



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2020132924, 08.03.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

04.06.2018 US 62/680,490;

20.04.2018 US 62/660,657;

17.09.2018 US 62/732,050;

29.06.2018 US 62/692,487;

08.03.2018 US 62/640,530;

08.11.2018 US 62/757,717

(43) Дата публикации заявки: 11.04.2022 Бюл. № 11

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 08.10.2020

(86) Заявка РСТ:

US 2019/021490 (08.03.2019)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2019/173798 (12.09.2019)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спаская, 25, строение 3,

ООО "Юридическая фирма Городиский и

Партнеры"

(71) Заявитель(и):

РУБИУС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Автор(ы):

УИКХЭМ, Томас, Джозеф (US),**ЭЛЛОУЛ, Сиван (US)****(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ КЛЕТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА И ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ****(57) Формула изобретения**

1. Безъядерная клетка, сконструированная для стимуляции иммунной клетки-киллера, где безъядерная клетка содержит по меньшей мере первый экзогенный стимулирующий полипептид и второй экзогенный стимулирующий полипептид, где экзогенных стимулирующих полипептидов достаточно для стимуляции иммунной клетки-киллера.

2. Безъядерная клетка по п. 1, где иммунной клеткой-киллером является натуральная клетка-киллер (НК).

3. Безъядерная клетка по п. 1, где иммунной клеткой-киллером является CD8+ Т-клетка.

4. Безъядерная клетка по п. 1, где безъядерная клетка содержит по меньшей мере первый экзогенный стимулирующий полипептид, второй экзогенный стимулирующий полипептид и третий экзогенный стимулирующий полипептид.

5. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-4, где по меньшей мере один из экзогенных стимулирующих полипептидов содержит полипептид, выбираемый из группы, состоящей

из: IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, слияния IL-15/IL-15RA, IL-18, IL-21, интерферона альфа (IFN α), 4-1BBL, полиовирусного рецептора (PVR/CD155), CD48, человеческого лейкоцитарного антигена (HLA)-A, HLA-C, HLA-G, гепарансульфата (HS), HLA-E, CpG, иммуноглобулина G (IgG), белков, связанных с цепью MHC I класса (MIC), B7-H6, Nkp44L, нектин-2, антигена NK-T-B (NTBA), индуцированного активацией лектина типа C (AICL) и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1).

6. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-4, где по меньшей мере один из экзогенных стимулирующих полипептидов содержит слияние IL-15/IL-15RA.

7. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-4, где по меньшей мере один из экзогенных стимулирующих полипептидов содержит IL-12.

8. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-4, где по меньшей мере один из экзогенных стимулирующих полипептидов содержит 4-1BBL.

9. Безъядерная клетка по п. 5, где белок MIC выбирают из группы, состоящей из: белка A, связанного с цепью MHC I класса (MICA), белка B, связанного с цепью MHC I класса (MICB), и белков, связывающих UL16 (ULBP).

10. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-4, где по меньшей мере один из экзогенных стимулирующих полипептидов содержит полипептид, выбираемый из группы, состоящей из: слияния IL-15/IL-15RA, MICA, MICB и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1).

11. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-4, где первый экзогенный стимулирующий полипептид содержит IL-15/IL-15RA, а второй экзогенный стимулирующий полипептид содержит полипептид, выбираемый из группы, состоящей из: IL-1, IL-2, IL-12, IL-18, IL-21, 4-1BBL, IFN α , MICA, MICB, PVR и CD48.

12. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-4, где первый экзогенный стимулирующий полипептид содержит IL-15/IL-15RA, а второй экзогенный стимулирующий полипептид содержит 4-1BBL.

13. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-4, где первый экзогенный стимулирующий полипептид содержит IL-15/IL-15RA, а второй экзогенный стимулирующий полипептид содержит IL-12.

14. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-4, где первый экзогенный стимулирующий полипептид содержит IL-12, а второй экзогенный стимулирующий полипептид содержит 4-1BBL.

15. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-4, где первый экзогенный стимулирующий полипептид и второй экзогенный стимулирующий полипептид выбирают из группы, состоящей из: IL-18 и IL-12, IL-18 и IL-21, IL-12 и 4-1BBL, IL-12 и слияния IL-15/IL-15RA, и 4-1BBL и слияния IL-15/IL-15RA.

