

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202191463 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.10.13

(22) Дата подачи заявки  
2019.11.27

(51) Int. Cl. C12N 15/10 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01)  
C12N 15/86 (2006.01)  
A61K 35/17 (2015.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
C12N 5/078 (2010.01)  
C12N 9/22 (2006.01)

(54) МУЛЬТИПЛЕКСНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА ИММУННЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ И УСТОЙЧИВОСТИ К ПОДАВЛЯЮЩЕЙ СРЕДЕ

(31) 62/772,406

(32) 2018.11.28

(33) US

(86) PCT/US2019/063641

(87) WO 2020/113029 2020.06.04

(88) 2020.07.09

(71) Заявитель:

БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС  
СИСТЕМ (US)

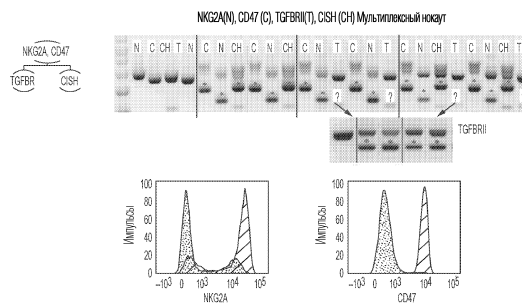
(72) Изобретатель:

Базар Рафет, Шполл Элизабет,  
Резвани Кэйти (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем документе предлагаются способы для получения иммунных клеток с разрушением нескольких генов. Дополнительно предлагаются способы для вставки химерного антигенного рецептора в генетический локус иммунной клетки.



A1

202191463

202191463

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 569084EA/042

### **МУЛЬТИПЛЕКСНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА ИММУННЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ И УСТОЙЧИВОСТИ К ПОДАВЛЯЮЩЕЙ СРЕДЕ**

Уровень Техники

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США с серийным № 62/772406, поданной 28 ноября 2018 года, которая полностью включена в настоящий документ в виде ссылки.

1. Область техники

[0002] Настоящее изобретение в основном относится к области иммунологии, клеточной биологии, молекулярной биологии и медицины. Более конкретно, изобретение относится к мультиплексному редактированию иммунных клеток и способам его применения.

2. Описание связанной области

[0003] Клеточная иммунотерапия открывает большие перспективы для лечения злокачественной опухоли. Однако большинство иммунотерапевтических подходов, применяемых по отдельности, имеют ограниченную эффективность против большинства злокачественных новообразований, особенно солидных опухолей. Причины этой ограниченной эффективности включают снижение экспрессии опухолевых антигенов на поверхности опухолевых клеток, что снижает их обнаружение иммунной системой, экспрессию лигандов для ингибирующих рецепторов, таких как PD1, NKG2A, TIGIT или CISH, которые индуцируют инактивацию иммунных клеток; и индукцию клеток (например, регуляторных Т-клеток или миелоидных супрессорных клеток) в микроокружении, выделяющих вещества, такие как трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ) и аденозин, которые подавляют иммунный ответ и способствуют клеточной пролиферации и выживанию опухоли. Таким образом, существует неудовлетворенная потребность в улучшенных способах клеточной иммунотерапии.

Сущность

[0004] Изобретение предлагает композиции и способы, которые относятся к иммунотерапии злокачественной опухоли, в частности, включающей сконструированные иммунные клетки. Конкретные варианты осуществления касаются определенных иммунных клеток, которые были модифицированы руками человека так, чтобы они не экспрессировали или имели пониженную экспрессию одного, двух или более генов, и в конкретных случаях клетки с такой модификацией/модификациями также экспрессируют один или более гетерологичных белков, включая неприродные белки, такие как антигенные рецепторы. Также изобретение относится к способам получения неприродных иммунных клеток. В некоторых случаях введение гетерологичного антигенного рецептора происходит в геномном локусе гена, экспрессия которого снижается или элиминируется.

[0005] В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к

способу *in vitro* для разрушения, по меньшей мере, двух генов в иммунной клетке, где, по меньшей мере, два гена выбраны из группы, состоящей из NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, CD7, и их сочетания. В конкретных аспектах, разрушены три, четыре, пять, шесть или более генов. В конкретных аспектах, разрушение двух или более генов происходит одновременно, например, на одном и том же этапе способа. Способ может включать введение направляющей РНК (гРНК) для каждого гена в иммунную клетку.

[0006] Способ может включать нокдаун конкретных комбинаций генов, таких как следующие, например: (a) NKG2A и CISH, (b) NKG2A и TGFBR2, (c) CISH и TGFBR2, (d) TIGIT и FOXO1, (e) TIGIT и TGFBR2, (f) CD96 и FOXO1, (g) CD96 и TGFBR2, (h) FOXO1 и TGFBR2, (i) CD96 и TIGIT, (j) CISH и TIGIT, (k) TIM3 и CISH, (l) TIM3 и TGFBR2, (m) FOXO1 и TGFBR2, (n) TIM3 и TIGIT, (o) SIGLEC7 и CISH, (p) SIGLEC7 и TGFBR2, (q) CD47 и CISH, (r) CD47 и TGFBR2, (s) SIRPA и CISH, (t) SIRPA и TGFBR2, (u) CD47 и TIGIT, (v) CD47 и SIRPA, (w) A2AR и CISH, (x) A2AR и TGFBR2, (y) ADAM17 и CISH, (z) TGFBR2 и ADAM17, (a) A2AR и TIGIT, (b) SHP1 и CISH, (c) CISH и TGFBR2, (d) SHP1 и TGFBR2, (e) SHP1 и TIGIT, или (f) SHP1 и TIM3. Способ может включать нокдаун (1) NKG2A, CISH и TGFBR2, (2) TIGIT, FOXO1 и TGFBR2, (3) TGFBR2, CD96 и TIGIT, (4) TGFBR2, CISH и TIGIT, (5) TIM3, CISH и TGFBR2, (6) CD96, FOXO1 и TGFBR2, (7) TGFBR2, TIM3 и TIGIT, (8) SIGLEC7, CISH и TGFBR2, (9) CD47, CISH и TGFBR2, (10) SIRPA, CISH и TGFBR2, (11) TGFBR2, CD47 и TIGIT, (12) TGFBR2, CD47 и SIRPA, (13) A2AR, CISH и TGFBR2, (14) TGFBR2, CISH и ADAM17, (15) TGFBR2, TIM3 и TIGIT, (16) TGFBR2, A2AR и TIGIT, (17) SHP1, CISH и TGFBR2, (18) TGFBR2, CISH и SHP1, (19) TGFBR2, SHP1 и TIGIT, или (20) TGFBR2, SHP1 и TIM3. Любую из вышеуказанных подгрупп можно комбинировать со второй подгруппой, как описано выше. Например, любую одну из подгрупп a-j1 можно комбинировать с любой одной или более из других подгрупп a-j1, любую одну или более из подгрупп a-j1 можно комбинировать с любой одной или более из других подгрупп 1-23 или любую одну или более из подгрупп 1-23 можно комбинировать с любой одной или более из других подгрупп 1-23.

[0007] В некоторых аспектах, способ дополнительно включает введение в клетку РНК-направляемой эндонуклеазы, такой как Cas9. Введение РНК-направляемой эндонуклеазы может включать введение в иммунную клетку нуклеиновой кислоты, такой как мРНК, кодирующей РНК-направляемую эндонуклеазу.

[0008] В определенных аспектах, иммунная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, В-клетку, макрофаг, НК-Т-клетку или стволовую клетку. В альтернативных случаях иммунная клетка не является Т-клеткой, в том числе и CAR-Т-клеткой. В некоторых аспектах иммунная клетка сконструирована так, чтобы экспрессировать один или более химерных антигенных рецепторов (CAR) и/или один или более Т-клеточных рецепторов (TCR). Иммунная клетка может быть вирус-специфической, такой как вирус-

специфическая Т-клетка. Т-клетка может быть регуляторной Т-клеткой. В-клетка может быть регуляторной В-клеткой. В некоторых аспектах стволовая клетка представляет собой мезенхимальную стволовую клетку (MSC) или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPS). В конкретных аспектах, Т-клетка представляет собой CD8<sup>+</sup> Т-клетку, CD4<sup>+</sup> Т-клетку или гамма-дельта Т-клетку. Иммунная клетка может быть выделена из периферической крови, пуповинной крови, костного мозга или их смеси. В некоторых аспектах, пуповинная кровь объединена из 2-х или более отдельных единиц пуповинной крови.

[0009] В некоторых аспектах этап введения включает трансфекцию или трансдукцию. Например, введение включает электропорацию, которая может выполняться более одного раза, такую как как два или три раунда электропорации. В некоторых аспектах, первая группа гРНК CRISPR вводится в первый раунд электропорации, а вторая группа гРНК CRISPR вводится во втором раунде электропорации. В конкретных случаях первая группа гРНК CRISPR отличается от второй группы гРНК CRISPR. В конкретных аспектах, первая группа и/или вторая группа гРНК CRISPR включают 1, 2, 3 или 4 или более гРНК CRISPR. В некоторых аспектах две гРНК CRISPR вводят в первом раунде электропорации, а две отличающихся гРНК CRISPR вводят во втором раунде электропорации. В конкретных вариантах осуществления группа гРНК CRISPR включает группу гРНК, по меньшей мере две из которых нацелены на различные гены; в альтернативных вариантах осуществления каждая группа гРНК нацелена на разные гены.

[0010] В конкретных аспектах, способ включает разрушение NKG2A, CD47, TGF $\beta$ 2 и CISH; NKG2A, CISH, TGF $\beta$ 2 и ADORA2; NKG2A, TGF $\beta$ 2 и CISH; TIGIT, CD96, CISH и ADORA2; или ADAM17, TGF $\beta$ 2, NKG2A и SHP1.

[0011] В некоторых аспектах разрушение приводит к усилению противоопухолевой цитотоксичности, пролиферации *in vivo*, персистенции *in vivo* и/или улучшению функции иммунной клетки. В конкретных аспектах, иммунная клетка имеет повышенную секрецию IFN- $\gamma$ , CD107 и/или TNF $\alpha$  по сравнению с клеткой с отсутствием модификации/модификаций. В некоторых аспектах иммунная клетка имеет повышенную продукцию перфорина и/или гранзима В по сравнению с клеткой с отсутствием модификации/модификаций.

