



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2017134441, 11.03.2016

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
11.03.2015 DK PA201570138(43) Дата публикации заявки: 03.04.2019 Бюл. №  
10(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 03.10.2017(86) Заявка РСТ:  
EP 2016/055332 (11.03.2016)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2016/142532 (15.09.2016)

Адрес для переписки:

105082, Москва, Спартаковский пер., 2, стр. 1,  
секция 1, этаж 3, ЕВРОМАРКПАТ

(71) Заявитель(и):

**СЕЛЛЕКТИС (FR)**

(72) Автор(ы):

**ДЮШАТО Филипп (FR),  
КАБАНИОЛЬ Жан-Пьер (FR),  
ВАЛТОН Жульен (US),  
ПУАРО Лорен (FR)****(54) СПОСОБЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ АЛЛОГЕННЫХ Т-КЛЕТОК ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ИХ  
ПЕРСИСТЕНЦИИ И/ИЛИ ПРИЖИВЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ****(57) Формула изобретения**

1. Способ повышения персистенции и/или приживления аллогенных иммунных клеток в присутствии иммунных клеток хозяина, включающий:

а) получение аллогенных клеток;

б) модификацию указанных клеток путем инактивации по меньшей мере одного эндогенного гена, кодирующего полипептид, который участвует в реакции распознавания своего и чужого антигена;

и

в) контакт указанных иммунных клеток хозяина по меньшей мере с одним неэндогенным иммуносупрессивным полипептидом, который способен предупреждать их взаимодействие с аллогенными иммунными клетками.

2. Способ по п. 1, в котором полипептид на стадии б) выбран из TCR, MHC компонента класса I, b-2 микроглобулина (B2M), TAP1 и крупной мультифункциональной протеазы 2.

3. Способ по п. 1 или 2, в котором указанный иммуносупрессивный полипептид на стадии в) присутствует в связанной с мембраной форме и/или в секретируемой форме.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором стадию в) осуществляют путем экспрессии в указанных иммунных клетках, по меньшей мере, одного неэндогенного полинуклеотида, кодирующего один неэндогенный иммуносупрессивный полипептид,

связанный с мембранной поверхностью указанных иммунных клеток.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором одним неэндогенным иммуносупрессивным полипептидом, связанным с мембранной поверхностью указанных иммунных клеток, является лиганд PD-L1.

6. Способ по п. 5, в котором молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая экспрессируемый лиганд PD-L1 в связанной с мембраной форме идентичен по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% и более предпочтительно на 95% SEQ ID NO: 18.

7. Способ по любому из пп. 1-3, в котором иммуносупрессивный полипептид присутствует в секретируемой форме.

8. Способ по любому из пп. 1-3 или 7, в котором стадию в) осуществляют путем экспрессии в иммунных клетках, по меньшей мере, одного неэндогенного полинуклеотида, кодирующего один неэндогенный иммуносупрессивный полипептид в секретируемой форме в указанных иммунных клетках.

9. Способ по п. 8, в котором молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая экспрессируемые CTLA-4 иммуноглобулины, идентична по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% и более предпочтительно на 95% идентична SEQ ID NO: 16-17.

10. Способ по любому из пп. 1-9, в котором стадию в) осуществляют путем контакта указанных иммунных клеток хозяина как с неэндогенным иммуносупрессивным полипептидом лигандом PD-L1, так и с CTLA-4 иммуноглобулинами.

11. Способ по п. 10, в котором стадию в) осуществляют путем экспрессии в иммунных клетках как неэндогенного иммуносупрессивного полипептида лиганда PD-L1, так и CTLA-4 иммуноглобулинов.

12. Способ по любому из пп. 1-3, в котором секреция по меньшей мере одного неэндогенного иммуносупрессивного полипептида является секрецией лиганда PD-L1 в секретируемой форме.

13. Способ по любому из пп. 1-12, в котором молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие лиганд PD-L1 в связанной с мембраной форме и CTLA-4 иммуноглобулины, экспрессируемые в аллогенных иммунных клетках, идентичны по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% и более предпочтительно на 95% SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 16-17, соответственно.

14. Способ по п. 1 или 2, в котором иммунные клетки являются первичными клетками.

15. Способ по любому из пп. 1-14, в котором стадия в) дополнительно содержит инактивацию экспрессии гена PD-1.

16. Способ по любому из пп. 1-14, в котором стадию в) осуществляют путем экспрессии в иммунных клетках, по меньшей мере, одного неэндогенного полинуклеотида, кодирующего лиганд PD-L1 в связанной с мембраной форме, и дополнительную модификацию указанных аллогенных клеток осуществляют путем инактивации экспрессии гена PD-1.

17. Способ по любому из пп. 1-14, в котором стадию в) осуществляют путем экспрессии в иммунных клетках, по меньшей мере, одного неэндогенного полинуклеотида, направляющего секрецию CTLA4 Ig, и дополнительную модификацию указанных аллогенных клеток осуществляют путем инактивации экспрессии гена PD-1.

18. Способ по любому из пп. 1-14, в котором стадию в) осуществляют путем экспрессии в иммунных клетках как неэндогенного иммуносупрессивного полипептида лиганда PD-L1, так и CTLA-4 иммуноглобулины, и дополнительную модификацию указанных аллогенных иммунных клеток осуществляют путем инактивации экспрессии гена PD-1.

19. Способ по любому из пп. 15-18, в котором инактивацию гена PD-1 осуществляют

A  
1  
4  
4  
4  
1  
3  
4  
4  
1  
7  
1  
0  
1  
7  
2  
0  
1  
7  
1  
3  
4  
4  
1  
A  
R  
U

R  
U  
2  
0  
1  
7  
1  
3  
4  
4  
1  
A

путем применения полинуклеотида, кодирующего TALE-нуклеазы SEQ ID NO: 11-12 и 13-14.

20. Способ по любому из пп. 1-4, в котором полипептид на стадии в) выбран из PD-L1, CTLA-4, вирусного МНС гомолога, лиганда NKG2D, вирусного иммуносупрессивного домена (ISU) env или вирусного белка FP.

21. Способ по любому из пп. 1-19, в котором стадию б) осуществляют путем инактивации B2M и стадию в) осуществляют путем экспрессии лиганда PD-L1 в указанных аллогенных иммунных клетках.

22. Способ по любому из пп. 1-19, в котором стадию б) осуществляют путем инактивации TCR и стадию в) осуществляют путем экспрессии лиганда PD-L1 указанными аллогенными иммунными клетками.

23. Способ по любому из пп. 1-19, в котором стадию б) осуществляют путем инактивации B2M и стадию в) осуществляют путем экспрессии лиганда NKG2G указанными аллогенными иммунными клетками.

24. Способ по любому из пп. 1-19, в котором стадию б) осуществляют путем инактивации B2M и стадию в) осуществляют путем экспрессии вирусного МНС гомолога белка UL18 указанными аллогенными иммунными клетками.

25. Способ по любому из пп. 1-19, в котором стадию б) осуществляют путем инактивации TCR и стадию в) осуществляют путем экспрессии вирусного МНС гомолога белка UL18 указанными аллогенными иммунными клетками.

26. Способ по любому из пп. 1-25, в котором стадию в) осуществляют путем инкубацию иммунна по меньшей мере с одним неэндогенным иммуносупрессивным полипептидом.

27. Способ по п. 26, в котором неэндогенным иммуносупрессивным полипептидом являются анти-CD80 или анти-CD86 моноклональные антитела.

28. Способ по любому из пп. 1-27, в котором инактивацию гена на стадии б) осуществляют путем применения TAL-нуклеазы, мегануклеазы, цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN) или РНК-направляемой эндонуклеазы.

29. Способ по п. 28, в котором инактивацию гена на стадии б) осуществляют, используя TAL-нуклеазу.

30. Способ по любому из пп. 2, 22 или 25, в котором инактивацию гена на стадии б) осуществляют путем применения молекулы нуклеиновой кислоты, которая ингибирует экспрессию гена, кодирующего TCR.

31. Способ по п. 30, в котором инактивацию гена TCR осуществляют путем применения TALE-нуклеаз SEQ ID NO: 52-53, 55-56, 62-63 и 65-66.

32. Способ по любому из пп. 2 или 21-24, в котором инактивацию гена на стадии б) осуществляют путем применения молекулы нуклеиновой кислоты, которая ингибирует экспрессию гена, кодирующего B2M.

33. Способ по п. 32, в котором инактивацию гена B2M осуществляют путем применения TALE-нуклеаз SEQ ID NO: 2-3, 5-6 и 8-9.

34. Способ по любому из пп. 1-33, дополнительно включающий стадию г), на которой осуществляют интродукцию в Т-клетки экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), направленный против по меньшей мере одного антигена, экспрессированного на поверхности злокачественной или инфицированной клетки.

35. Способ по п. 34, в котором химерный антигенный рецептор включает фрагмент scFv (цепочки VH и VL), обладающий антигенной целевой последовательностью, идентичной более чем на 80%, предпочтительно более чем на 90% и более предпочтительно более чем на 95% SEQ ID NO 67 (антиген CD19), SEQ ID NO 68 (антиген CD38), SEQ ID NO 69 (антиген CD123), SEQ ID NO 70 (антиген CS1), SEQ ID NO 71

А  
1  
4  
4  
4  
1  
3  
4  
4  
1  
7  
1  
0  
2  
0  
1  
7  
1  
3  
4  
4  
1  
А  
R  
U

RU  
201713441  
А

(антиген BCMA), SEQ ID NO 72 (антиген FLT-3), SEQ ID NO 73 (антиген CD33), SEQ ID NO 74 (антиген CD70), SEQ ID NO 75 (антиген EGFR-3v) и SEQ ID NO 76 (антиген WT1).

36. Сконструированные, предпочтительно выделенные, Т-клетки, получаемые способом любому из пп. 1-35.

37. Сконструированные Т-клетки по п. 36 для применения в качестве лекарственного средства.

38. Сконструированные Т-клетки по любому из пп. 36 и 37 для применения в лечении рака или вирусной инфекции.

39. Сконструированные Т-клетки по любому из пп. 36-38, которые происходят от пациента, проходящего лечению.

40. Сконструированные Т-клетки по любому из пп. 36-39, которые происходят от донора.

41. Композиция, включающая по меньшей мере одну сконструированную Т-клетку по любому из пп. 36-40.

RU 2017134441 A

RU 2017134441 A