16. Безъядерная клетка по п. 4, где первый экзогенный стимулирующий полипептид содержит IL-12, второй экзогенный полипептид содержит IL-18, а третий экзогенный стимулирующий полипептид содержит слияние IL15/IL-15RA.

17. Безъядерная клетка по п. 4, где первый экзогенный стимулирующий полипептид содержит IL-12, второй экзогенный полипептид содержит IL-18, а третий экзогенный стимулирующий полипептид содержит IL-15.

18. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-4, где по меньшей мере один экзогенный полипептид присутствует в количестве копий более 10^4 , 10^5 или 10^6 .

19. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-4, где первый экзогенный стимулирующий полипептид присутствует в количестве копий не более, чем на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% больше, или не более, чем в 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 или 1000 раз больше количества копий второго экзогенного стимулирующего полипептида.

20. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-4, где второй экзогенный стимулирующий полипептид присутствует в количестве копий не более, чем на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% больше, или не более, чем в 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 или 1000

раз больше количества копий первого экзогенного стимулирующего полипептида.

21. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-4, где первый экзогенный стимулирующий полипептид и второй экзогенный стимулирующий полипептид имеют количественное соотношение приблизительно 1:1, от приблизительно 2:1 до 1:2, от приблизительно 5:1 до 1:5, от приблизительно 10:1 до 1:10, от приблизительно 20:1 до 1:20, от приблизительно 50:1 до 1:50 или от приблизительно 100:1 до 1:100 по массе или по количеству копий.

22. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-4, где первый и второй экзогенные стимулирующие полипептиды представлены в виде полипептида слияния.

23. Безъядерная клетка по п. 4, где первый, второй и третий экзогенные стимулирующие полипептиды представлены в виде полипептида слияния.

24. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-23, где по меньшей мере один или более экзогенных стимулирующих полипептидов находятся на поверхности сконструированной безъядерной клетки.

25. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-24, где по меньшей мере один или более экзогенных стимулирующих полипептидов дополнительно содержат трансмембранный домен.

26. Безъядерная клетка по п. 25, где трансмембранный домен содержит гликофорин А (GPA) или его трансмембранную часть.

27. Безъядерная клетка по п. 25, где трансмембранный домен содержит маленький интегральный мембранный белок 1 (SMIM1) или его трансмембранную часть.

28. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-27, где безъядерная клетка способна активировать НК-клетку.

29. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-27, где безъядерная клетка способна размножить НК-клетку.

30. Безъядерная клетка по п. 28 или 29, где НК-клетка относится к типу НК-клеток памяти.

31. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-27, где безъядерная клетка способна активировать CD8+ Т-клетку.

32. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-27, где безъядерная клетка способна размножить CD8+ Т-клетку.

33. Безъядерная клетка по п. 31 или 32, где CD8+ Т-клетка представляет собой Т-клетку памяти.

34. Безъядерная клетка по любому из пп. 1-32, которая представляет собой эритроидную клетку.

35. Безъядерная клетка по п. 34, где эритроидная клетка представляет собой ретикулоцит.

36. Безъядерная клетка по п. 34, где эритроидная клетка представляет собой эритроцит.

37. Сконструированная безъядерная клетка, содержащая первый экзогенный стимулирующий полипептид, где первый экзогенный стимулирующий полипептид содержит полипептид интерлейкин 15 (IL-15) или его фрагмент и внеклеточную часть полипептида рецептор альфа интерлейкина-15 (IL-15RA) или его фрагмента.

38. Сконструированная безъядерная клетка по п. 37, где полипептид IL-15 и внеклеточная часть полипептида IL-15RA представлены в виде комплекса.

39. Сконструированная безъядерная клетка по п. 37 или 38, где первый экзогенный стимулирующий полипептид содержит полипептид слияния.

40. Сконструированная безъядерная клетка по любому из пп. 37-39, где полипептид IL-15 или его фрагмент связан линкером с внеклеточной частью полипептида IL-15RA или его фрагмента.