[0012] В дополнительных аспектах способ дополнительно включает введение CAR и/или TCR в иммунную клетку, такое как введение нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR и/или TCR в иммунную клетку. В некоторых аспектах нуклеиновая кислота входит в состав экспрессирующего вектора, такого как ретровирусный вектор. В определенных аспектах, вектор является аденовирус-ассоциированным вектором, таким как AAV6. В некоторых аспектах вектор дополнительно содержит последовательность ингибиторного гена, такую как последовательность ингибиторного гена, выбранную из группы, состоящий из NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, CD7 и их комбинации. В

конкретных аспектах, вектор содержит направляющую РНК для ингибиторного гена. CAR может быть фланкирован гомологичными плечами для ингибиторного гена. В некоторых аспектах введение вектора, содержащего последовательность CAR, приводит к встраиванию CAR в локус ингибиторного гена, такой как экзон ингибиторного гена, в иммунной клетке, так что CAR находится под контролем эндогенного промотора ингибиторного гена. В конкретных аспектах, введение вектора дополнительно нарушает экспрессию ингибиторного гена.

[0013] В другом варианте осуществления предлагается иммунная клетка, такая как иммунная клетка из раскрытых вариантов осуществления, с нарушенной экспрессией, по меньшей мере, двух генов в иммунной клетке, продуцируемой, по меньшей мере, на этапе, включающем введение CRISPR-направляющей РНК (гРНК) для каждого гена в указанную иммунную клетку, где, по меньшей мере, два гена выбраны из группы, состоящей из NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, CD7 и их сочетания. В некоторых аспектах, разрушены три, четыре, пять, шесть или более генов.

[0014] В определенных аспектах, иммунная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, В-клетку, макрофаг, НК-Т-клетку или стволовую клетку. В некоторых аспектах иммунная клетка сконструирована так, чтобы экспрессировать химерный антигенный рецептор (CAR) и/или Т-клеточный рецептор (TCR). Иммунная клетка может быть вирус-специфической, такой как вирус-специфическая Т-клетка. Т-клетка может быть регуляторной Т-клеткой. В-клетка может быть регуляторной В-клеткой. В некоторых аспектах стволовая клетка представляет собой мезенхимальную стволовую клетку (MSC) или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPS). В конкретных аспектах, Т-клетка представляет собой CD8<sup>+</sup> Т-клетку, CD4<sup>+</sup> Т-клетку или гамма-дельта Т-клетку. Иммунная клетка может быть выделена из периферической крови, пуповинной крови, костного мозга или их смеси. В некоторых аспектах, пуповинная кровь объединена из 2-х или более отдельных единиц пуповинной крови.

[0015] В конкретных аспектах, способ включает разрушение определенных групп генов, таких как NKG2A, CD47, TGFBR2 и CISH; NKG2A, CISH, TGFBR2 и ADORA2; NKG2A, TGFBR2 и CISH; TIGIT, CD96, CISH и ADORA2; или ADAM17, TGFBR2, NKG2A и SHP1.

[0016] В некоторых аспектах разрушение приводит к усилению противоопухолевой цитотоксичности, пролиферации *in vivo*, персистенции *in vivo* и/или к улучшению функции иммунной клетки. В конкретных аспектах, иммунная клетка имеет повышенную секрецию IFN- $\gamma$ , CD107 и/или TNF $\alpha$ . В некоторых аспектах иммунная клетка имеет повышенную продукцию перфорина и/или гранзима В.

[0017] В некоторых аспектах клетка сконструирована для экспрессии CAR и/или TCR. CAR может быть вставлен в локус эндогенного ингибиторного гена клетки, такого как локус ингибиторного гена, выбранный из группы, состоящей из NKG2A, SIGLEC-7,

LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFB2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, CD7 и их комбинации. В некоторых аспектах CAR находится под контролем эндогенного промотора ингибиторного гена. В определенных аспектах CAR вставляют в локус ингибиторного гена посредством редактирования генов, опосредованного CRISPR.

[0018] В некоторых аспектах CAR включает антигенсвязывающий домен, выбранный из группы, состоящей из F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv и scFv. В определенных аспектах, CAR нацелен на один или более опухолеассоциированных антигенов, выбранных из группы, состоящей из CD19, CD319 (CS1), ROR1, CD20, раково-эмбрионального антигена, альфафетопротейна, CA-125, MUC-1, антигена эпителиальной опухоли, меланома-ассоциированного антигена, мутированного p53, мутированного gas, HER2/Neu, ERBB2, фолат-связывающего белка, оболочечного гликопротеина gp120 ВИЧ-1, оболочечного гликопротеина gp41 ВИЧ-1, GD2, CD5, CD123, CD23, CD30, CD56, c-Met, мезотелина, GD3, HERV-K, IL-11R альфа, цепи каппа, цепи лямбда, CSPG4, ERBB2, WT-1, TRAIL/DR4, VEGFR2, CD33, CD47, CLL-1, U5snRNP200, CD200, BAFF-R, BCMA, CD99, и их сочетания. В конкретных аспектах, CAR содержит, по меньшей мере, один сигнальный домен, выбранный из группы, состоящей из CD3ξ, CD28, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, FcεRIγ, ICOS/CD278, ILRB/CD122, IL-2RG/CD132, DAP12, CD70, CD40 и их сочетания. В некоторых аспектах иммунная клетка содержит один или более гетерологичных цитокинов, таких как один или более из IL-7, IL-2, IL-15, IL-12, IL-18 и IL-21. В определенных аспектах CAR также содержит суицидный ген, такой как мембраносвязанный несекретируемый мутант TNF-альфа или индуцибельную каспазу 9.

[0019] В настоящем документе дополнительно предлагается экспрессирующий вектор, кодирующий, по меньшей мере, один CAR и/или TCR, по меньшей мере, одну последовательность ингибиторного гена, и, по меньшей мере, одну гРНК. В некоторых аспектах последовательность ингибиторного гена происходит из ингибиторного гена, выбранного из группы, состоящей из NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFB2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5 и CD7. В конкретных аспектах, гРНК специфична для ингибиторного гена. В некоторых аспектах вектор представляет собой вирусный вектор, такой как вектор AAV. CAR может быть фланкирован гомологичными плечами для ингибиторного гена. В настоящем документе также предлагается клетка-хозяин, такая как клетка из вариантов осуществления, сконструированная для экспрессии вектора из вариантов осуществления. В аспектах, клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, В-клетку или стволовую клетку.

[0020] В настоящем документе также предлагается фармацевтическая композиция, содержащая популяцию иммунных клеток из раскрытых вариантов осуществления. В другом варианте осуществления предлагается композиция, содержащая популяцию клеток

из раскрытых вариантов осуществления для лечения иммунного нарушения, инфекционного заболевания и/или злокачественной опухоли.

[0021] В дополнительном варианте осуществления предлагается способ лечения заболевания или нарушения у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества иммунных клеток из раскрытых вариантов осуществления. В некоторых аспектах заболевание или нарушение представляет собой инфекционное заболевание, злокачественную опухоль, такую как солидная злокачественная опухоль или гематологическое злокачественное новообразование, или нарушение, связанное с иммунной системой. Нарушение, связанное с иммунной системой, может быть аутоиммунным нарушением, реакцией «трансплантат против хозяина», отторжением аллотрансплантата или, например, воспалительным состоянием. В некоторых аспектах нарушение, связанное с иммунной системой является воспалительным состоянием, и иммунные клетки практически не имеют экспрессии глюкокортикоидного рецептора. В определенных аспектах, иммунные клетки являются аутологичными или аллогенными по отношению к индивидууму-реципиенту.

[0022] В дополнительных аспектах, способ также включает введение, по меньшей мере, второго терапевтического средства индивидууму, получающему иммунные клетки. В некоторых аспектах, по меньшей мере, второе терапевтическое средство включает химиотерапию, иммунотерапию, хирургическое вмешательство, лучевую терапию, гормональную терапию или биотерапию. В определенных аспектах, иммунные клетки и/или, по меньшей мере, второе терапевтическое средство вводят внутривенно, интраперитонеально, интратрахеально, внутрь опухоли, внутримышечно, эндоскопически, внутрь очага поражения, чрезкожно, подкожно, регионарно или путем прямой инъекции или перфузии.

[0023] В другом варианте осуществления предлагается способ конструирования иммунной клетки для экспрессии CAR, включающий использование гРНК CRISPR для вставки CAR в локус ингибиторного гена иммунной клетки. В некоторых аспектах CAR кодируется экспрессирующим вектором, таким как ретровирусный вектор, плаزمид, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор, аденовирус-ассоциированный вирусный вектор и т.д. В определенных аспектах, вирусный вектор представляет собой аденовирус-ассоциированный вектор, такой как AAV6.

[0024] В некоторых аспектах вектор дополнительно содержит последовательность ингибиторного гена, такую как последовательность ингибиторного гена, выбранную из группы, состоящей из NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, CD7 и их комбинации. В некоторых аспектах гРНК CRISPR предназначена для ингибиторного гена. В определенных аспектах CAR фланкирован гомологичными плечами для ингибиторного гена. В конкретных аспектах, CAR вставляют в локус ингибиторного гена в любой части гена, такой как экзон ингибиторного гена. CAR может находиться под контролем

эндогенного промотора ингибиторного гена. В конкретных аспектах CAR нарушает экспрессию ингибиторного гена.

[0025] В некоторых аспектах, CAR нацелен на один или более опухолеассоциированных антигенов, выбранных из группы, состоящей из CD19, CD319 (CS1), ROR1, CD20, раково-эмбрионального антигена, альфафетопротеина, CA-125, MUC-1, антигена эпителиальной опухоли, меланома-ассоциированного антигена, мутированного p53, мутированного gas, HER2/Neu, ERBB2, фолат-связывающего белка, оболочечного гликопротеина gp120 ВИЧ-1, оболочечного гликопротеина gp41 ВИЧ-1, GD2, CD5, CD123, CD23, CD30, CD56, c-Met, мезотелина, GD3, HERV-K, IL-11R альфа, цепи каппа, цепи лямбда, CSPG4, ERBB2, WT-1, TRAIL/DR4, VEGFR2, CD33, CD47, CLL-1, U5snRNP200, CD200, BAFF-R, BCMA, CD99, и их сочетания. В конкретных аспектах, CAR содержит, по меньшей мере, один сигнальный домен, выбранный из группы, состоящей из CD3 $\xi$ , CD28, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ , ICOS/CD278, ILRB/CD122, IL-2RG/CD132, DAP12, CD70 и CD40. В некоторых аспектах вектор, кодирующий CAR, также кодирует цитокин, например, IL-7, IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21 или их сочетание. В альтернативных случаях цитокин находится в векторе, отдельном от вектора, кодирующего CAR. В определенных аспектах экспрессирующая конструкция, которая кодирует CAR, также содержит суицидный ген, такой как индуцибельная каспаза 9 или мембраносвязанный несекретируемый мутант TNF-альфа.

[0026] Кроме того, в настоящем документе предлагается иммунная клетка, по меньшей мере, с одним CAR, вставленным в ингибиторный ген иммунной клетки, такой как иммунная клетка, производящаяся настоящими способами. В настоящем документе также предлагается композиция, содержащая популяцию иммунных клеток из вариантов осуществления настоящего изобретения, такую как популяция Т-клеток, В-клеток, НК-клеток, НК-Т-клеток, макрофагов, стволовых клеток, их смесь и т.д.

[0027] В другом варианте осуществления предлагается композиция, содержащая популяцию клеток из вариантов осуществления, и в определенных вариантах осуществления популяцию используют для лечения любого заболевания, в том числе, по меньшей мере, для лечения нарушения, связанного с иммунной системой, инфекционного заболевания и/или злокачественной опухоли.

[0028] В дополнительном варианте осуществления предлагается способ лечения заболевания или нарушения у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества иммунных клеток из раскрытых вариантов осуществления. В некоторых аспектах заболевание или нарушение представляет собой инфекционное заболевание, злокачественную опухоль, такую как солидная злокачественная опухоль или гематологическое злокачественное новообразование, или нарушение, связанное с иммунной системой. Нарушение, связанное с иммунной системой, может быть аутоиммунным нарушением, реакцией «трансплантат против хозяина», отторжением аллотрансплантата и/или воспалительным состоянием в некоторых случаях. В некоторых аспектах нарушение, связанное с иммунной системой является воспалительным



состоянием, и иммунные клетки практически не имеют экспрессии глюкокортикоидного рецептора. В определенных аспектах, иммунные клетки являются аутологичными или аллогенными по отношению к индивидууму-реципиенту.

[0029] В дополнительных аспектах, способ дополнительно включает введение индивидууму, по меньшей мере, второго терапевтического средства. В некоторых аспектах, по меньшей мере, второе терапевтическое средство включает химиотерапию, иммунотерапию, хирургическое вмешательство, лучевую терапию, гормональную терапию или биотерапию. В определенных аспектах, иммунные клетки и/или, по меньшей мере, второе терапевтическое средство вводят внутривенно, интраперитонеально, интратрахеально, внутрь опухоли, внутримышечно, эндоскопически, внутрь очага поражения, чрезкожно, подкожно, регионарно или путем прямой инъекции или перфузии. Иммунные клетки и, по меньшей мере, второе терапевтическое средство можно вводить в одно и то же время или в разное время, и когда их вводят в разное время или в одно и то же время, но не в одном и том же составе, их можно вводить одним и тем же или разными путями.

[0030] Другие цели, особенности и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания. Следует понимать, однако, что подробное описание и конкретные примеры, с указанием конкретных вариантов осуществления изобретения, даны только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в рамках сущности и объема изобретения станут очевидными специалистам в данной области из этого подробного описания.

#### краткое описание ЧЕРТЕЖЕЙ

[0031] Следующие ниже чертежи составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Изобретение можно лучше понять, если обратиться к одному или более из этих чертежей в комбинации с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в настоящем документе.

[0032] ФИГ. 1: CRISPR/Cas9 опосредует эффективное разрушение нескольких генов (NKG2A, CD47, TGFBR2 и CISH) в NK-клетках. В этом наборе генов, NKG2A и CD47 были нокаутированы в первом раунде электропорации, а во втором раунде электропорации мишенями являлись CISH и TGFBR2. Эффективность нокаута была успешно подтверждена с помощью ПЦР и проточной цитометрии для обоих раундов электропорации. Красная (пики справа) и синяя (пики слева) гистограммы на потоковых панелях представляют экспрессию белка до и после нокаута CRISPR, соответственно.

[0033] ФИГ. 2: Проверка мультиплексного редактирования генов в NK-клетках с использованием другого набора генов (TIGIT (T), CD96 (C), CISH (CH), Аденозин (A)). В этом наборе генов, TIGIT и CD96 были нокаутированы в первом раунде электропорации, а во втором раунде электропорации мишенями являлись CISH и Аденозин. Эффективность нокаута была успешно подтверждена с помощью ПЦР и проточной цитометрии для обоих раундов электропорации. Красные (пики справа) и синие (пики слева) гистограммы на

поточковых панелях представляют экспрессию белка до и после нокаута CRISPR, соответственно.

[0034] ФИГ. 3. Разрушение нескольких генов (NKG2A, CD47, TGFBR2 и CISH) в НК-клетках приводит к усилению функциональности против опухолевых клеток-мишеней. Секреция IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  и CD107 усиливалась после стимуляции целевыми клеточными линиями. Проточный цитометрический анализ выработки IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  и CD107 проводили с различными НК-клетками (отредактированными по сравнению только с Cas9), совместно стимулированных целевыми клеточными линиями в течение 5 часов в присутствии Брефелдина А.

[0035] Фиг. 4А-4В: Разрушение нескольких генов (NKG2A, CD47, TGFBR2 и CISH) в НК-клетках приводит к усилению противоопухолевой цитотоксичности. (фиг. 4А) цитотоксическая активность НК-клеток с генетическим редактированием по сравнению НК-клетками только с Cas9 измеряли путем анализа высвобождения  $^{51}\text{Cr}$  против клеток К562 (фиг. 4В) После 30 минут обработки рекомбинантным TGF-В (50нг/мл) активность pSMAD измеряли проточной цитометрией. Добавление экзогенного TGF- $\beta$  не смогло вызвать активацию pSMAD в нокаутированных CAR-НК-клетках.

[0036] ФИГ. 5: НК-клетки теряют экспрессию CD16 и CD62L при стимуляции цитокином или при распознавании мишени, как показано с помощью анализа CyTOF.

[0037] ФИГ. 6. Нокаут ADAM17 в НК-клетках предотвращает отщепление CD16 и CD62L.

[0038] ФИГ. 7. Нокаут ADAM17 в НК-клетках улучшает ADCC и цитотоксичность по отношению к мишеням К562.

[0039] ФИГ. 8: Скрининг эффективности нокаута SHP1 в НК-клетках на основе FACS через 72 часа.

[0040] ФИГ. 9. Разрушение SHP1 в НК-клетках приводит к усилению противоопухолевой эффективности. НК-клетки культивировали совместно с клетками К562 или Raji в соотношении 1:1 в течение 4 часов. После инкубации клетки окрашивали аннексином V, и анализировали живые и мертвые клетки. Клетки К562 чувствительны к уничтожению НК-клетками, а клетки Raji устойчивы к уничтожению НК-клетками.

[0041] Фиг. 10А-10В: Разрушение SHP1 в НК-клетках приводит к усилению противоопухолевой эффективности (фиг. 10А). НК-клетки культивировали совместно с клетками К562 или Raji в соотношении 2:1 в течение 5 часов (фиг. 10В). Показаны проценты лизиса при различных соотношениях эффектор:мишень, процент IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и CD107a и процент живых или мертвых клеток.

[0042] ФИГ. 11. Разрушение SHP1 в клетках НК-CAR приводит к усилению противоопухолевой эффективности по оценке путем анализа апоптоза.

[0043] Фиг. 12А-12С: (фиг. 12А) Оценка эффективности нокаута NKG2A на сутки 7 на основе FACS. (фиг. 12В) Разрушение NKG2A в размноженных НК-клетках приводит к усилению противоопухолевой эффективности. (фиг. 12С) Разрушение NKG2A в клетках НК-CAR приводит к повышенной противоопухолевой эффективности против мишеней

Raji.

[0044] ФИГ. 13: Подход был подтвержден с другим набором генов - TIGIT (T), CD96 (C), CISH (CH) и Аденозин (ADORA2A) (A). Для этого набора гены, TIGIT и CD96 были нокаутированы в одном наборе NK-клеток во время первого раунда электропорации. CISH и Аденозин (ADORA2A) являлись мишенями для второго раунда нокаута в клетках TIGIT и CD96 KO. Эффективность нокаута была успешно подтверждена с помощью ПЦР и проточной цитометрии для обоих раундов электропорации. Красные (пики справа) и синие (пики слева) гистограммы на потоковых панелях представляют экспрессию белка до и после нокаута CRISPR, соответственно.

[0045] ФИГ. 14: Разрушение нескольких генов в NK-клетках приводит к усилению противоопухолевой эффективности. Чтобы оценить это, клетки с нокаутом нескольких генов (NKG2A, CISH, TGFBR2 и Аденозин (ADORA2A)) и клетки, электропорированные только с помощью cas9, использовали в качестве контроля для клеток K562 (NK-чувствительных) и клеток Raji (NK-устойчивых) в течение 5 часов. Функцию NK-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии и наблюдали увеличение TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и CD107a в KO-клетках при стимуляции целевой клеточной линии.

[0046] ФИГ. 15. Разрушение нескольких генов в NK-клетках приводит к усилению противоопухолевой эффективности. Чтобы оценить это, клетки с нокаутом по нескольким генам (NKG2A, CISH, TGFBR2) и и клетки, электропорированные только с помощью cas9, использовали в качестве контроля. Экспрессию NKG2A подтверждали проточной цитометрией. Добавление экзогенного TGF- $\beta$  не смогло вызвать активацию pSMAD в нокаутированных CAR-NK-клетках.

[0047] ФИГ. 16. Разрушение нескольких генов (NKG2A, TGF $\beta$ R2 и CISH) в NK-CAR-клетках приводит к усилению противоопухолевой эффективности.

[0048] ФИГ. 17: Нокаут TGF $\beta$ R2 защищает клетки NK-CAR от подавляющего действия TGF $\beta$ .

[0049] ФИГ. 18: Мультиплексное редактирование генов воспроизводимо с различными конструкциями NK-CAR и против разных мишеней.

[0050] ФИГ. 19: Мультиплексное редактирование генов множества ингибиторных генов поддерживает архитектуру NK и защищает клетки NK от истощения, вызванного TGF $\beta$ .

Описание иллюстративных вариантов осуществления

[0051] В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к новому подходу с использованием технологии CRISPR-Cas9 для одновременного нокаута (или нокаута) двух или более генов (например, генов (такие как те, что перечислены в таблице 1), включающих рецептор TGF $\beta$ R2, NKG2A, TIGIT и/или CISH) в человеческих иммунных клетках (например, T-клетках, NK-клетках, CAR-трансдуцированных T-клетках или CAR-трансдуцированных NK-клетках). Иммунные клетки могут быть получены из периферической крови или пуповинной крови или их сочетания.

[0052] Настоящие исследования продемонстрировали, что снижение экспрессии этих белков коррелирует с улучшенной функцией, пролиферацией и стойкостью *in vivo*, а также цитотоксичностью Т-клеток и НК-клеток. Эта стратегия также защищает Т-клетки, НК-клетки, НК-Т-клетки и iNKT-клетки от иммуносупрессивного микроокружения опухоли, которое, в основном, управляется TGF $\beta$  и аденозином. Таким образом, настоящие способы можно использовать для повышения эффективности различных продуктов адоптивной клеточной терапии (например, НК-клетки, Т-клетки, такие как вирусспецифические Т-клетки и регуляторные Т-клетки, В-клетки, такие как регуляторные В-клетки, CAR-трансдуцированные НК-клетки, CAR-Т-клетки и TCR-сконструированные Т- и НК-клетки, iNKT-клетки, NKT-клетки). Продукты адоптивной клеточной терапии можно использовать для лечения различных заболеваний, например, от злокачественных опухолей (например, гематологических или солидных злокачественных новообразований) до инфекционных заболеваний и иммунных нарушений.

[0053] В конкретных вариантах осуществления иммунные клетки экспрессируют, по меньшей мере, один CAR, и в конструировании CAR за последние несколько лет достигнуты многочисленные успехи. Фактически, CAR-CD19 показал впечатляющие клинические результаты у пациентов с В-клеточным лейкозом и лимфомой, что привело к одобрению FDA двух продуктов CAR Т за последний год. В то время как CAR-трансдуцированные Т-клетки лидируют в последние несколько лет, комплекс доклинических исследований, а также исследование фазы I/II CAR NK, проведенное заявителями, также продемонстрировало эффективность CAR-NK-клеток против злокачественной опухоли. Несмотря на достижения в области CAR-инженерии, CAR по-прежнему, в основном, трансдуцируют в Т-клетки или НК-клетки с использованием вирусных векторов, которые случайным образом интегрируются в клеточную ДНК и могут приводить к клональной экспансии, онкогенной трансформации, изменению транскрипции гена или транскрипционному молчанию. Таким образом, было бы полезно найти способ нацелить вставку CAR в конкретный локус ДНК.

[0054] Таким образом, в одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способам вставки CAR в конкретный генетический локус, такой как в локус ингибиторного гена или белка контрольной точки, с использованием CRISPR/Cas9. Встраивание CAR в локус гена также можно использовать для одновременного нарушения экспрессии генов, при этом необязательно также, при желании, передавая его под контроль промотора этого гена. В частности, настоящие способы могут направлять вставку CAR в локус ингибиторного гена, такого как гены, перечисленные в таблице 1, включая в качестве неограничивающих примеров, NKG2A, CISH, PD-1, TIGIT, TIM3, SHP1 или TGF $\beta$ 2, например с использованием вектора AAV6 и технологии CRISPR/Cas9. Вставка CAR в локус ингибиторного гена может нарушить ингибирующее действие молекулы контрольной точки (например), в то же время позволяя экспрессии CAR находиться под регуляцией промотора контрольной точки и повышаться

в микроокружении опухоли. Это подходит для применения CAR-терапии в солидных опухолях, где повышенная экспрессия молекул контрольной точки может негативно повлиять на успех CAR-терапии. Таким образом, предлагаются дополнительные способы получения адоптивных клеточных терапий, таких как Т-клетки, В-клетки, NK-, NKT- или iNKT-клетки, с использованием способа вставки CAR, который может иметь повышенный профиль безопасности.

#### Определения

[0055] Как применяют в настоящем документе, «по существу свободный от» в отношении конкретного компонента означает, что ни один из указанных компонентов не был целенаправленно составлен в композицию и/или присутствует только в качестве примеси или в незначительных количествах. Количество указанного компонента в результате любого непреднамеренного загрязнения общей композиции, таким образом, составляет значительно ниже 0,05%, предпочтительно ниже 0,01%. Наиболее предпочтительна композиция, в которой никакое количество указанного компонента не может быть обнаружено стандартными аналитическими способами.

[0056] Как применяют в настоящем описании, артикль единственного числа может означать один или более. Как применяют в настоящем документе в пункте/пунктах формулы, когда они используются в сочетании со словом «содержащий», артикли единственного числа могут означать один или более, чем один. Как применяют в настоящем документе, «другой» может означать, по меньшей мере, второй или более. Кроме того, термины «имеющий», «включающий», «содержащий» и «состоящий из» являются взаимозаменяемыми, и специалист в данной области осознает, что термины являются открытыми терминами. В конкретных вариантах осуществления аспекты изобретения могут «состоять по существу из» или «состоят из» одной или более последовательностей изобретения, например. Некоторые варианты осуществления изобретения могут состоять из или состоять по существу из одного или более элементов, этапов способов и/или способов по изобретению. Предполагается, что любой способ или композиция, описываемые в настоящем документе, могут быть реализованы в отношении любого другого способа или композиции, описываемого в настоящем документе. Объем настоящей заявки не предназначен для ограничения конкретными вариантами осуществления процесса, машины, производства, композиции материала, средств, способов и этапов, описанных в описании. Как применяют в настоящем документе, термины «или» и «и/или» используются для описания нескольких компонентов в комбинации или исключаящих 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». В частности, предполагается, что x, y или z могут быть специально исключены из варианта осуществления.

[0057] Использование термина «или» в формуле изобретения применяют для обозначения «и/или», если явно не указано, что он относится только к альтернативам, или альтернативы являются взаимоисключающими, хотя изобретение поддерживает

определение, которое относится только к альтернативам и «и/или». Как применяют в настоящем документе, «другой» может означать, по меньшей мере, второй или более. Термины «примерно», «по существу» и «приблизительно» означают, в основном, указанное значение плюс или минус 5%

[0058] Ссылка на всем протяжении данного описания на «один из вариантов осуществления», «вариант осуществления», «конкретный вариант осуществления», «связанный вариант осуществления», «определенный вариант осуществления», «дополнительный вариант осуществления» или «дальнейший вариант осуществления» или их сочетания означает, что конкретная особенность, структура или характеристика, описанная в связи с вариантом осуществления, включена, по меньшей мере, в один из вариантов осуществления настоящего изобретения. Таким образом, появление указанных выше фраз в различных местах на всем протяжении данного описания не обязательно относится к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики можно комбинировать любым подходящим образом в одном или более вариантах осуществления.

[0059] «Иммунное нарушение», «нарушение, связанное с иммунной системой» или «иммуно-опосредованное нарушение» относится к нарушению, при котором иммунный ответ играет ключевую роль в развитии или прогрессировании заболевания. Иммуно-опосредованные нарушения включают аутоиммунные нарушения, отторжение аллотрансплантата, реакцию «трансплантат против хозяина» и воспалительные и аллергические состояния.

[0060] «Иммунный ответ» представляет собой ответ клетки иммунной системы, такой как В-клетка, или Т-клетка, или клетка врожденного иммунитета, на стимул. В одном из вариантов осуществления ответ специфичен для конкретного антигена («антиген-специфический ответ»).

[0061] Как применяют в настоящем документе, термин «ингибиторный ген» относится к гену, продукт гена которого прямо или косвенно вреден для активности, пролиферации и/или персистенции одного или более типов иммунных клеток.

[0062] «Аутоиммунное заболевание» относится к заболеванию, при котором иммунная система вырабатывает иммунный ответ (например, В-клеточный или Т-клеточный ответ) против антигена, который является частью здорового хозяина (то есть аутоантигеном), с последующим повреждением тканей. Аутоантиген может происходить из клетки-хозяина или может происходить из комменсального организма, например, микроорганизмов (известных как комменсальные организмы), которые обычно колонизируют слизистые оболочки.

[0063] Как применяют в настоящем документе термин «сконструированный» относится к сущности, получаемой рукой человека, включая клетку, нуклеиновую кислоту, полипептид, вектор и т.д. По меньшей мере, в некоторых случаях сконструированный объект является синтетическим и содержит элементы, которые не присутствуют в природе или не сконфигурированы таким образом, каким они

используются в изобретении.

[0064] «Лечение» или лечение заболевания или состояния относится к выполнению протокола, который может включать введение одного или более лекарственных средств пациенту, с целью облегчить признаки или симптомы заболевания. Желательные эффекты лечения включают снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или облегчение состояния болезни, ремиссию или улучшение прогноза. Облегчение может наступить до появления признаков или симптомов заболевания или состояния, а также после их появления. Таким образом, «проведение лечения» или «лечение» может включать в себя «предотвращение» или «предупреждение» заболевания или нежелательного состояния. Кроме того, «проведение лечения» или «лечение» не требует полного облегчения признаков или симптомов, не требует исцеления и, в частности, включает протоколы, которые имеют лишь незначительное влияние на пациента.

[0065] Термин «терапевтическое преимущество» или «терапевтически эффективный» при употреблении на всем протяжении этой заявки относится к всему, что способствует или улучшает благополучие индивидуума в отношении медицинского лечения этого состояния. Это в качестве неограничивающих примеров включает уменьшение частоты или тяжести признаков или симптомов заболевания. Например, лечение злокачественной опухоли может включать, например, уменьшение размера опухоли, уменьшение инвазивности опухоли, снижение скорости роста злокачественной опухоли или предотвращение метастазирования. Лечение злокачественной опухоли может также относиться к продлению выживаемости индивидуума со злокачественной опухолью.

[0066] «Индивидуум» и «пациент» относятся к человеку или не-человеку, например, приматам, млекопитающим и позвоночным. В возможных вариантах осуществления индивидуумом является человек.

[0067] Как применяют в настоящем документе, «млекопитающее» является подходящим объектом для способа по настоящему изобретению. Животное может быть любым представителем высшего класса позвоночных Mammalia, включая людей, характеризующегося живорождением, растительностью на теле и молочными железами у женщин, выделяющими молоко для кормления детенышей. Дополнительно, млекопитающие характеризуются своей способностью поддерживать постоянную температуру тела, несмотря на меняющиеся климатические условия. Примерами млекопитающих являются люди, кошки, собаки, коровы, мыши, крысы, лошади, козы, овца и шимпанзе. Млекопитающие могут быть обозначены как «пациенты», или «субъекты», или «индивидуумы».

[0068] Фразы «фармацевтически или фармакологически приемлемые» относятся к молекулярным структурам и композициям, которые не вызывают неблагоприятных, аллергических или других нежелательных реакций при введении животному, такому как человек, при необходимости. Получение фармацевтической композиции, включающей в себя дополнительный активный ингредиент, будет понятно специалистам в данной

области в свете настоящего изобретения. Кроме того, для животных (например, человека) следует понимать, что препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, как того требует Управление биологических стандартов FDA.

[0069] Как применяют в настоящем документе, «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все водные растворители (например, воду, спиртовые/водные растворы, физиологические растворы, парентеральные носители, такие как хлорид натрия, декстроза Рингера и т.д.), не-водные растворители (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло, инъекционные органические эфиры, такие как этилолеат), диспергирующие среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные или противогрибковые средства, антиоксиданты, хелатирующие средства, и инертные газы), средства для придания изотоничности, вещества, замедляющие абсорбцию, соли, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственных средств, гели, связывающие средства, эксципиенты, дезинтеграторы, смазочные средства, подсластители, ароматизаторы, красители, вещества, восполняющие запасы питательных веществ и жидкостей, такие как материалы их сочетания, которые известны специалисту в данной области. pH и точную концентрацию различных компонентов в фармацевтической композиции корректируют в соответствии с известными параметрами.

[0070] Как применяют в настоящем документе, «разрушение» генов относится к устранению или сокращению экспрессии одного или более продуктов генов, кодируемых данными генами в клетке, по сравнению с уровнем экспрессии продукта гена в отсутствие разрушения. Типичные продукты генов включают мРНК и белковые продукты, кодируемые геном. Разрушение в одних случаях носит временный или обратимый характер, а в других случаях - необратимо. Разрушение в некоторых случаях предназначено для функционального или полноразмерного белка или мРНК, несмотря на то, что можно получать укороченный или нефункциональный продукт. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе активность или функция генов, в отличие от экспрессии, нарушена. Разрушение генов, в основном, вызывают искусственными способами, т.е. добавлением или введением соединения, молекулы, комплекса, или композиции, и/или разрушением нуклеиновой кислоты гена или связанной с геном, например, на уровне ДНК. Примеры способов разрушения генов включают в себя подавление экспрессии, нокдаун, нокаут и/или такие способы разрушения генов, как редактирование генов. Примеры включают антисмысловые технологии, такие как РНКи, миРНК, кшРНК, и/или рибозимы, которые, в основном, приводят к временному сокращению экспрессии, а также способы редактирования генов, которые приводят к целевой инактивации или разрушению генов, например, путем индукции разрывов и/или гомологичной рекомбинации. Примеры включают вставки, мутации, и делеции. Разрушение, как правило, приводит к подавлению и/или полному отсутствию экспрессии нормального продукта или продукта «дикого типа», кодируемого геном. Примерами таких



разрушений генов являются вставки, сдвиг рамки считывания и миссенс-мутации, делеции, нокин и нокаут гена или части гена, в том числе, делеции всего гена. Такие разрушения может происходить в кодирующей области, например, в одном или более экзонах, что приводит к неспособности производить полноразмерный продукт, функциональный продукт или любой продукт, например, путем вставки стоп-кодона. Такие разрушения могут также происходить в результате разрушения промотора или энхансера или другой области, влияющей на активацию транскрипции, чтобы предотвратить транскрипцию генов. Разрушение генов включает нацеливание на ген, в том числе нацеленную инактивацию генов с помощью гомологичной рекомбинации.

#### Мультиплексное редактирование генов

[0071] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к мультиплексному редактированию генов иммунной клетки любого типа. CRISPR представляет собой один из примеров, который можно использовать для нарушения экспрессии двух или более генов, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более генов в иммунной клетке. Гены можно выбирать из генов, перечисленных в таблице 1, таких как рецептор A NK-клеток (NKG2A), связывающий сиаловую кислоту Ig-подобный лектин 7 (SIGLEC-7, CD328), белок 3, активирующий лимфоцит (LAG3), Т-клеточный иммуноглобулин, член 3 муцинового семейства (TIM3, CD366, HAVCR2), цитокин-индуцируемый SH2-содержащий белок (CISH, CIS-1, SOCS), белок Forkhead Box O1 (FOXO1), рецептор 2 трансформирующего фактора роста бета (TGF $\beta$ R2), Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT), CD96, аденозиновый рецептор 2A (ADORA2), член 1 группы C подсемейства 3 ядерных рецепторов (NR3C1), Программируемая гибель клеток 1 (PD1), лиганд 1 программируемой гибели клеток 1 (PDL-1), лиганд 2 программируемой гибели клеток 1 (PDL-2), CD47, сигнальный регуляторный белок альфа (SIRPA), SH2 домен-содержащая инозитол 5-Фосфатаза 1 (SHIP1), домен 17 металлопептидазы ADAM (ADAM17), рибосомный белок S6 (RPS6), связывающий белок 1 эукариотического фактора инициации 4E (4EBP1), CD25, CD40, рецептор интерлейкина 21 (IL21R), молекула межклеточной адгезии 1 (ICAM1), CD95, CD80, CD86, рецептор интерлейкина 21 (IL10R), CD5, CD7, или могут быть другие ингибиторные гены. Редактирование генов допускает одновременное нарушение экспрессии нескольких генов.

[0072] В некоторых вариантах осуществления разрушение генов осуществляют путем разрушения в гене, такого как нокаут, вставка, миссенс-мутация или мутация сдвига рамки, такая как мутация с двухаллельным сдвигом рамки, делеция всего гена или его части, например, одного или более экзонов или его частей, таким образом, и/или нокин. Например, разрушение можно осуществлять с помощью последовательность-специфичных или нацеленных нуклеаз, включая ДНК-связывающие нацеленные нуклеазы, такие как нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN) и эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN), и РНК-направленные нуклеазы, такие как связанная с CRISPR нуклеаза (Cas), специально предназначенные для нацеливания на

последовательность генов или ее часть.

[0073] В некоторых вариантах осуществления разрушение является временным или обратимым, так что экспрессия генов восстанавливается в более позднее время. В других вариантах осуществления разрушение не является обратимым или временным, например, является постоянным.

[0074] В некоторых вариантах осуществления разрушение генов проводят путем индукции одного или более двухцепочечных разрывов и/или одного или более одноцепочечных разрывов в гене, как правило, целенаправленным образом. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечные или одноцепочечные разрывы производятся нуклеазой, например, эндонуклеазой, такой как нацеленная на ген нуклеаза. В некоторых аспектах разрывы индуцируют в кодирующей области гена, например, в экзоне. Например, в некоторых вариантах осуществления индукция происходит рядом с N-концевой частью кодирующей области, например, в первом экзоне, во втором экзоне или в последующем экзоне.

[0075] В иммунную клетку может быть введена направляющая РНК и фермент CRISPR или мРНК, кодирующая фермент CRISPR. В некоторых аспектах в клетку вводят 1, 2, 3, 4, 5 или более направляющих РНК одновременно. Например, в клетку могут быть введены одна, две или три направляющих РНК во время первой электропорации, а затем дополнительно введены одна, две или три дополнительных направляющих РНК во время второй электропорации и т.д.

[0076] В некоторых вариантах осуществления разрушение генов проводят с использованием антисмысловых способов, таких как РНК-интерференция (РНКи), малая интерферирующая РНК (миРНК), короткошпилечная РНК (кшРНК) и/или используют рибозимы для избирательного подавления или репрессии экспрессии генов. Технология миРНК представляет собой РНКи, в которой используется двухцепочечная молекула РНК, имеющая последовательность гомологичную с нуклеотидной последовательностью мРНК, которая транскрибируется из гена, и последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности. миРНК, в основном, гомологична/комплементарна одной области мРНК, которая транскрибируется из гена, или может представлять собой миРНК, включающую множество молекул РНК, которые гомологичны/комплементарны различным областям. В некоторых аспектах миРНК включает в себя полицистронную конструкцию.

[0077] В некоторых вариантах осуществления разрушение достигается с использованием ДНК-нацеленной молекулы, такой как ДНК-связывающий белок или ДНК-связывающая нуклеиновую кислоту, или содержащих их комплекса, соединения или композиции, которые специфически связываются или гибридизуются с геном. В некоторых вариантах осуществления ДНК-нацеленная молекула включает ДНК-связывающий домен, например, ДНК-связывающий домен белка цинковых пальцев (ZFP), ДНК-связывающий домен белка, подобного активатору транскрипции (TAL) или эффектора TAL (TALE) ДНК-связывающий домен коротких палиндромных повторов,

регулярно расположенных группами (CRISPR), или ДНК-связывающий домен из мегануклеазы. Связывающие домены цинкового пальца, TALE и системы CRISPR могут быть сконструированы так, чтобы связываться с predetermined нуклеотидной последовательностью, например, посредством инженерии (изменения одной или более аминокислот) области спирали распознавания природного белка цинковый палец или белка TALE. Сконструированные ДНК-связывающие белки (цинковые пальцы или TALE) представляют собой белки, не являющиеся природными. Рациональные критерии для дизайна включают применение правил замены и компьютеризированных алгоритмов для обработки информации в базе данных, хранящей информацию о существующих конструкциях ZFP и/или TALE и данные о связывании.

[0078] В случае разрушения, опосредованного CRISPR, направляющая РНК и эндонуклеаза могут быть введены в иммунные клетки любым способом, известным в данной области для обеспечения доставки внутрь клеток или субклеточных компартментов, и агенты/химикаты и/или молекулы (белки и нуклеиновые кислоты), которые можно использовать, включают в качестве неограничивающих примеров липосомальные средства доставки, полимерные носители, химические носители, липоплексы, полиплексы, дендримеры, наночастицы, эмульсию, естественный эндоцитоз или путь фагоцитоза, а также физические способы, такие как электропорация. В конкретных аспектах электропорация применяется для введения направляющей РНК и эндонуклеазы, или нуклеиновой кислоты, кодирующей эндонуклеазу.

[0079] В одном из примеров, конкретный способ, способ нокаута путем CRISPR нескольких генов может включать выделение иммунных клеток, таких как НК-клетки, из пуповинной крови или периферической крови. НК-клетки могут быть выделены и высеяны на планшеты с облученными питающими клетками, в соотношении 1:2, в качестве одного из примеров. Затем клетки можно подвергать электропорации с гРНК и Cas9 в присутствии IL-2, в концентрации 200 МЕ/мл. Среду можно заменить через сутки, в качестве одного из примеров. Через 1-3 суток НК-клетки изолируют для удаления питающих клеток, и затем трансдуцируют с помощью конструкции CAR. Затем НК-клетки можно подвергать второму нокауту CRISPR Cas9 для дополнительного гена (-ов). После электропорации, НК-клетки можно высевать вместе с питающими клетками в течение 5-9 суток.

[0080] Таблица 1: Гены для мультиплексного редактирования или нокина CAR. Указаны примеры локусов для нокина.

НК-клетки, Т-клетки, или MSC-клетки	
NKG2A	Экзон 4
SIGLEC-7	Экзон 1
LAG3	Экзон 1
TIM3	Экзон 2
CISH	Экзон 5

FOXO1	Экзон 1
TGFBR2	Экзон 5
TIGIT	Экзон 2
CD96	Экзон 2
ADORA2	Экзон 2
NR3C1	Экзон 2
PD1	Экзон 1
PDL-1	Экзон 3
PDL-2	Экзон 3
CD47	Экзон 2
SIRPA	Экзон 2
SHIP1	Экзон 1
ADAM17	Экзон 1
B2M	Экзон 2
CD16	
В-клетки или Т-клетки	
RPSS6	Экзон 2
4EBP1	Экзон 4
CD25	Экзон 3
CD40	Экзон 3
IL21R	Экзон 1
ICAM1	Экзон 4
CD95	Экзон 2
CD80	Экзон 3
CD86	Экзон 1
IL10R	Экзон 3
CD5	
CD7	Экзон 2

[0081] Таблица 2 Примеры последовательностей гРНК для нокаута генов

CISH (Экзон 4)	AGGCCACATAGTGTGCACA (гРНК 1); SEQ ID NO:1
	TGTACAGCAGTGGCTGGTGG (гРНК 2); SEQ ID NO:2
NKG2A (Экзон 4)	AACAACATATCGTTACCACAG; SEQ ID NO:3
A2AR (Экзон 3)	CTCCTCGGTGTACATCACGG (гРНК 1); SEQ ID NO:4
	AGTAGTTGGTGACGTTCTGC (гРНК 2); SEQ ID NO:5

TIGIT (Экзон 3)	ACCCTGATGGGACGTACACT; SEQ ID NO:6
CD96 (Экзон 2)	AGGCACAGTAGAAGCCGTAT; SEQ ID NO:7
TIM3 (Экзон 2)	AGACGGGCACGAGGTTCCCT; SEQ ID NO:8
SHP1 (Экзон 4)	TCACGCACAAGAAACGTCCA; SEQ ID NO:9
PD1 (Экзон 2)	CCCCTTCGGTCACCACGAGC; SEQ ID NO:10
PDL1 (Экзон 3)	ATTTACTGTACGGTTCCCA; SEQ ID NO:11
PDL2 (Экзон 3)	CCCATAGATGATTATGCAT; SEQ ID NO:12
TGFBR2 (Экзон 5)	GACGGCTGAGGAGCGGAAGA (гPHK 1); SEQ ID NO:13
	TGTGGAGGTGAGCAATCCCC (гPHK 2); SEQ ID NO:14

[0082] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки по настоящему изобретению модифицированы с изменением экспрессии двух или более генов. В некоторых вариантах осуществления изменение экспрессии гена осуществляют путем внесения разрушения в ген, такого как нокаут, вставка, миссенс-мутация или мутация со сдвигом рамки, такая как двухаллельная мутация со сдвигом рамки, делеция всего гена или его части, например, одного или более экзонов или их части таким образом, и/или нокин. В конкретных вариантах осуществления измененную экспрессию гена можно осуществлять с помощью последовательность-специфической или нацеленной нуклеазы, включая ДНК-связывающую нацеленную нуклеазу, такую как РНК-направляемую нуклеазу, такую как CRISPR-связанную нуклеазу (Cas), специально разработанную для нацеливания на последовательность гена или его часть.

[0083] В некоторых вариантах осуществления изменение экспрессии, активности и/или функции генов осуществляется путем разрушения гена. В некоторых аспектах ген модифицирован таким образом, что его экспрессия уменьшается, по меньшей мере, на 10, 20, 30 или 40%, в основном, по меньшей мере, на или приблизительно на 50, 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% по сравнению с экспрессией в отсутствие модификации гена или в отсутствие компонентов, введенных для осуществления модификации.

[0084] В некоторых вариантах осуществления разрушение является временным или обратимым, так что экспрессия генов восстанавливается позднее при желании. В других вариантах осуществления разрушение не является обратимым или временным, например, является постоянным.

[0085] В некоторых вариантах осуществления изменение генов проводят путем индукции одного или более двухцепочечных разрывов и/или одного или более одноцепочечных разрывов в гене, как правило, целенаправленным образом. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечные или одноцепочечные разрывы производятся нуклеазой, например, эндонуклеазой, такой как нацеленная на ген нуклеаза. В некоторых аспектах разрывы индуцируют в кодирующей области гена, например, в экзоне. Например, в некоторых вариантах осуществления индукция происходит рядом с N-

концевой частью кодирующей области, например, в первом экзоне, во втором экзоне или в последующем экзоне.

[0086] В некоторых аспектах, двухцепочечные или одноцепочечные разрывы подвергаются репарации посредством процесса репарации клеток, например, за счет негомологичного присоединения концов (NHEJ) или гомологично-направленной репарации (HDR). В некоторых аспектах процесс восстановления подвержен ошибкам и приводит к разрушению генов, такому как мутация со сдвигом рамки, например, двухаллельная мутация со сдвигом рамки, что может привести к полному нокауту гена. Например, в некоторых аспектах, разрушение включает в себя индуцирование делеции, мутации и/или вставки. В некоторых вариантах осуществления разрушение приводит к присутствию преждевременного стоп-кодона. В некоторых аспектах, наличие вставки, делеции, транслокации, мутации со сдвигом рамки, и/или преждевременного стоп-кодона приводит к нарушению экспрессии, активности и/или функции гена.

[0087] В некоторых вариантах осуществления изменение проводят с использованием одной или более ДНК-связывающих нуклеиновых кислот, например, изменение осуществляют через РНК-направляемую эндонуклеазу (RGEN). Например, изменение можно проводить с использованием коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, (CRISPR) и CRISPR-ассоциированных (Cas) белков. В основном, «система CRISPR» в совокупности относится к транскриптам и другим элементам, участвующим в экспрессии или направляющих активность CRISPR-ассоциированных («Cas») генов, включая последовательность, кодирующую ген Cas, последовательность *tracr* (трансактивирующую CRISPR) (например, *tracr*РНК или активную частичную *tracr*РНК), последовательность *tracr*-*mate* (охватывающая «прямой повтор» и обработанный *tracr*РНК частичный прямой повтор в отношении эндогенной системы CRISPR), направляющая последовательность (также обозначаемая как «спейсер» в отношении эндогенной системы CRISPR), и/или другие транскрипты из локуса CRISPR.

[0088] Нуклеаза CRISPR/Cas или система нуклеазы CRISPR/Cas может включать некодирующую молекулу РНК (направляющую), которая последовательность-специфически связывается с ДНК, и белком Cas (например, Cas9) с функциональностью нуклеазы (например, двумя нуклеазными доменами). Один или более элементов системы CRISPR могут происходить из системы CRISPR типа I, типа II или типа III, например, происходить из конкретного организма, содержащего эндогенную систему CRISPR, например *Streptococcus pyogenes*.

[0089] В некоторых аспектах в клетку вводят нуклеазу Cas и гРНК (включая слияние *cr*РНК, специфичной для целевой последовательности, и фиксированной *tracr*РНК). В основном, сайты-мишени на 5'-конце гРНК направляют нуклеазу в целевой сайт, например, ген, с использованием комплементарного спаривания оснований. Целевой сайт можно выбирать, основываясь на его расположении непосредственно у 5' последовательности мотива, примыкающего к протоспейсеру (PAM), как правило, NGG или NAG. В этом отношении гРНК нацелена на желаемую последовательность путем

модификации первых 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 14, 12, 11, или 10 нуклеотидов направляющей РНК, чтобы они соответствовали последовательности целевой ДНК. В основном система CRISPR характеризуется элементами, которые способствуют формированию комплекса CRISPR на участке целевой последовательности. Как правило, «целевая последовательность», в основном, относится к последовательности, для которой сконструирована комплементарная направляющая последовательность, где гибридизация между целевой последовательностью и направляющей последовательностью способствует образованию комплекса CRISPR. Не обязательно требуется полная комплементарность при условии, что комплементарность достаточна, чтобы вызвать гибридизацию и способствовать образованию комплекса CRISPR.

[0090] Система CRISPR может вызывать двухцепочечные разрывы (DSB) на целевом участке с последующими разрушениями или изменениями, как описано в настоящем документе. В других вариантах осуществления варианты Cas9, которые считаются «никазами», применяют для разрыва одиночной цепи в целевом сайте. Парные никазы можно использовать, например, для повышения специфичности, каждая из которых направляется парой разных гРНК, нацеливающих на последовательности таким образом, что при одновременном введении разрывов образуется 5'-липкий конец. В других вариантах осуществления каталитически неактивный Cas9 слит с гетерологичным эффекторным доменом, таким как репрессор или активатор транскрипции, чтобы воздействовать на экспрессию гена.

[0091] Целевая последовательность может включать любой полинуклеотид, такой как полинуклеотиды ДНК или РНК. Целевая последовательность может быть расположена в ядре или цитоплазме клетки, например, внутри органеллы клетки. В основном, последовательность или матрицу, которую можно использовать для рекомбинации в целевом локусе, содержащую целевую последовательность, обозначают как «матрицу для редактирования» или «полинуклеотид для редактирования» или «последовательность для редактирования». В некоторых аспектах экзогенный матричный полинуклеотид может быть обозначен как матрица для редактирования. В некоторых аспектах, рекомбинация представляет собой гомологичную рекомбинацию.

[0092] Как правило, что касается эндогенной системы CRISPR, образование комплекса CRISPR (включающего направляющую последовательность, гибридизованную с целевой последовательностью и объединенную с одним или более белками Cas) приводит к расщеплению одной или обеих цепей внутри целевой последовательности или рядом с целевой последовательностью (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 или более пар оснований). Последовательность tracr, которая может включать в себя или состоять из всей или части последовательности tracr дикого типа (например, приблизительно или приблизительно более чем 20, 26, 32, 45, 48, 54, 63, 67, 85 или более нуклеотидов из последовательности tracr дикого типа), также может составлять часть комплекса CRISPR, например, путем гибридизации, по меньшей мере, части последовательности tracr со всей или частью последовательности tracr mate, которая

функционально связана с направляющей последовательностью. Последовательность *tracr* имеет комплементарность с последовательностью *tracr mate*, достаточную для гибридизации и участия в образовании комплекса CRISPR, такую как, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% комплементарности последовательности по длине последовательности *tracr mate* при оптимальном выравнивании.

[0093] Можно вводить в клетку один или более векторов, управляющих экспрессией одного или более элементов системы CRISPR, таким образом, что экспрессия элементов системы CRISPR направляет формирование комплекса CRISPR на одном или более целевых сайтах. Компоненты также можно доставлять в клетки в виде белков и/или РНК. Например, фермент Cas фермент, направляющая последовательность, связанная с последовательностью *tracr-mate*, и каждая последовательность *tracr* могли бы быть функционально связаны с отдельными регуляторными элементами в отдельных векторах. Альтернативно, два или более элементов, экспрессируемых из одного и того же или разных регуляторных элементов, можно комбинировать в одном векторе с одним или более дополнительными векторами, обеспечивающими какие-либо компоненты системы CRISPR, не включенные в первый вектор. Вектор может содержать один или более сайтов вставки, таких как последовательность распознавания рестрикционной эндонуклеазы (также обозначаемую как «сайт клонирования»). В некоторых вариантах осуществления один или более сайтов вставки расположены выше и/или ниже одного или более элементов последовательности одного или более векторов. Когда используют несколько разных направляющих последовательностей, одну экспрессирующую конструкцию можно использовать для нацеливания активности CRISPR на несколько разных соответствующих целевых последовательностей внутри клетки.

[0094] Вектор может содержать регуляторный элемент, функционально связанный с фермент-кодирующей последовательностью, кодирующей фермент CRISPR, такой как белок Cas. Неограничивающие примеры белков Cas включают Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известный как Csn1 и Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, их гомологи или их модифицированные версии. Эти ферменты являются известными; например, аминокислотную последовательность белка Cas9 *S. pyogenes* можно найти в базе данных SwissProt по номеру доступа Q99ZW2.

[0095] Фермент CRISPR может быть Cas9 (например, из *S. pyogenes* или *S. pneumoniae*). Фермент CRISPR может направлять расщепление одной или обеих цепей в месте расположения целевой последовательности, например, внутри целевой последовательности и/или внутри последовательности, комплементарной целевой последовательности. Вектор может кодировать фермент CRISPR, который является мутированным относительно соответствующего фермента дикого типа, таким образом что мутированный фермент CRISPR не обладает способностью расщеплять одну или обе цепи целевого полинуклеотида, содержащего целевую последовательность. Например, замена



аспартата на аланин (D10A) в каталитическом домене RuvC I Cas9 из *S. pyogenes* превращает Cas9 из нуклеазы, которая расщепляет обе цепи, в никазу (расщепляет одну цепь). В некоторых вариантах осуществления никазу Cas9 можно использовать в комбинации с направляющей последовательностью/последовательностями, например, двумя направляющими последовательностями, которые нацелены соответственно на смысловую и антисмысловую цепи ДНК-мишени. Эта комбинация позволяет разрезать обе нити и использовать их для индукции NHEJ или HDR.

[0096] В некоторых вариантах осуществления фермент-кодирующая последовательность, кодирующая фермент CRISPR, оптимизирована по кодонам для экспрессии, в частности, в клетках, таких как эукариотические клетки. Эукариотические клетки могут быть клетками определенного организма или получены из определенного организма, такого как млекопитающие, включая в качестве неограничивающих примеров человека, мышь, крысу, кролика, собаку, или не являющегося человеком примата. В основном оптимизация кодонов относится к процессу модификации последовательности нуклеиновой кислоты для усиления экспрессии в представляющих интерес клетках-хозяевах путем замены, по меньшей мере, одного кодона нативной последовательности кодонами, которые более часто или наиболее часто используются в генах этой клетки-хозяина, с сохранением нативной аминокислотной последовательности. Различные виды проявляют особую склонность к определенным кодонам для определенной аминокислоты. Смещение кодонов (различия в использовании кодонов между организмами) часто коррелирует с эффективностью трансляции матричной РНК (мРНК), которая, в свою очередь, как полагают, зависит, в частности, от свойств транслируемых кодонов и доступности молекул конкретной транспортной РНК (тРНК). Преобладание выбранных тРНК в клетке, в основном, является отражением кодонов, наиболее часто используемых в пептидном синтезе. Таким образом, гены могут быть адаптированы для оптимальной экспрессии гена в данном организме на основе оптимизации кодонов.

[0097] В основном, направляющая последовательность представляет собой любую полинуклеотидную последовательность, имеющую достаточную комплементарность с целевой полинуклеотидной последовательностью для гибридизации с целевой последовательностью и для направления последовательность-специфического связывания комплекса CRISPR с целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между направляющей последовательностью и ее целевой последовательностью при оптимальном выравнивании с использованием подходящего алгоритма выравнивания составляет приблизительно или составляет приблизительно более чем 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или больше.

[0098] Оптимальное выравнивание можно определять при помощи любого подходящего алгоритма для выравнивания последовательностей, неограничивающий пример которого включает алгоритм Смита-Уотермана, алгоритм Нидлмана-Вунша, алгоритмы на основе преобразования Барроуза-Уилера (например, выравниватель Барроуза-Уилера), Clustal W, Clustal X, BLAT, Novoalign (Novocraft Technologies, ELAND

(Illumina, San Diego, Calif.), SOAP (доступен на [soap.genomics.org.cn](http://soap.genomics.org.cn)), и Maq (доступен на [maq.sourceforge.net](http://maq.sourceforge.net)).

[0099] Фермент CRISPR может быть частью слитого белка, содержащего один или более гетерологичных белковых доменов. Слитый белок фермента CRISPR может включать любую дополнительную последовательность, необязательно линкерную последовательность между любыми двумя доменами. Примеры белковых доменов, которые могут быть слиты с ферментом CRISPR, в качестве неограничивающих примеров, включают эпитопные метки, последовательности репортерных генов, белковые домены, имеющие одну или более из следующих активностей: активность метилазы, активность деметилазы, активность активации транскрипции, активность репрессии транскрипции, активность фактора высвобождения транскрипции, активность модификации гистонов, активность расщепления РНК и активность связывания с нуклеиновой кислотой. Неограничивающие примеры эпитопных меток включают гистидиновые (His) метки, метки V5, метки FLAG, метки гемагглютинина (HA) гриппа, метки Мус, метки VSV-G и тиоредоксиновые (Trx) метки. Примеры репортерных генов в качестве неограничивающих примеров включают глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT) бета галактозидазу, бета-глюкуронидазу, люциферазу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), HcRed, DsRed, голубой флуоресцентный белок (CFP), желтый флуоресцентный белок (YFP) и аутофлуоресцентные белки, включая синий флуоресцентный белок (BFP). Фермент CRISPR может быть слит с последовательностью гена, кодирующей белок или фрагмент белка, который связывает молекулы ДНК или связывает другие клеточные молекулы, включая в качестве неограничивающих примеров мальтоза-связывающий белок (MBP), S-метку, слияния ДНК-связывающего домена (DBD) Lex A, слияния ДНК-связывающего домена GAL4A и слияния белка VP16 вируса простого герпеса (HSV). Дополнительные домены, которые могут быть частью слитого белка, включающего фермент CRISPR, описаны в US 20110059502, включенном в настоящий документ в качестве ссылки.

Вставка CAR и/или TCR в локус ингибиторного гена

[0100] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вставке CAR и/или TCR в конкретный локус гена в иммунных клетках. CAR и/или TCR можно вставлять в локус ингибиторного гена, такого как ген, выбранный из группы, состоящей из NKG2A, Siglec 7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, аденозинового рецептора 2A, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPa, SHIP1, ADAM17, pS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, CD7, и их сочетания.

[0101] Вставка одного или более CAR и/или TCR по любому из способов, описываемых в настоящем документе, может быть сайт-специфической. Например, один или более CAR и/или TCR можно вставлять непосредственно рядом с промотором или недалеко от промотора. В другом примере один или более трансгенов могут быть вставлены по соседству, вблизи или внутри экзона гена (например, ингибиторного гена).

Такие вставки можно использовать для нокина CAR и/или TCR, одновременно нарушая экспрессию гена. В другом примере один или более CAR и/или TCR могут быть вставлены по соседству, вблизи или внутри интрона гена. CAR и/или TCR можно вводить при помощи вирусного вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV) и интегрировать в целевой геномный участок. В некоторых случаях можно использовать вектор rAAV для прямого введения трансгена в определенное место. Например, в некоторых случаях CAR и/или TCR могут быть интегрированы, по меньшей мере, в часть NKG2A, Siglec 7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, аденозинового рецептора 2A, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPa, SHIP1, ADAM17, pS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5 или гена CD7 с помощью вектора rAAV или AAV.

[0102] Модификацию целевого локуса клетки можно получать путем введения ДНК в клетки, где ДНК гомологична целевому локусу. ДНК может включать маркерный ген, позволяющий отобрать клетки, содержащие интегрированную конструкцию. Комплементарная ДНК в нацеленном векторе может рекомбинировать с хромосомной ДНК в целевом локусе. Маркерный ген может быть фланкирован комплементарными последовательностями ДНК, 3'-плечом рекомбинации и 5'-плечом рекомбинации. В клетке мишенями могут быть несколько локусов. Например, трансгены с плечами рекомбинации, специфичными для одного или более целевых локусов, могут быть введены одновременно, так что за один шаг происходят множественные геномные модификации. Плечи гомологии могут составлять приблизительно от 0,2 т.п.н. до приблизительно 5 т.п.н. по длине, например, приблизительно от 0,2 т.п.н., 0,4 т.п.н., 0,6 т.п.н., 0,8 т.п.н., 1,0 т.п.н., 1,2 т.п.н., 1,4 т.п.н., 1,6 т.п.н., 1,8 т.п.н., 2,0 т.п.н., 2,2 т.п.н., 2,4 т.п.н., 2,6 т.п.н., 2,8 т.п.н., 3,0 т.п.н., 3,2 т.п.н., 3,4 т.п.н., 3,6 т.п.н., 3,8 т.п.н., 4,0 т.п.н., 4,2 т.п.н., 4,4 т.п.н., 4,6 т.п.н., 4,8 т.п.н., до приблизительно 5,0 т.п.н. в длину, например.

[0103] В одном способе направляющую РНК можно сконструировать для нацеливания на область локуса ингибирующего гена, например, прилегающую к промотору, экзону или интрону гена. Направляющая РНК может нацеливаться на 5'-конец экзона, такого как первый, второй или третий экзон ингибиторного гена. Направляющая РНК может быть включена в матрицу репарации вектора AAV. Вектор AAV может кодировать самоотщепляющийся пептид 2A, такой как пептид P2A, за которым следует кДНК CAR. Кассета CAR и последовательность направляющей РНК могут быть фланкированы плечами гомологии к ингибиторному гену. Затем в иммунную клетку можно вводить, например, электропорацией, вектор AAV и Cas9, такой как мРНК Cas9.

#### Иммунные клетки

[0104] Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к иммунным клеткам, которые сконструированы так, чтобы иметь нокаут нескольких генов и/или, чтобы иметь нокин CAR в локусе ингибиторного гена. Иммунные клетки могут представлять собой Т-клетки (например, регуляторные Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, или гамма-дельта Т-клетки), НК-клетки, инвариантные НК-клетки, НКТ-клетки,

В-клетки, стволовые клетки (например, мезенхимальные стволовые клетки (MSC) или индуцированные плюрипотентные стволовые (iPS) клетки). Иммунные клетки могут быть вирус-специфичными, экспрессировать CAR и/или TCR. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой моноциты или гранулоциты, например, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы. В настоящем документе также предлагаются способы получения и конструирования иммунных клеток, а также способы использования и введения клеток для адоптивной клеточной терапии, и в этом случае клетки могут быть аутологичными или аллогенными. Таким образом, иммунные клетки можно использовать в качестве иммунотерапии, например, для нацеливания на злокачественные клетки.

[0105] Иммунные клетки могут быть выделены у индивидуумов, в частности, у людей. Иммунные клетки можно получать от интересующего индивидуума, например, индивидуума с подозрением на наличие определенного заболевания или состояния, индивидуума с подозрением на предрасположенность к определенному заболеванию или состоянию, или индивидуума, который проходит терапию по поводу определенного заболевания или состояния. Иммунные клетки могут быть получены из любого места, в котором они находятся у индивидуума, включая в качестве неограниченных примеров, кровь, пуповинную кровь, селезенку, тимус, лимфоузлы, и костный мозг. Выделенные иммунные клетки можно использовать сразу, или их можно хранить в течение периода времени, например, при помощи замораживания.

[0106] Иммунные клетки могут быть обогащены/очищены из любой ткани, в которой они находятся, включая в качестве неограниченных примеров, кровь (включая кровь, собранную банками крови или кровь из банка крови), селезенку, костный мозг, ткани, удаленные и/или открытые во время хирургических процедур, и ткани, полученные при биопсии. Ткани/органы, из которых иммунные клетки обогащают, выделяют и/или очищают, могут быть выделены как у живых, так и у неживых индивидуумов, где неживые индивидуумы являются донорами органов. В конкретных вариантах осуществления иммунные клетки выделены из крови, такой как периферическая кровь или пуповинная кровь или их смесь. В некоторых аспектах иммунные клетки, выделенные из пуповинной крови, обладают повышенной иммуномодулирующей способностью, такой, как измеренная по супрессии CD4-положительных или CD8-положительных Т-клеток. В конкретных аспектах, иммунные клетки выделяют из объединенной крови, в частности, из объединенной пуповинной крови, для повышения способности иммуномодуляции. Объединенная кровь может быть из 2 или более источников, например из 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более источников (например, доноров).

[0107] Популяцию иммунных клеток можно получать от индивидуума, нуждающегося в терапии или страдающего заболеванием, связанным со сниженной активностью иммунной клетки. Таким образом, клетки могут быть аутологичными для индивидуума, нуждающегося в терапии. Альтернативно, популяцию иммунных клеток можно получить от донора, особенно от гистосовместимого донора. Популяция иммунных

клеток может быть получена из периферической крови, пуповинной крови, костного мозга, селезенки или любого другого органа/ткани, в которой иммунные клетки находятся у индивидуума или донора. Иммунные клетки могут быть выделены у совокупности индивидуумов и/или доноров, например, из объединенной пуповинной крови.

[0108] Когда популяция иммунных клеток получена от донора, отличного от индивидуума, донор предпочтительно является аллогенным при условии, что полученные клетки совместимы с субъектом в том смысле, что их можно вводить индивидууму. Аллогенные донорские клетки могут быть совместимыми или не быть совместимыми по лейкоцитарному антигену человека (HLA).

#### T-клетки

[0109] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой T-клетки. Несколько основных подходов к получению, активации и размножению функциональных противоопухолевых эффекторных клеток были описаны в последние два десятилетия. Они включают: аутологичные клетки, такие как лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL); T-клетки, активированные *ex vivo* с использованием аутологичных DC, лимфоцитов, искусственных антигенпрезентирующих клеток (АПК) или гранул, покрытых T-клеточными лигандами и активирующими антителами, или клеток, выделенных за счет захвата мембраны клеток-мишеней; аллогенные клетки, естественно экспрессирующие T-клеточный рецептор против опухоли хозяина (TCR); и не опухолеспецифические аутологичные или аллогенные клетки, генетически перепрограммированные или «перенаправленные» для экспрессии опухоли-реактивного TCR или химерных молекул TCR, демонстрирующих способность антителоподобное распознавание опухоли, известные как «T-тела». Эти подходы привели к появлению множества протоколов для получения T-клеток и иммунизации, которые можно использовать в способах, описываемых в настоящем документе.

[0110] В некоторых вариантах осуществления T-клетки получены из крови, костного мозга, лимфы, пуповины или лимфоидных органов. В некоторых аспектах клетки представляют собой клетки человека. Клетки, как правило, представляют собой первичные клетки, такие как клетки, выделенные непосредственно у индивидуума и/или выделенные у индивидуума и замороженные. В некоторых вариантах осуществления клетки включают одну или более субпопуляций T-клеток или других клеток, таких как полные популяции T-клеток, CD4<sup>+</sup>-клетки, CD8<sup>+</sup>-клетки и их субпопуляции, такие как те, которые определяются функцией, состоянием активации, зрелостью, потенциалом дифференцировки, размножением, рециркуляцией, локализацией, и/или способностью к персистенции, антиген-специфичностью, типом антигенного рецептора, присутствием в конкретном органе или компартменте, профилем секреции маркера или цитокина и/или степенью дифференцировки. Применительно к индивидууму, подлежащему лечению, клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. В некоторых аспектах, как в стандартных технологиях, клетки являются плюрипотентными и/или мультипотентными, такими как стволовые клетки, такими как индуцированные плюрипотентные стволовые

клетки (iPSC). В некоторых вариантах осуществления способы включают выделение клеток у индивидуума, подготовку, обработку, культивирование и/или их конструирование, как описано в настоящем документе, и повторное введение их тому же пациенту до или после криоконсервации.

[0111] Среди подтипов и субпопуляций Т-клеток (например, CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток) находятся наивные Т(TN)-клетки, эффекторные Т-клетки (TEFF), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовая клетка памяти Т (TSC<sub>M</sub>), Т-клетки центральной памяти (TCM), Т-клетки эффекторной памяти (TEM) или терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой инвариантные Т(MAIT)-клетки, природные и адаптивные регуляторные Т(Treg)-клетки, хелперные Т-клетки, такие как TH1-клетки, TH2-клетки, TH3-клетки, TH17-клетки, TH9-клетки, TH22-клетки, фолликулярные хелперные Т-клетки, альфа/бета Т-клетки, и дельта/гамма Т-клетки.

[0112] В некоторых вариантах осуществления одна или более популяций Т-клеток обогащены или истощены клетками, которые являются положительными по определенному маркеру, такому как поверхностные маркеры, или отрицательными по конкретному маркеру. В некоторых случаях такими маркерами являются маркеры, которые отсутствуют или экспрессируются в относительно низких уровнях в определенных популяциях Т-клеток (например, клетки не памяти), но присутствуют или экспрессируются в относительно более высоких уровнях в некоторых других популяциях Т-клеток (например, клетки памяти).

[0113] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки отделяют от образца РВМС путем отрицательной селекции по маркерам, таких как CD14, экспрессируемым на не-Т-клетках, таких как В-клетки, моноциты или другие лейкоциты. В некоторых аспектах, этап селекции по CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> применяют, чтобы отделить CD4<sup>+</sup> хелперы и CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-клетки. