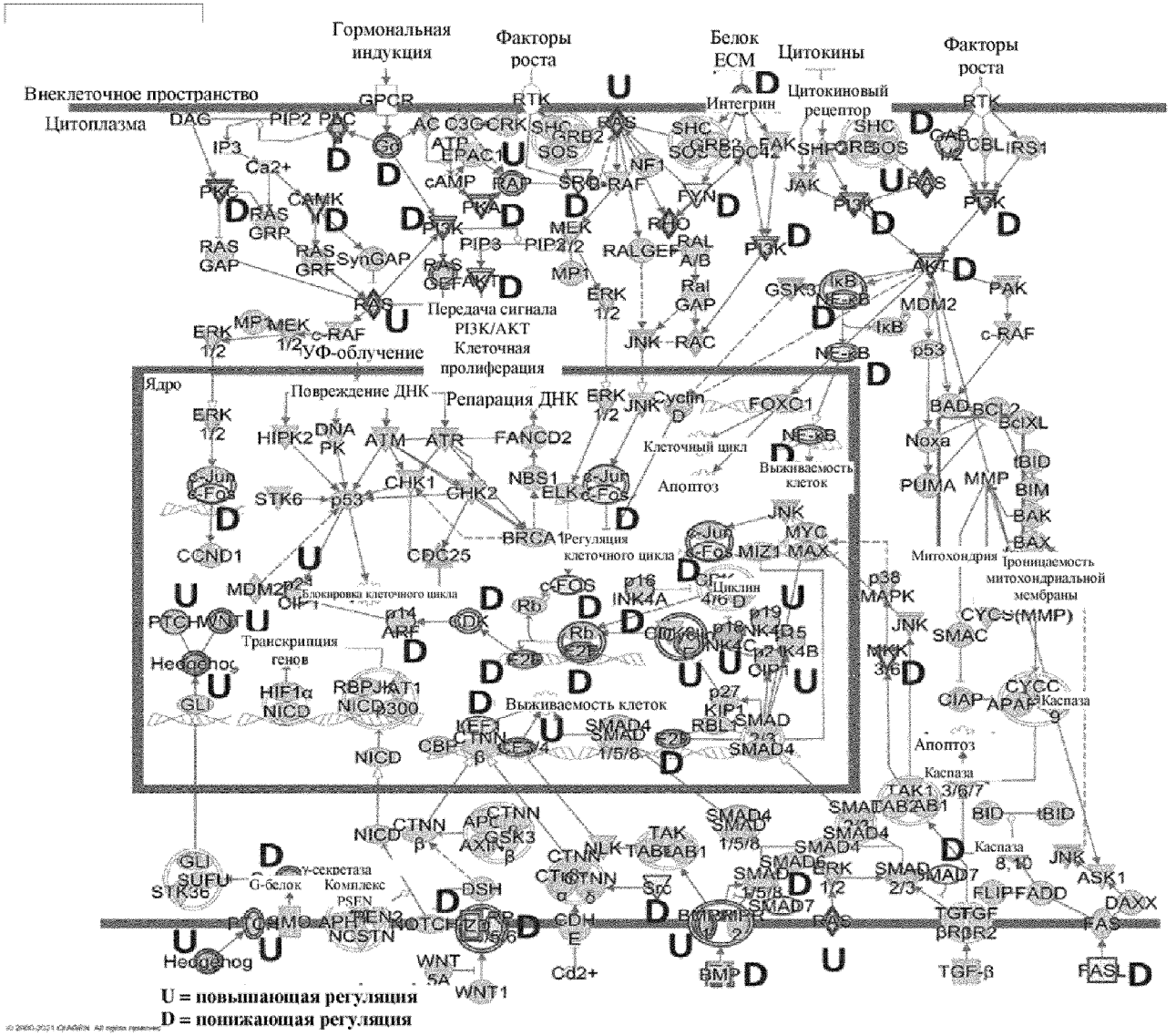

HALLMARK_G2M_CHECKPOINT
Изменение CDKN2A/2B/MTAP (нет/да): p = 8,8e-05
Нет
Да
Показатель профиля GSVA
0,6
0,3
0,0
-0,3
-0,6
20
59
63
84
93
день

ФИГ. 18A

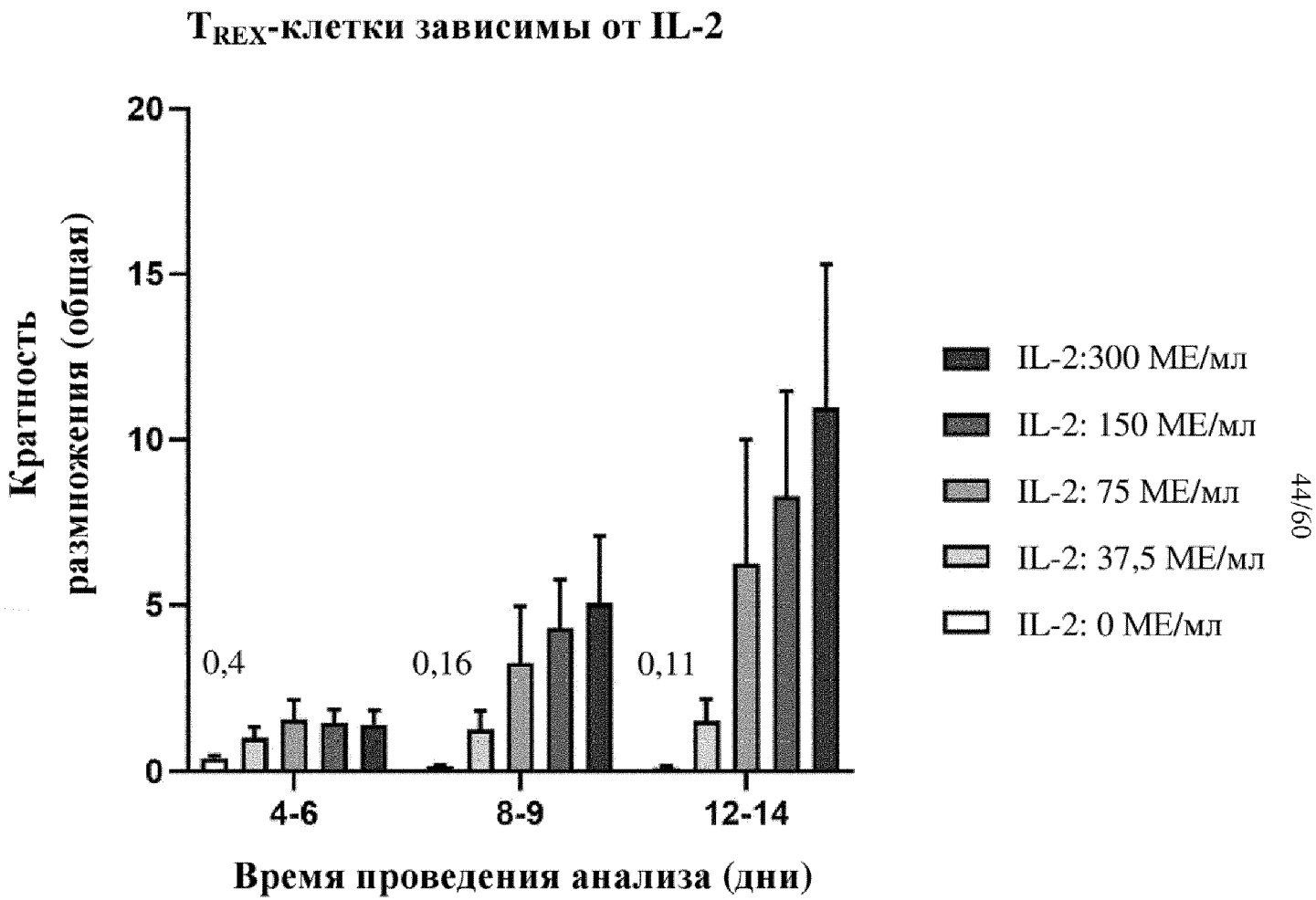

HALLMARK_MYC_TARGETS_V1
Изменение CDKN2A/2B/MTAP (нет/да): p = 1,4e-06
Нет
Да
Показатель профиля GSVA
0,4
0,0
-0,4
20
59
63
84
93
день


HALLMARK_MYC_TARGETS_V2
Изменение CDKN2A/2B/MTAP (нет/да): p = 1,5e-04
Нет
Да
Показатель профиля GSVA
0,4
0,0
-0,4
20
59
63
84
93
день

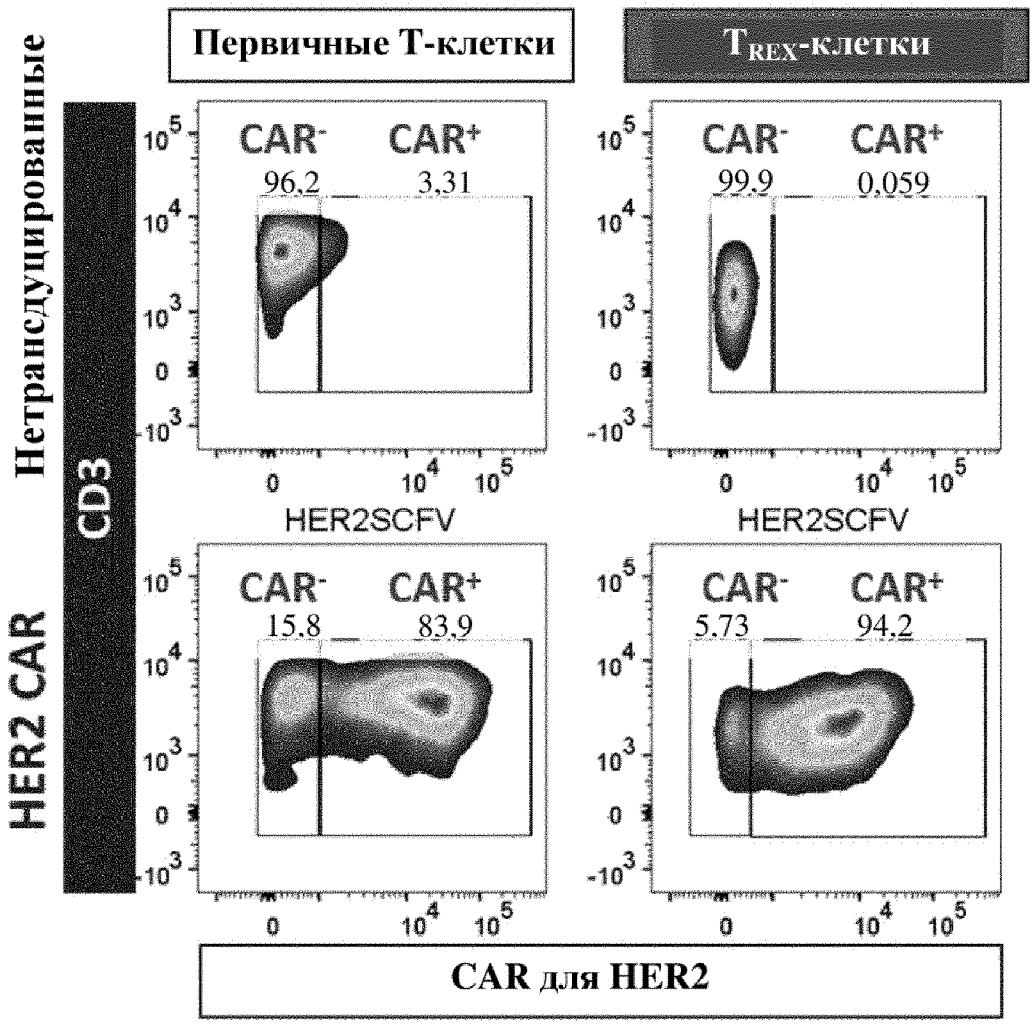
ФИГ. 18B


Гормональная индукция
Факторы роста
Белок ECM
Цитокины
Факторы роста
Внеклеточное пространство
Цитоплазма
Интегрин
Цитокиновый рецептор
GPCR
RTK
DAG
PIP2
PLC
IP3
Ca2+
PKC
CaMK
RAS GRP
RAS GAP
RAS GRF
SynGAP
PKA
PI3K
MEK
RAF
cAMP
EPAC1
ATP
SOS
NF1
SRC
FYN
JAK
RAS
RALGEF
RAL A/B
Ral GAP
JNK
RAC
ERK 1/2
MP1
AKT
GSK3
IkB
NFkB
MDM2
PAK
c-RAF
p53
BAD
BCL2
BclXL
Noxa
PUMA
MMP
tBID
BIM
BAK
BAX
Митохондрия
Проницаемость митохондриальной мембраны
Передача сигнала PI3K/AKT
Клеточная пролиферация
УФ-облучение
Ядро
Повреждение ДНК
Репарация ДНК
HIPK2
DNA PK
ATM
ATR
FANCD2
NBS1
CHK1
CHK2
STK6
BRCA1
ELK
c-Jun
c-Fos
Cyclin D
FOXC1
Клеточный цикл
Выживаемость клеток
Апоптоз
Регуляция клеточного цикла
MYC
MAX
MIZ1
CCND1
CDC25
c-FOS
Rb
p16 INK4A
Циклин D
CDK4/6
p19 INK4D
p18 INK4C
p21 CIP1
p27 KIP1
RBL1
E2F
MDM2
p53
Блокировка клеточного цикла
PTCH
WNT
p14 ARF
Транскрипция генов
Hedgehog
GLI
HIF1α
NICD
RBPJκ
MAML1
p300
Выживаемость клеток
IKEF1
CTNN β
CBF
SMAD4
SMAD 1/5/8
SMAD 2/3
p38 MAPK
JNK
MKK 3/6
CYCS(MMP)
SMAC
CYCC
APAF
Каспаза 9
GIAP
Апоптоз
Каспаза
TAK1
TAB1
3/6/7
BID
tBID
Каспаза 8, 10
ASK1
FLIP
FADD
DAXX
FAS
FASL
TGFβR2
TGF-β
APC
AXIN
GSK3 β
NLK
CTNN α
δ
Src
CDH E
Cd2+
BMP
BMPR
SMAD7
ERK 1/2
SUFU
STK36
γ-секретаза
G-белок
Комплекс PSEN
NCSTN
APH1
PEN2
DSH
FZD
LRP 5/6
WNT 5A
WNT1
U = повышающая регуляция
D = понижающая регуляция

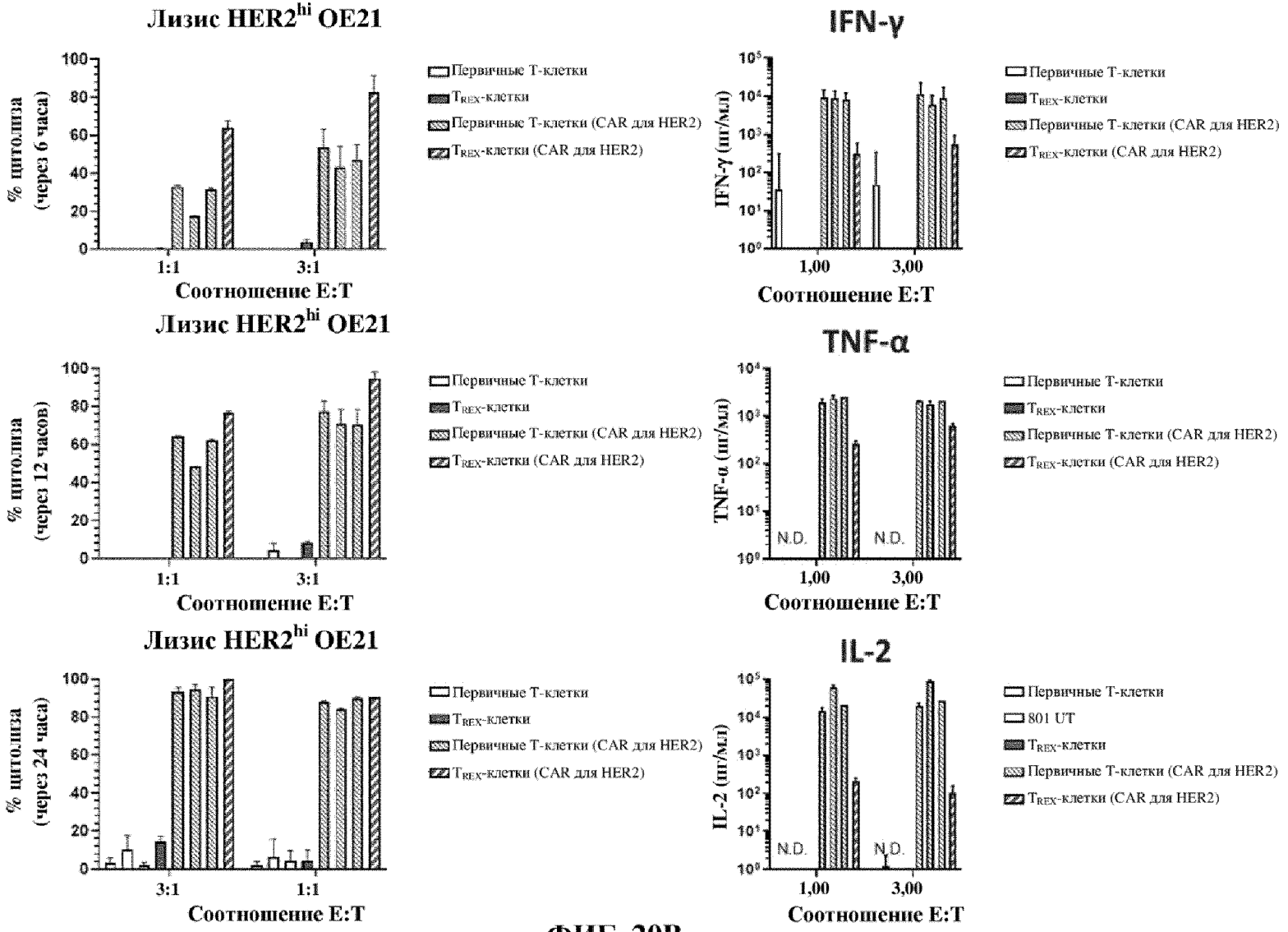
ФИГ. 18С


T REX-клетки зависимы от IL-2
Кратность размножения (общая)
20
15
10
5
0
0,4
0,16
0,11
4-6
8-9
12-14
Время проведения анализа (дни)
IL-2:300 МЕ/мл
IL-2: 150 МЕ/мл
IL-2: 75 МЕ/мл
IL-2: 37,5 МЕ/мл
IL-2: 0 МЕ/мл

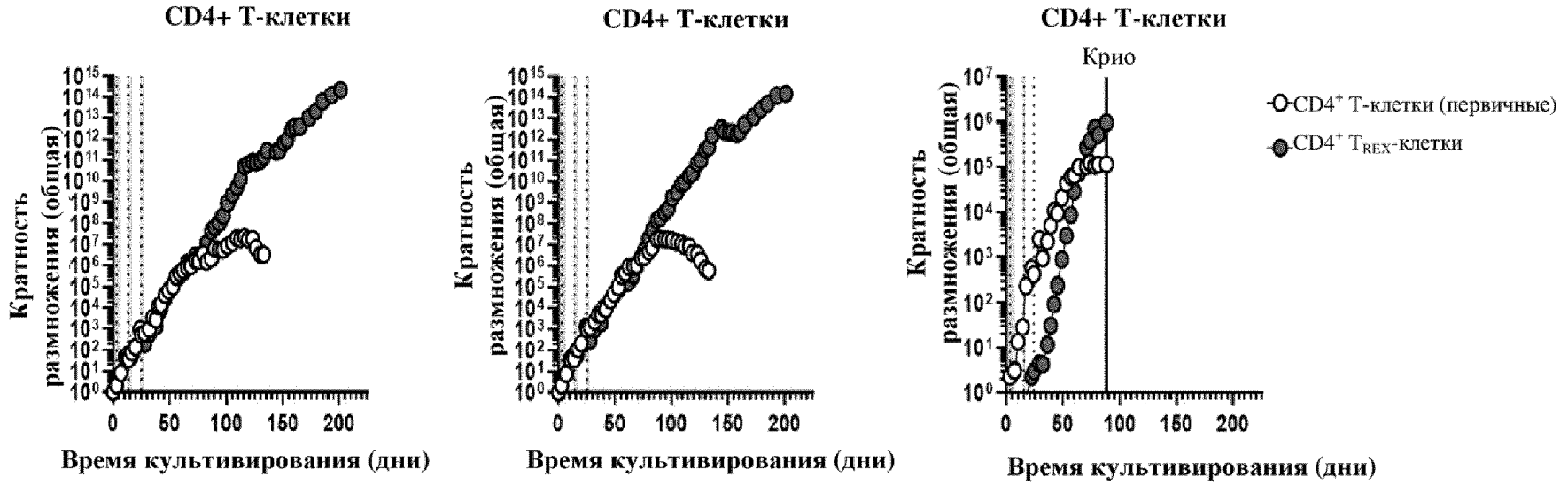
ФИГ. 19


Первичные Т-клетки
TREX-клетки
Нетрансдуцированные
CD3
HER2 CAR
CAR-
CAR+
96,2
3,31
99,9
0,059
15,8
83,9
5,73
94,2
HER2SCFV
CAR для HER2

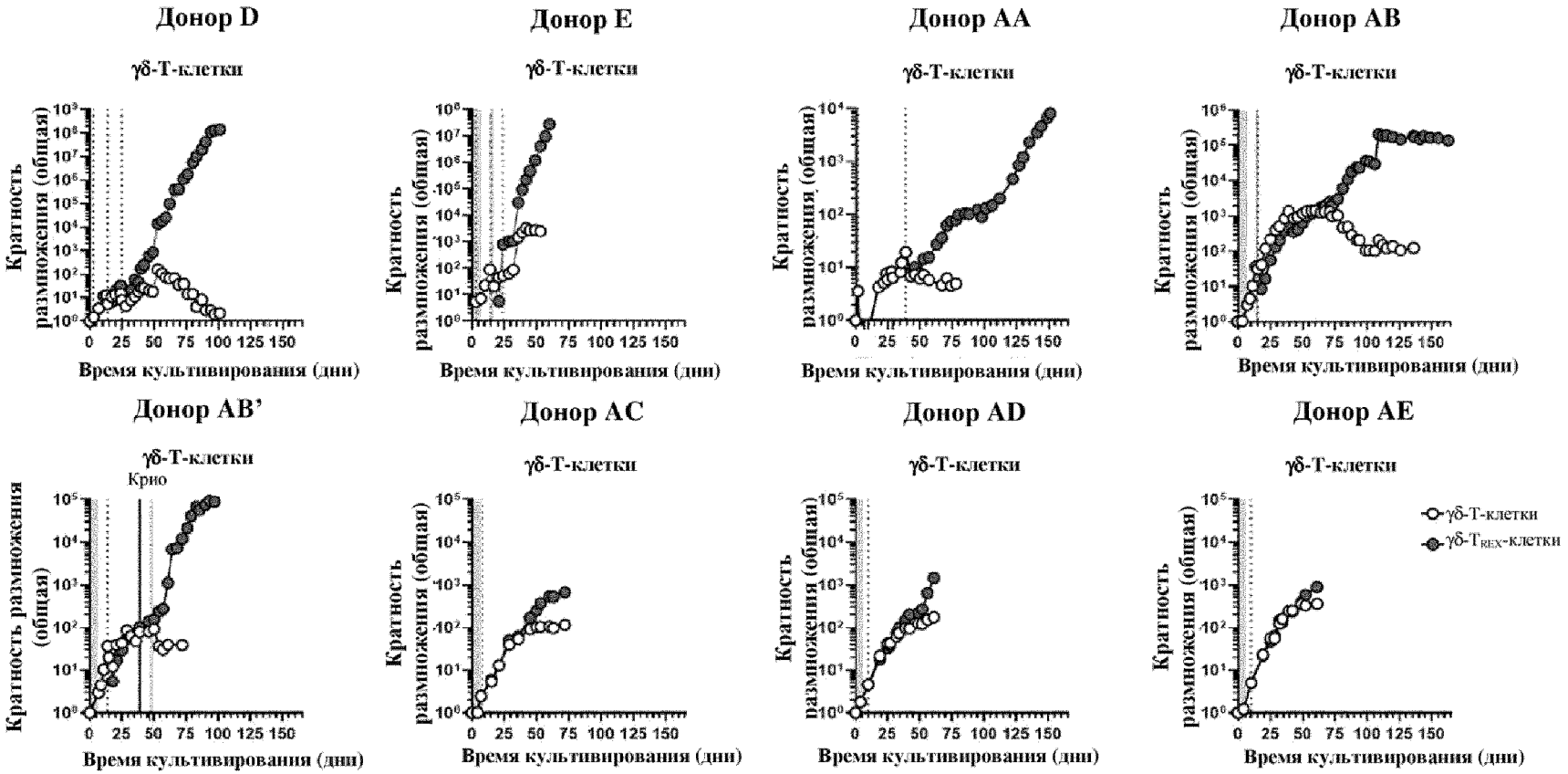
ФИГ. 20А


Лизис HER2hi OE21
% цитолиза (через 6 часа)
Соотношение E:T
1:1
3:1
Первичные Т-клетки
TREX-клетки
Первичные Т-клетки (CAR для HER2)
TREX-клетки (CAR для HER2)
IFN-γ
IFN-γ (пг/мл)
1,00
3,00
Лизис HER2hi OE21
% цитолиза (через 12 часов)
TNF-α
TNF-α (пг/мл)
N.D.
Лизис HER2hi OE21
% цитолиза (через 24 часа)
IL-2
IL-2 (пг/мл)
801 UT

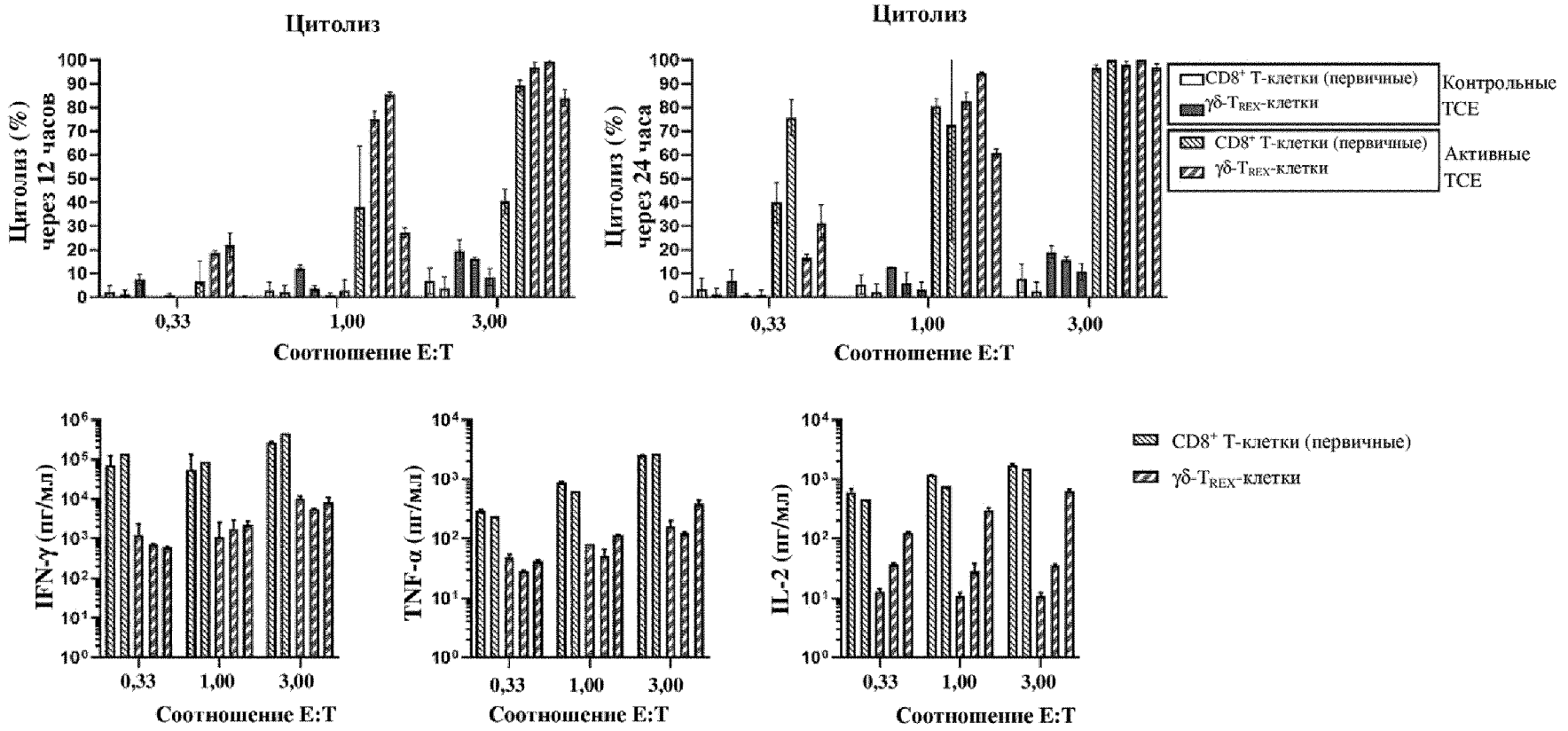
ФИГ. 20В


Донор C
(27C430)
Донор D
(27D430)
Донор E
(27E430)
CD4+ Т-клетки
CD4+ Т-клетки
CD4+ Т-клетки
Крио
Кратность размножения (общая)
Время культивирования (дни)
CD4+ Т-клетки (первичные)
CD4+ TREX-клетки

ФИГ. 21

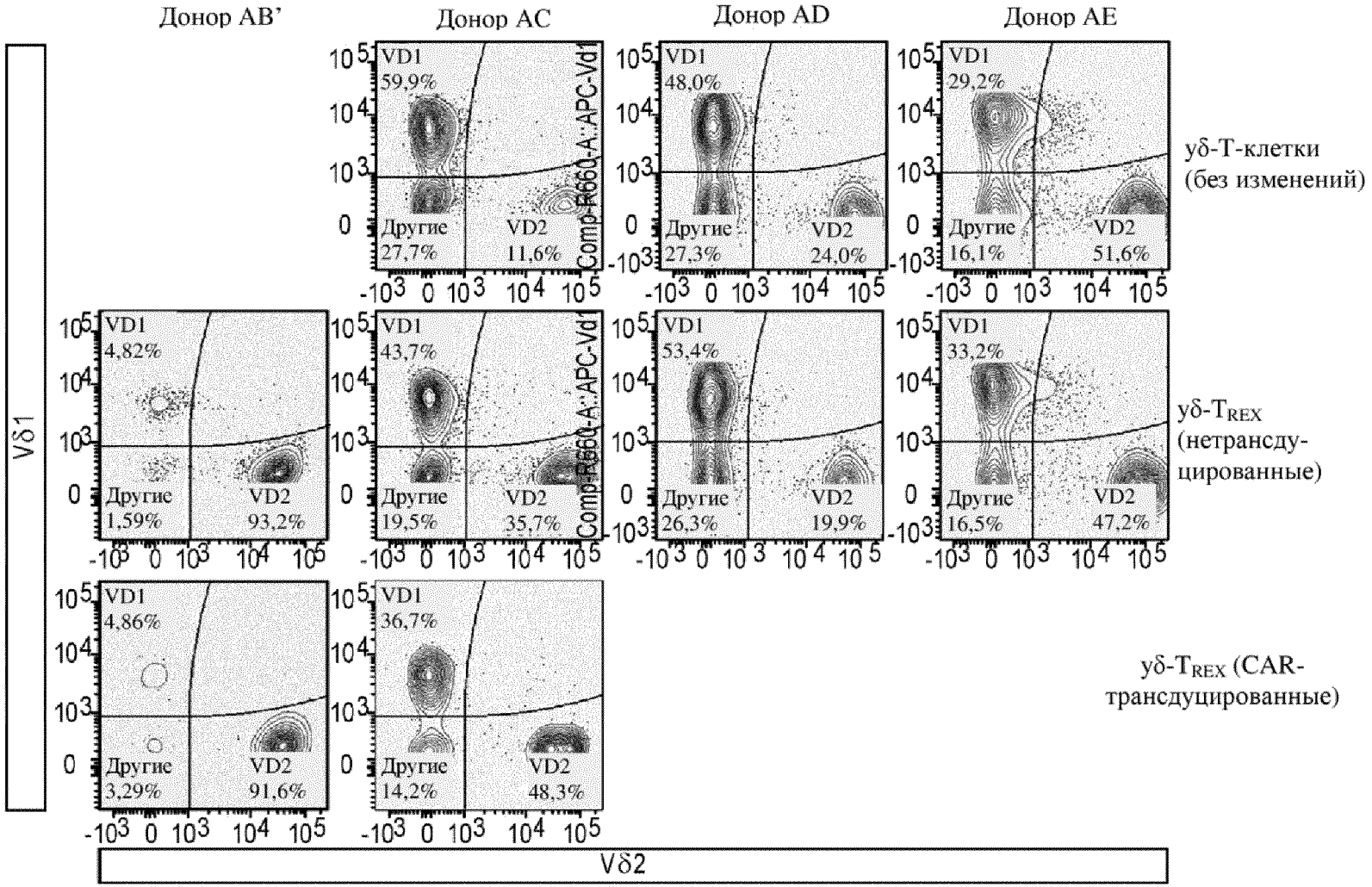

Донор D
γδ-Т-клетки
Кратность размножения (общая)
Время культивирования (дни)
Донор E
γδ-Т-клетки
Кратность размножения (общая)
Время культивирования (дни)
Донор AA
γδ-Т-клетки
Кратность размножения (общая)
Время культивирования (дни)
Донор AB
γδ-Т-клетки
Кратность размножения (общая)
Время культивирования (дни)
Донор AB'
γδ-Т-клетки
Крио
Кратность размножения (общая)
Время культивирования (дни)
Донор AC
γδ-Т-клетки
Кратность размножения (общая)
Время культивирования (дни)
Донор AD
γδ-Т-клетки
Кратность размножения (общая)
Время культивирования (дни)
Донор AE
γδ-Т-клетки
Кратность размножения (общая)
Время культивирования (дни)
γδ-Т-клетки
γδ-TREX-клетки

ФИГ. 22

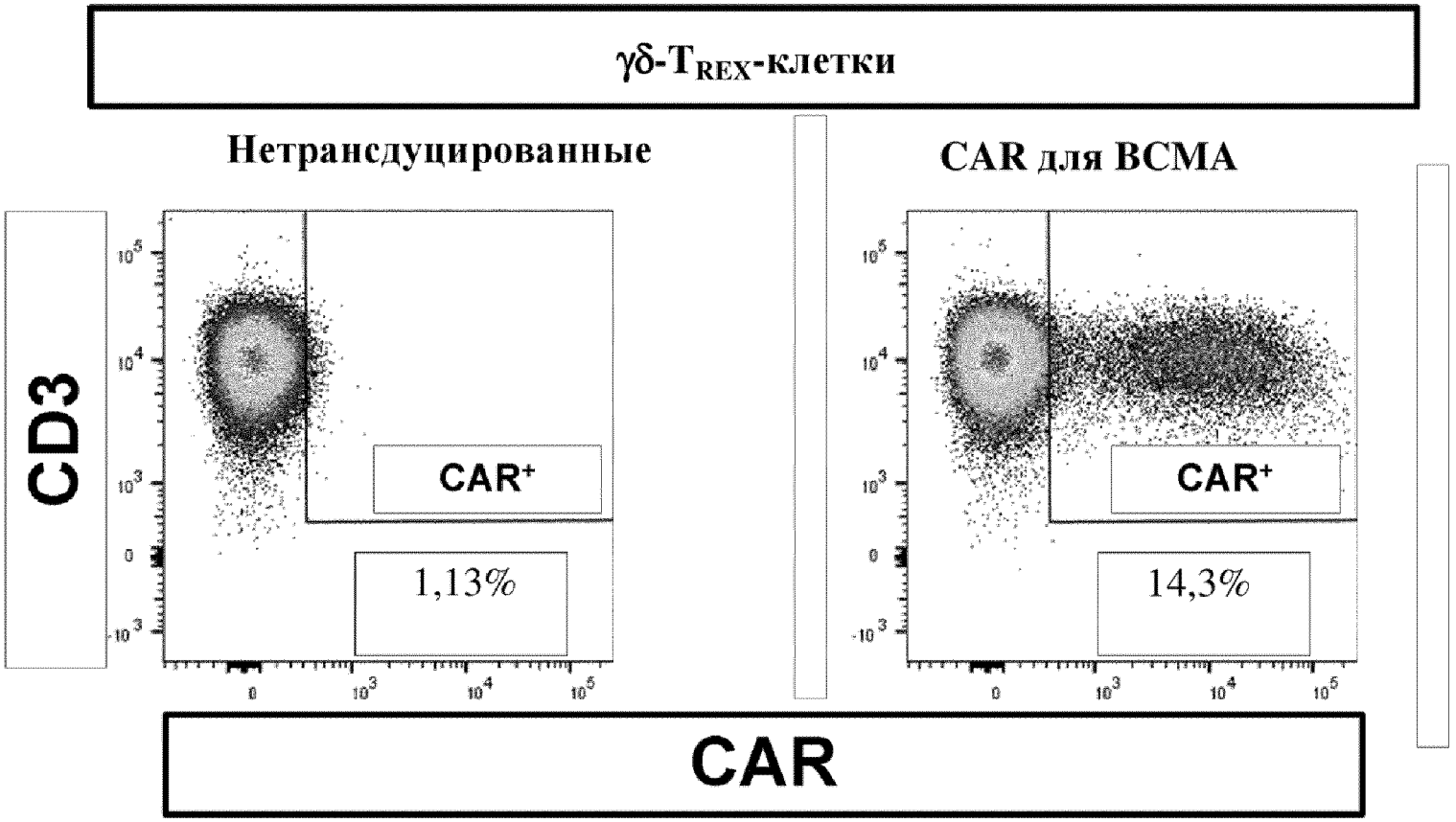

Цитолиз
Цитолиз (%) через 12 часов
Соотношение E:T
Цитолиз
Цитолиз (%) через 24 часа
Соотношение E:T
CD8+ Т-клетки (первичные)
γδ-TREX-клетки
Контрольные TCE
CD8+ Т-клетки (первичные)
γδ-TREX-клетки
Активные TCE
IFN-γ (пг/мл)
Соотношение E:T
TNF-α (пг/мл)
Соотношение E:T
IL-2 (пг/мл)
Соотношение E:T
CD8+ Т-клетки (первичные)
γδ-TREX-клетки

ФИГ. 23

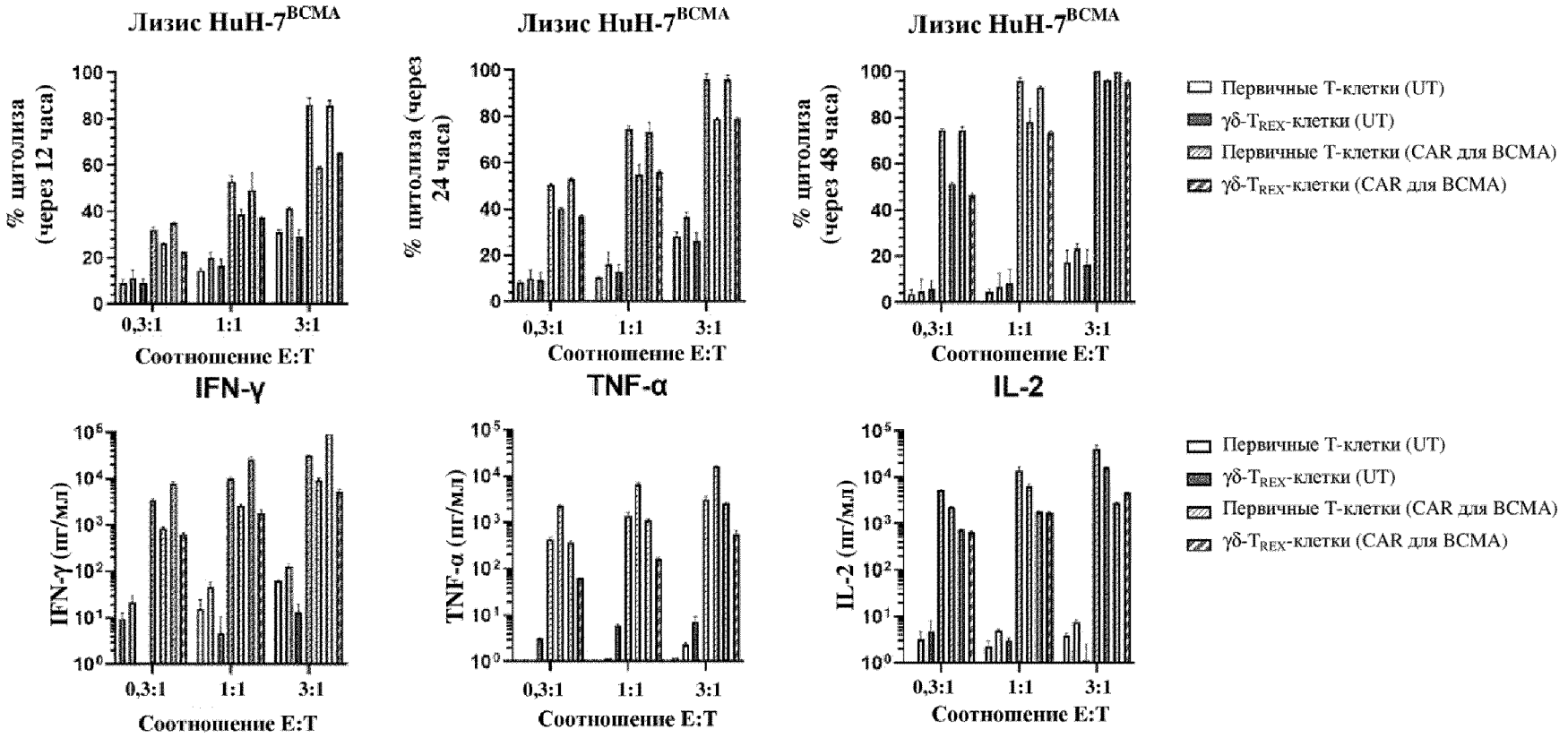
ФИГ. 24



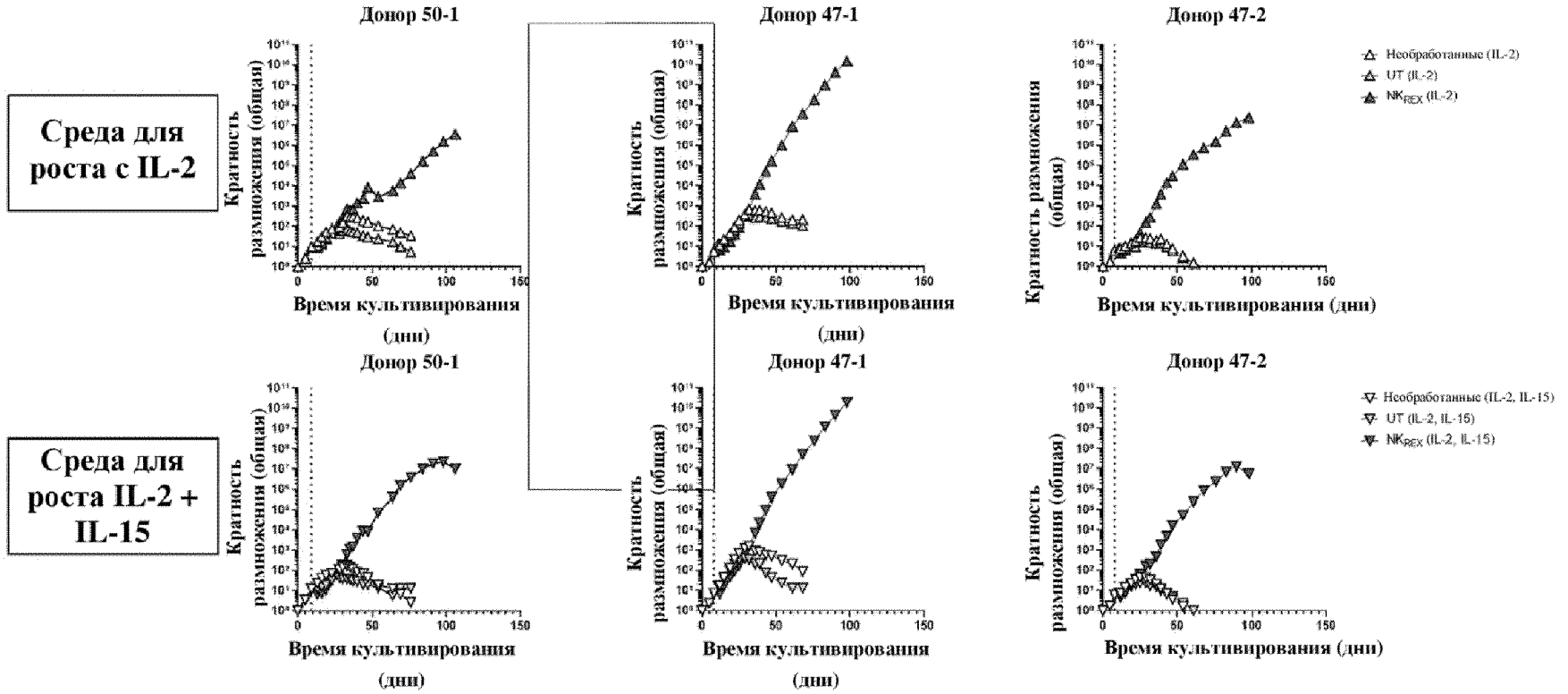
Предварительно гейтированные по: лимфоциты/живые/CD3^{+} TCRαβ^{-} клетки (CAR+ или CAR-)


γδ-T$_{REX}$-клетки
Нетрансдуцированные
CAR для BCMA
CD3
CAR⁺
1,13%
CAR⁺
14,3%
CAR

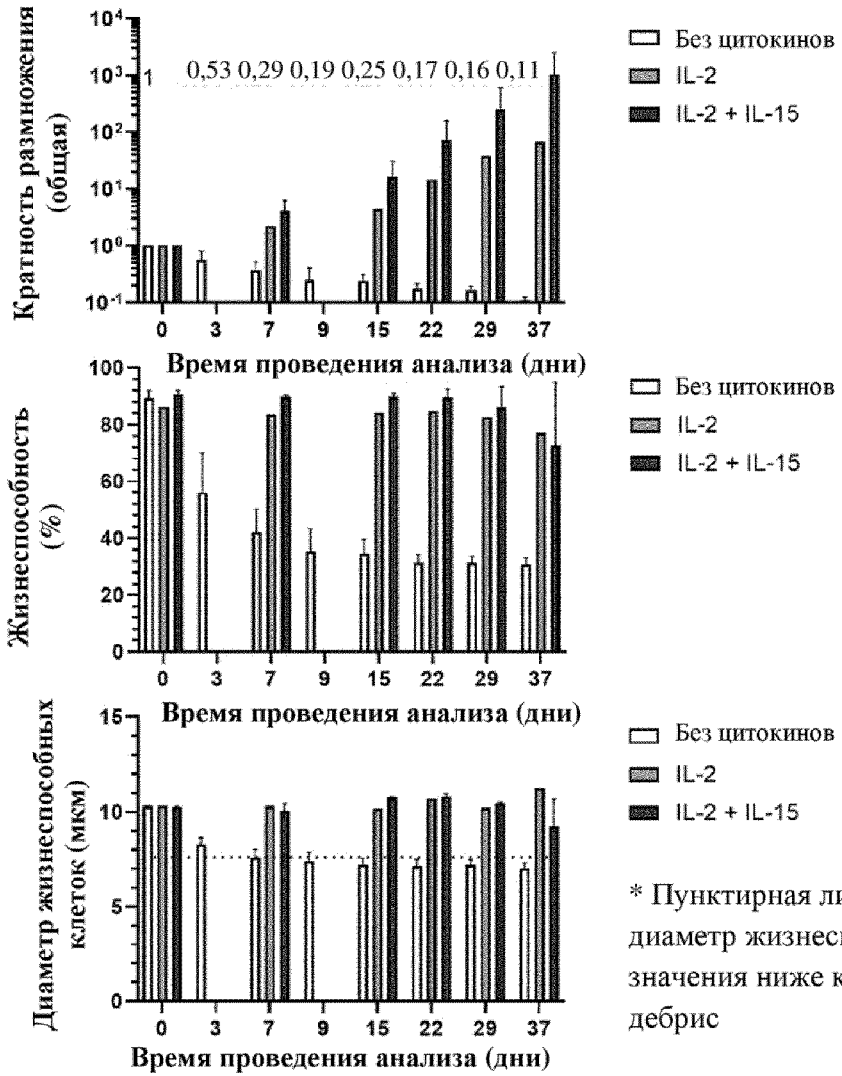
ФИГ. 25А


Лизис HuH-7BCMA
% цитолиза (через 12 часа)
% цитолиза (через 24 часа)
% цитолиза (через 48 часа)
0,3:1
1:1
3:1
Соотношение E:T
Первичные Т-клетки (UT)
γδ-TREX-клетки (UT)
Первичные Т-клетки (CAR для BCMA)
γδ-TREX-клетки (CAR для BCMA)
IFN-γ
TNF-α
IL-2
IFN-γ (пг/мл)
TNF-α (пг/мл)
IL-2 (пг/мл)

ФИГ. 25B


Среда для роста с IL-2
Среда для роста IL-2 + IL-15
Донор 50-1
Донор 47-1
Донор 47-2
Кратность размножения (общая)
Время культивирования (дни)
Необработанные (IL-2)
UT (IL-2)
NKREX (IL-2)
Необработанные (IL-2, IL-15)
UT (IL-2, IL-15)
NKREX (IL-2, IL-15)

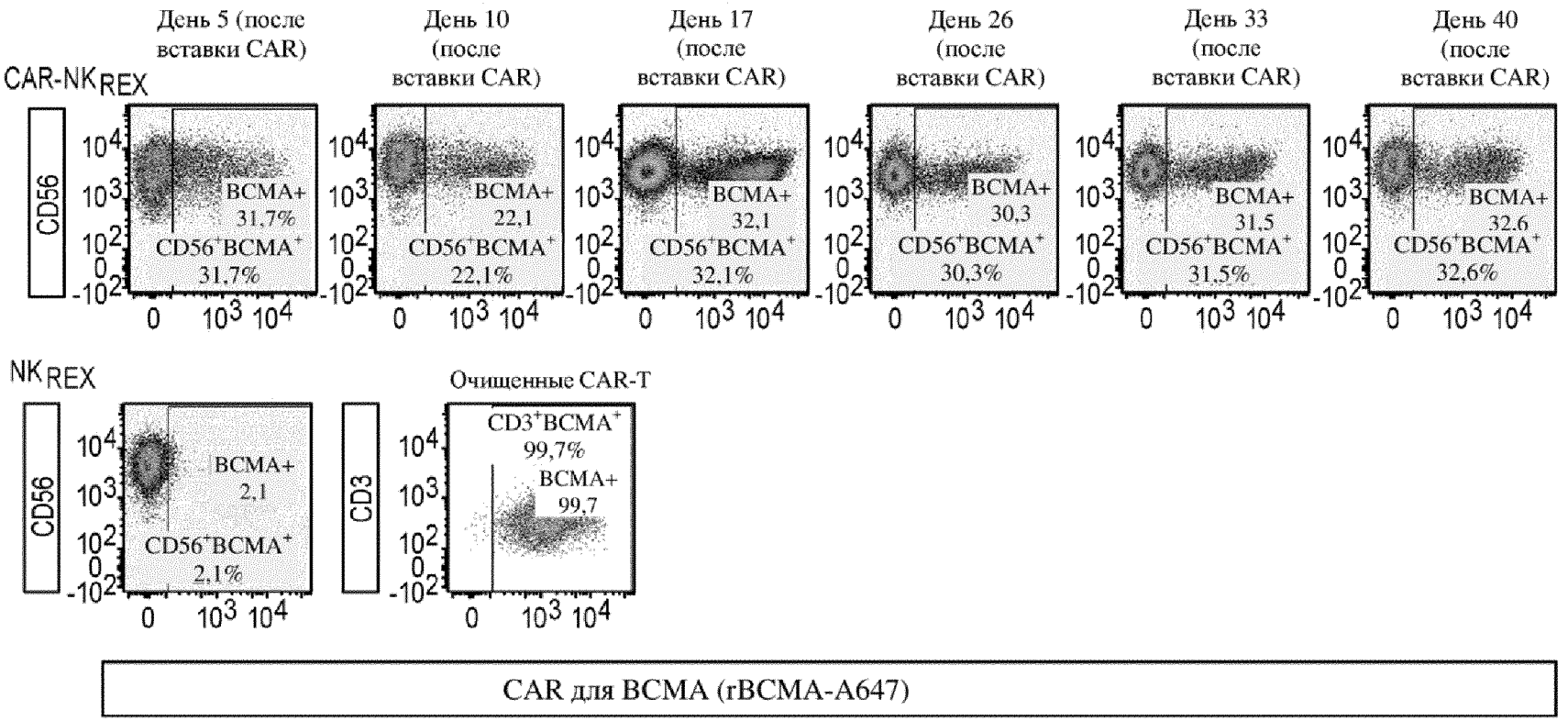
ФИГ. 26

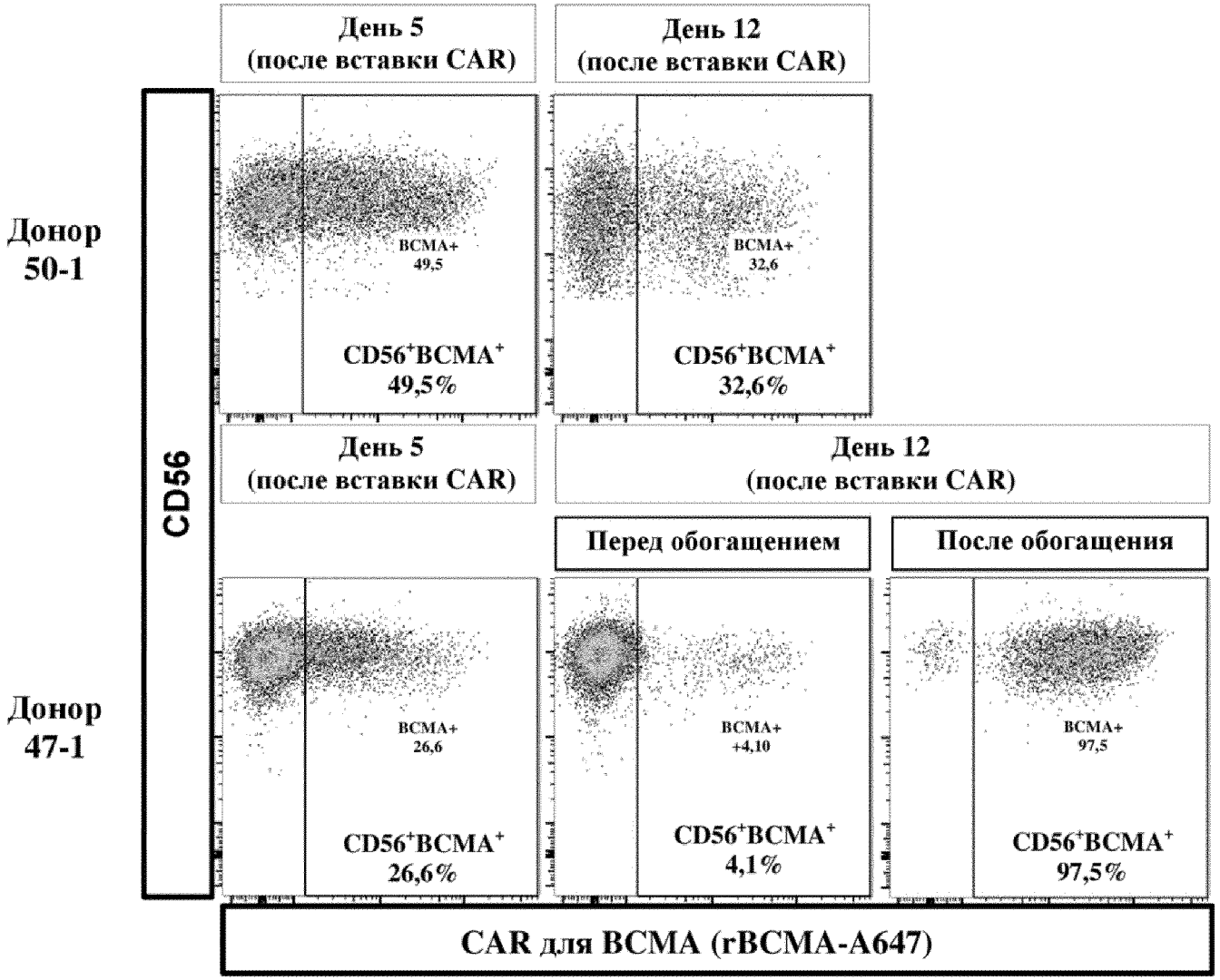


* Пунктирная линия указывает на диаметр жизнеспособных клеток, значения ниже которого отражают дебрис

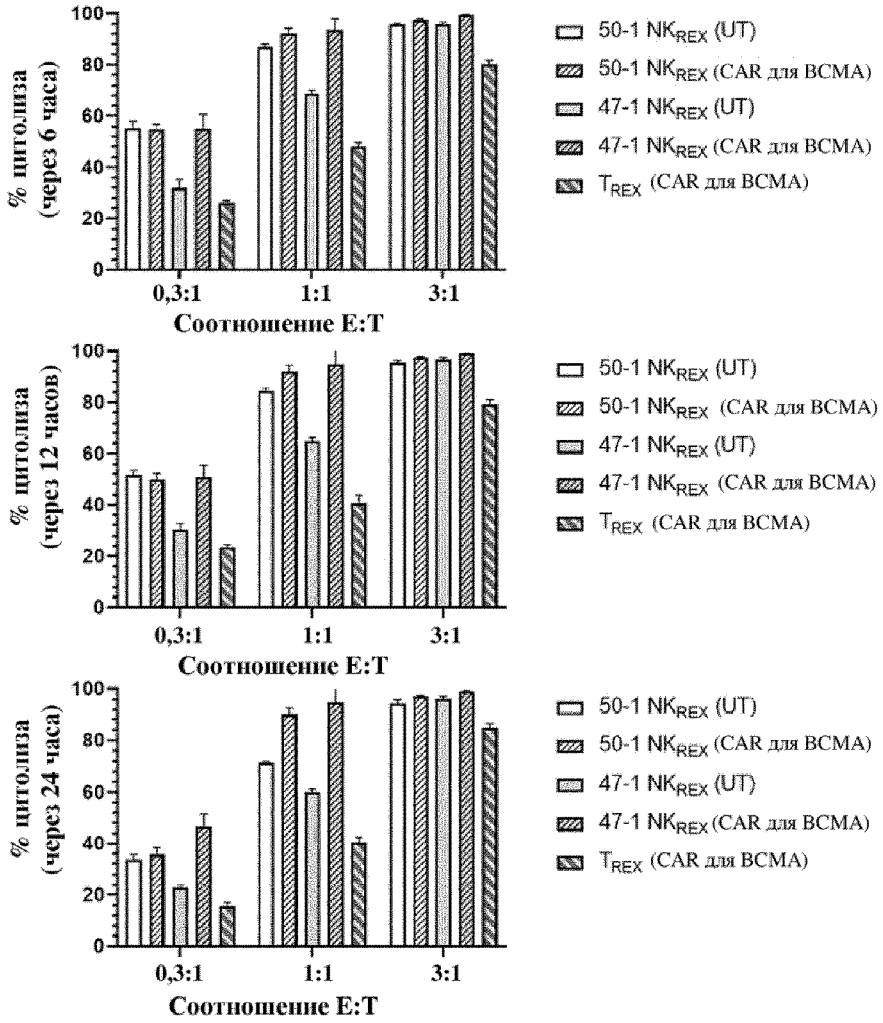
ФИГ. 27

ФИГ. 28

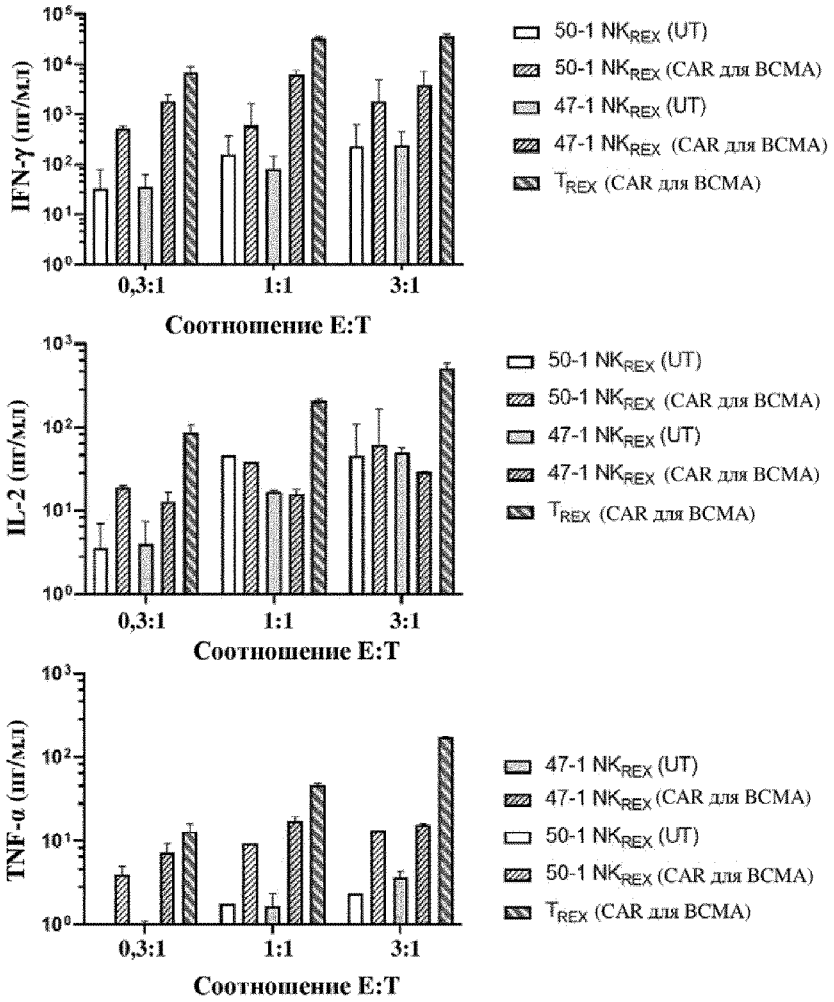

День 5 (после вставки CAR)
День 10 (после вставки CAR)
День 17 (после вставки CAR)
День 26 (после вставки CAR)
День 33 (после вставки CAR)
День 40 (после вставки CAR)
CAR-NK REX
CD56
BCMA+ 31,7%
CD56+BCMA+ 31,7%
BCMA+ 22,1
CD56+BCMA+ 22,1%
BCMA+ 32,1
CD56+BCMA+ 32,1%
BCMA+ 30,3
CD56+BCMA+ 30,3%
BCMA+ 31,5
CD56+BCMA+ 31,5%
BCMA+ 32,6
CD56+BCMA+ 32,6%
NK REX
BCMA+ 2,1
CD56+BCMA+ 2,1%
Очищенные CAR-T
CD3
CD3+BCMA+ 99,7%
BCMA+ 99,7
CAR для BCMA (rBCMA-A647)


День 5
(после вставки CAR)
День 12
(после вставки CAR)
Донор
50-1
BCMA+
49,5
CD56+BCMA+
49,5%
BCMA+
32,6
CD56+BCMA+
32,6%
CD56
День 5
(после вставки CAR)
День 12
(после вставки CAR)
Перед обогащением
После обогащения
Донор
47-1
BCMA+
26,6
CD56+BCMA+
26,6%
BCMA+
+4,10
CD56+BCMA+
4,1%
BCMA+
97,5
CD56+BCMA+
97,5%
CAR для BCMA (rBCMA-A647)

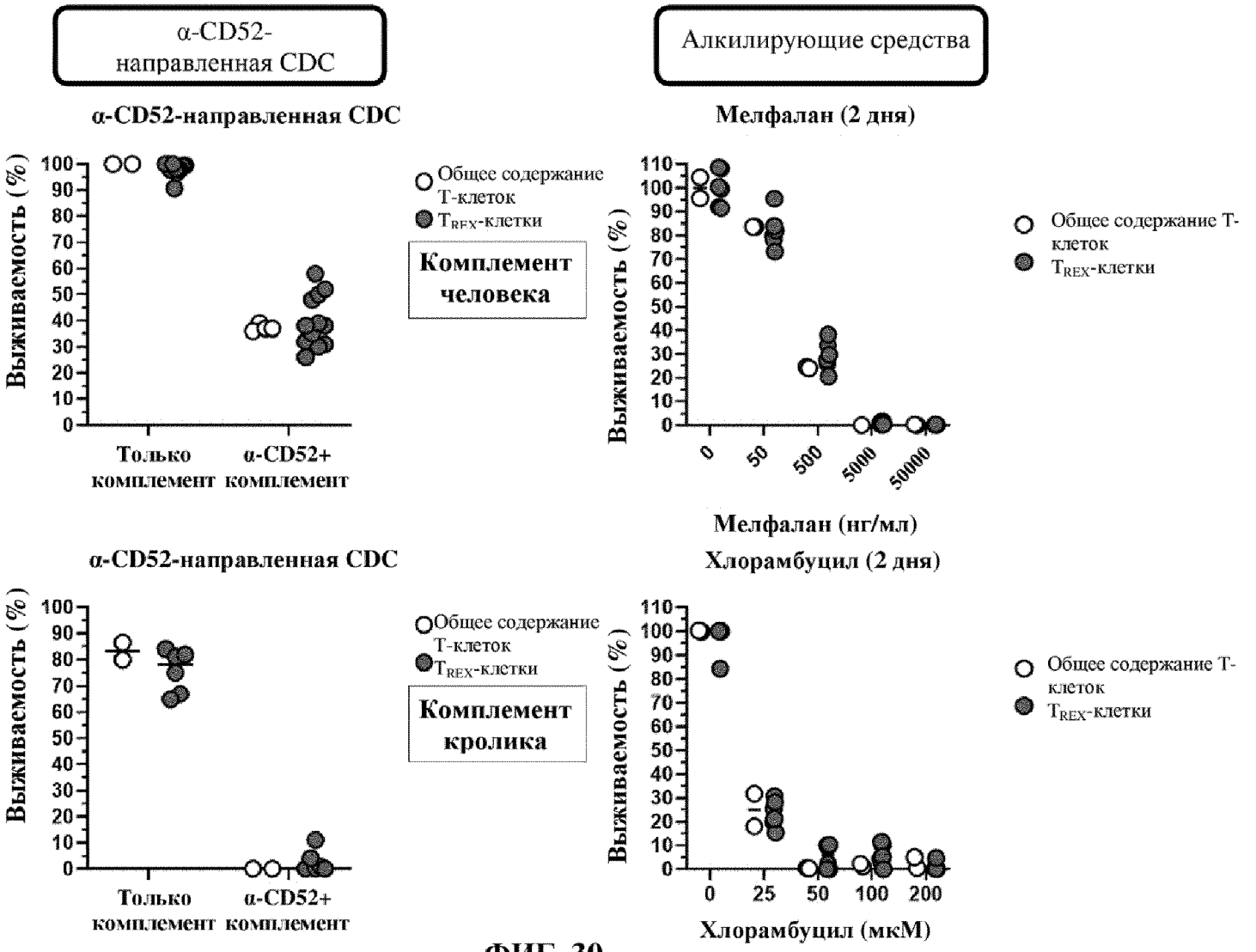
ФИГ. 29А


% цитолиза (через 6 часа)
100
80
60
40
20
0
0,3:1
1:1
3:1
Соотношение E:T
50-1 NKREX (UT)
50-1 NKREX (CAR для BCMA)
47-1 NKREX (UT)
47-1 NKREX (CAR для BCMA)
TREX (CAR для BCMA)
% цитолиза (через 12 часов)
100
80
60
40
20
0
0,3:1
1:1
3:1
Соотношение E:T
50-1 NKREX (UT)
50-1 NKREX (CAR для BCMA)
47-1 NKREX (UT)
47-1 NKREX (CAR для BCMA)
TREX (CAR для BCMA)
% цитолиза (через 24 часа)
100
80
60
40
20
0
0,3:1
1:1
3:1
Соотношение E:T
50-1 NKREX (UT)
50-1 NKREX (CAR для BCMA)
47-1 NKREX (UT)
47-1 NKREX (CAR для BCMA)
TREX (CAR для BCMA)

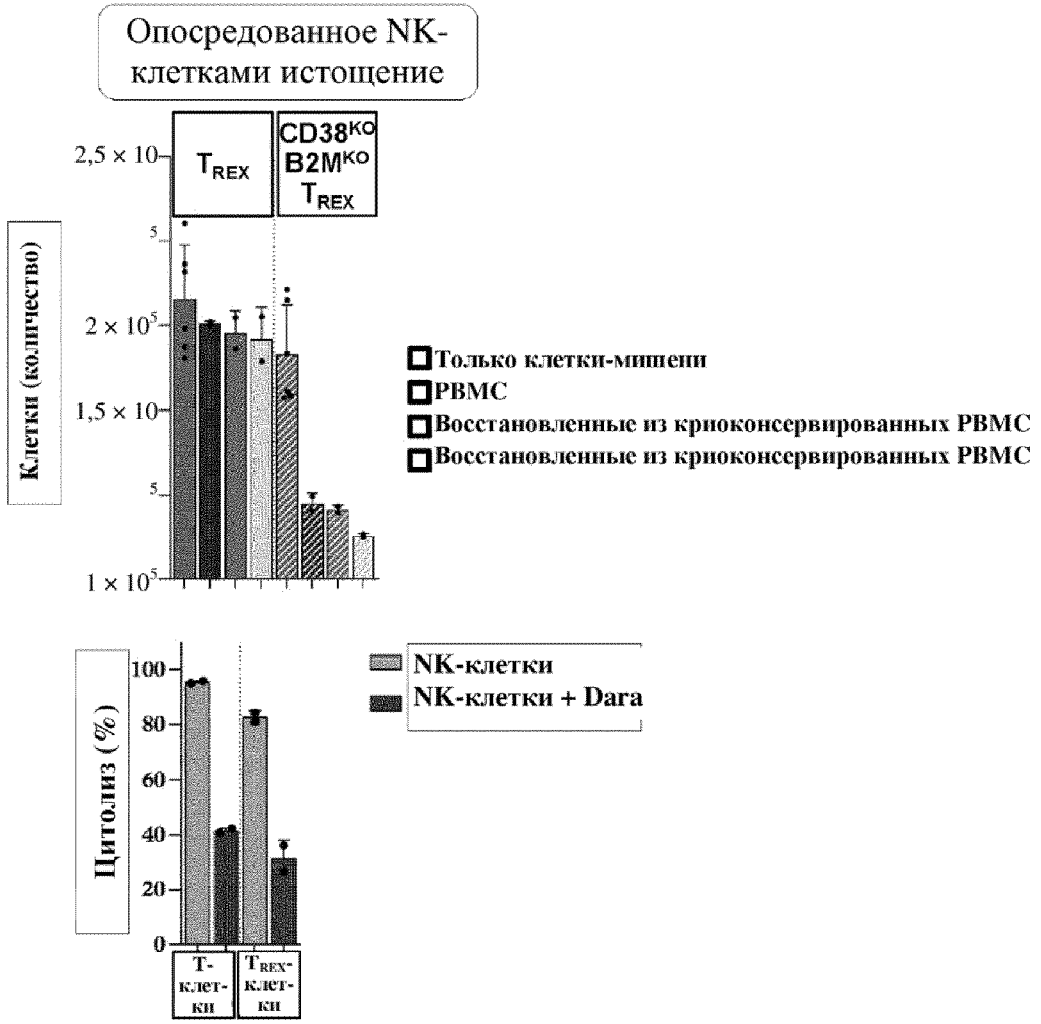
ФИГ. 29B


IFN-γ (пг/мл)
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0,3:1
1:1
3:1
Соотношение E:T
50-1 NK_{REX} (UT)
50-1 NK_{REX} (CAR для BCMA)
47-1 NK_{REX} (UT)
47-1 NK_{REX} (CAR для BCMA)
T_{REX} (CAR для BCMA)
IL-2 (пг/мл)
10^3
10^2
10^1
10^0
0,3:1
1:1
3:1
Соотношение E:T
50-1 NK_{REX} (UT)
50-1 NK_{REX} (CAR для BCMA)
47-1 NK_{REX} (UT)
47-1 NK_{REX} (CAR для BCMA)
T_{REX} (CAR для BCMA)
TNF-α (пг/мл)
10^3
10^2
10^1
10^0
0,3:1
1:1
3:1
Соотношение E:T
47-1 NK_{REX} (UT)
47-1 NK_{REX} (CAR для BCMA)
50-1 NK_{REX} (UT)
50-1 NK_{REX} (CAR для BCMA)
T_{REX} (CAR для BCMA)

ФИГ. 29С


α-CD52-направленная CDC
Алкилирующие средства
α-CD52-направленная CDC
Выживаемость (%)
Только комплемент
α-CD52+ комплемент
Общее содержание Т-клеток
TREX-клетки
Комплемент человека
Мелфалан (2 дня)
Мелфалан (нг/мл)
Общее содержание Т-клеток
TREX-клетки
α-CD52-направленная CDC
Комплемент кролика
Хлорамбуцил (2 дня)
Хлорамбуцил (мкМ)

ФИГ. 30


Опосредованное NK-клетками истощение
Клетки (количество)
2,5 × 10
2 × 10^5
1,5 × 10
1 × 10^5
T_REX
CD38^KO B2M^KO T_REX
Только клетки-мишени
PBMC
Восстановленные из криоконсервированных PBMC
Восстановленные из криоконсервированных PBMC
Цитолиз (%)
100
80
60
40
20
0
T-клет-ки
T_REX-клет-ки
NK-клетки
NK-клетки + Dara

ФИГ. 31