41. Сконструированная безъядерная клетка по п. 40, где линкер содержит GGGGS (SEQ ID NO: 11).
42. Сконструированная безъядерная клетка по п. 40 или 41, где линкер содержит линкер (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 12).
43. Сконструированная безъядерная клетка по любому из пп. 39-42, где полипептид слияния содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID № 1.
44. Сконструированная безъядерная клетка по любому из пп. 39-42, где полипептид слияния содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID № 29 или SEQ ID № 37.
45. Сконструированная безъядерная клетка по п. 37, где первый экзогенный стимулирующий полипептид содержит полипептид IL-15 или его фрагмент и домен sushi связывания рецептора альфа IL-15.
46. Сконструированная безъядерная клетка по п. 45, где полипептид IL-15 или его фрагмент и домен sushi связывания рецептора альфа IL-15 представлены в виде комплекса.
47. Сконструированная безъядерная клетка по п. 45 или 46, где полипептид IL-15 или его фрагмент и домен sushi связывания рецептора альфа IL-15 представлены в виде полипептида слияния.
48. Сконструированная безъядерная клетка по любому из пп. 45-47, где полипептид IL-15 или его фрагмент связан линкером с доменом sushi связывания рецептора альфа IL-15.
49. Сконструированная безъядерная клетка по п. 48, где линкер содержит GGGGS (SEQ ID NO: 11).
50. Сконструированная безъядерная клетка по п. 48 или 49, где линкер содержит линкер (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 12).
51. Сконструированная безъядерная клетка по п. 47, где полипептид слияния содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID № 2.
52. Сконструированная безъядерная клетка по п. 47, где полипептид слияния содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID № 31.
53. Сконструированная безъядерная клетка по п. 37, дополнительно содержащая второй экзогенный стимулирующий полипептид.
54. Сконструированная безъядерная клетка по п. 53, где второй экзогенный стимулирующий полипептид содержит 4-1BBL.
55. Сконструированная безъядерная клетка по п. 54, где второй экзогенный стимулирующий полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID № 41.
56. Сконструированная безъядерная клетка по п. 54, где второй экзогенный стимулирующий полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID № 43.
57. Сконструированная безъядерная клетка по п. 53, где второй экзогенный стимулирующий полипептид содержит IL-12.
58. Сконструированная безъядерная клетка по п. 57, где второй экзогенный стимулирующий полипептид содержит полипептид слияния, содержащий субъединицы p40 и p35 IL-12.
59. Сконструированная безъядерная клетка по п. 57 или 58, где второй экзогенный стимулирующий полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID № 37.

60. Сконструированная безъядерная клетка по п. 57 или 58, где второй экзогенный стимулирующий полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID № 55.
61. Сконструированная безъядерная клетка по любому из пп. 37-60, дополнительно содержащая один или более экзогенных стимулирующих полипептидов, выбираемых из группы, состоящей из: IL-1, IL-2, IL-12, IL-18, IL-21, интерферона альфа (IFN α), полиовирусного рецептора (PVR/CD155), CD48, человеческого лейкоцитарного антигена (HLA)-A, HLA-C, HLA-G, гепарансульфата (HS), HLA-E, CpG, иммуноглобулина G (IgG), белков, связывающих UL16 (ULBP), белков, связанных с цепью MHC I класса (MIC), B7-H6, Nkp44L, нектин-2, антигена NK-T-B (NTBA), индуцированного активацией лектина типа C (AICL) и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1).
62. Сконструированная безъядерная клетка по п. 61, где белок представляет собой белок A, связанный с цепью MHC I класса (MICA), или белок B, связанный с цепью MHC I класса (MICB).
63. Сконструированная безъядерная клетка по любому из пп. 37-62, где один или более экзогенных стимулирующих полипептидов находятся на поверхности сконструированной безъядерной клетки.
64. Сконструированная безъядерная клетка по любому из пп. 37-63, где экзогенных стимулирующих полипептидов, достаточных для стимуляции иммунной клетки-киллера.
65. Сконструированная безъядерная клетка по любому из пп. 37-64, где первый экзогенный стимулирующий полипептид присутствует в количестве копий более 10^4 , 10^5 или 10^6 .
66. Сконструированная безъядерная клетка по любому из пп. 53-60, где первый экзогенный стимулирующий полипептид присутствует в количестве копий не более, чем на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% больше, или не более, чем в 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 или 1000 раз больше количества копий второго экзогенного стимулирующего полипептида.
67. Сконструированная безъядерная клетка по любому из пп. 53-60, где второй экзогенный стимулирующий полипептид присутствует в количестве копий не более, чем на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% больше, или не более, чем в 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 или 1000 раз больше количества копий первого экзогенного стимулирующего полипептида.
68. Сконструированная безъядерная клетка по любому из пп. 53-60, где первый экзогенный стимулирующий полипептид и второй экзогенный стимулирующий полипептид имеют количественное соотношение приблизительно 1:1, от приблизительно 2:1 до 1:2, от приблизительно 5:1 до 1:5, от приблизительно 10:1 до 1:10, от приблизительно 20:1 до 1:20, от приблизительно 50:1 до 1:50 или от приблизительно 100:1 до 1:100 по массе или по количеству копий.
69. Сконструированная безъядерная клетка по п. 37, дополнительно содержащая второй экзогенный полипептид и третий экзогенный стимулирующий полипептид.
70. Сконструированная безъядерная клетка по любому из пп. 53-69, где сконструированная безъядерная клетка содержит два экзогенных стимулирующих полипептида, где два экзогенных стимулирующих полипептида представлены в виде полипептида слияния.
71. Сконструированная безъядерная клетка по любому из пп. 53-69, где сконструированная безъядерная клетка содержит три экзогенных стимулирующих полипептида, где три экзогенных стимулирующих полипептида представлены в виде полипептида слияния.
72. Сконструированная безъядерная клетка по любому из пп. 37-71, где один или

иммунной клетки-киллера со сконструированной безъядерной клеткой по любому из пп. 1-108 в количестве, эффективном для стимуляции иммунной клетки-киллера.

110. Способ по п. 109, где иммунной клеткой-киллером является НК-клетка.

111. Способ по п. 109, где иммунной клеткой-киллером является CD8+ Т-клетка.

112. Способ по п. 110, где стимуляция включает в себя активацию НК-клетки.

113. Способ по п. 110, где стимуляция включает в себя размножение НК-клеток.

114. Способ по п. 111, где стимуляция включает в себя активацию CD8+ Т-клетки.

115. Способ по п. 111, где стимуляция включает в себя размножение CD8+ Т-клетки.

116. Способ по п. 111, где CD8+ Т-клетка представляет собой Т-клетку памяти.

117. Способ по любому из пп. 109-116, где введение в контакт проводят *in vivo*.

118. Способ по любому из пп. 109-116, где введение в контакт проводят *ex vivo*.

119. Способ по любому из пп. 109-116, где введение в контакт проводят *in vitro*.

120. Способ по п. 109, где способ дополнительно включает введение

сконструированной безъядерной клетки субъекту, нуждающемуся в активации иммунной клетки-киллера.

121. Способ по п. 120, где субъект болен раком.

122. Способ по п. 121, где рак характеризуется низкой презентацией МНС I класса.

123. Способ по п. 121, где рак содержит чувствительную к PD-1 опухоль.

124. Способ по п. 121, где рак содержит опухоли с высокой мутационной нагрузкой.

125. Способ по п. 122, где субъекта лечат с помощью химиотерапевтического средства, которое снижает презентацию МНС I класса.

126. Способ по п. 121, где рак выбирают из рака легких, печеночноклеточного рака, меланомы и лимфомы.

127. Способ по п. 121, где рак представляет собой лимфому, а лимфома представляет собой лимфому Ходжкина или неходжкинскую лимфому.

128. Способ по п. 120, где субъект болеет инфекционным заболеванием.

129. Способ по п. 128, где инфекционные заболевания вызваны вирусной инфекцией.

130. Способ по п. 129, где вирусная инфекция характеризуется низкой презентацией МНС I класса.

131. Способ по п. 129, где вирусную инфекцию вызывает вирус, выбираемый из группы, состоящей из: аденовируса, вируса Эпштейна-Барр (EBV), вируса гепатита В (HBV), туберкулеза, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса простого герпеса (HSV), вируса папилломы и цитомегаловируса.

132. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту сконструированной безъядерной клетки по любому из пп. 1-108 в количестве, эффективном для лечения рака у субъекта.

133. Способ по п. 132, где рак характеризуется низкой презентацией МНС I класса.

134. Способ по п. 132, где рак содержит чувствительную к PD-1 опухоль.

135. Способ по п. 132, где рак содержит опухоль с высокой мутационной нагрузкой.

136. Способ по п. 132, где рак выбирают из рака легких, печеночноклеточного рака, меланомы и лимфомы.

137. Способ по п. 132, где рак представляет собой лимфому, и лимфому выбирают из лимфомы Ходжкина или неходжкинской лимфомы.

138. Способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту сконструированной безъядерной клетки по любому из пп. 1-108 в количестве, эффективном для лечения инфекционного заболевания у субъекта.

139. Способ по п. 138, где инфекционные заболевания вызваны вирусной инфекцией.

140. Способ по п. 139, где вирусная инфекция характеризуется понижающей регуляцией презентации МНС I.

141. Способ по п. 139, где вирусную инфекцию вызывает вирус, выбираемый из

аденовируса, вируса Эпштейна-Барр (EBV), вируса гепатита В (HBV), туберкулеза, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса простого герпеса (HSV), вируса папилломы и цитомегаловируса.

142. Безъядерная эритроидная клетка, сконструированная для стимуляции иммунной клетки, где иммунная клетка представляет собой клетку-киллер, содержащую два или более экзогенных стимулирующих полипептида на поверхности сконструированной безъядерной клетки, где двух или более экзогенных стимулирующих полипептидов достаточно для стимуляции иммунной клетки, получаемой в процессе, включающем:

введение в ядродержащую эритроидную клетку двух или более экзогенных нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует один из экзогенных стимулирующих полипептидов; и

культивирование ядродержащей эритроидной клетки в условиях, подходящих для энуклиации ядродержащей эритроидной клетки и для получения двух или более экзогенных стимулирующих полипептидов.

143. Сконструированная безъядерная эритроидная клетка, содержащая первый экзогенный стимулирующий полипептид, где первый экзогенный стимулирующий полипептид содержит полипептид IL-15 или его фрагмент, связанный линкером с внеклеточной частью полипептида IL-15RA или его фрагмента для образования слияния IL-15/IL-15RA, получаемая в процессе, включающем:

введение в ядродержащую эритроидную клетку экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей слияние IL-15/IL-15RA; и

культивирование ядродержащей эритроидной клетки в условиях, подходящих для энуклиации ядродержащей эритроидной клетки и для получения слияния IL-15/IL-15RA.

144. Сконструированная безъядерная эритроидная клетка, содержащая:

i. Первый экзогенный стимулирующий полипептид, где первый экзогенный стимулирующий полипептид содержит полипептид IL-15 или его фрагмент, связанный линкером с внеклеточной частью полипептида IL-15RA или его фрагмента для образования слияния IL-15/IL-15RA.; и

ii. второй экзогенный стимулирующий полипептид, где второй экзогенный стимулирующий полипептид содержит 4-1BBL или его фрагмент, причем клетку получают с помощью процесса, включающего:

i. введение в ядродержащую эритроидную клетку первой экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей первый экзогенный стимулирующий полипептид;

ii. введение в ядродержащую эритроидную клетку второй экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей второй экзогенный стимулирующий полипептид; и

iii. Культивирование ядродержащей эритроидной клетки в условиях, подходящих для энуклиации ядродержащей эритроидной клетки и для получения первого экзогенного стимулирующего полипептида и второго экзогенного стимулирующего полипептида.

145. Сконструированная безъядерная эритроидная клетка, содержащая:

i. Первый экзогенный стимулирующий полипептид, где первый экзогенный стимулирующий полипептид содержит полипептид IL-15 или его фрагмент, связанный линкером с внеклеточной частью полипептида IL-15RA или его фрагмента для образования слияния IL-15/IL-15RA; и

ii. второй экзогенный стимулирующий полипептид, где второй экзогенный стимулирующий полипептид содержит IL-12 или его фрагмент, причем клетку получают с помощью процесса, включающего:

i. введение в ядродержащую эритроидную клетку первой экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей первый экзогенный стимулирующий полипептид;

липофекции и лентивирусного вектора.

155. Способ по любому из пп. 142-149, где стадия введения включает введение экзогенной нуклеиновой кислоты путем трансфекции лентивирусного вектора.

156. Способ по п. 154 или 155, где лентивирусный вектор содержит промотор, выбираемый из группы, состоящей из: промотора бета-глобина, промотора вируса стволовых клеток мышей (MSCV), промотора вируса лейкоза гиббонов (MSCV), промотора человеческого фактора элонгации-1альфа (EF1альфа), немедленно-раннего энхансера CAG CMV и промотора бета-актина кур (CAG) и человеческой фосфолицераткиназы 1 (PGK).

A 4 2 6 2 3 1 0 2 0 2 R U

R U 2 0 2 0 1 3 2 9 2 4 A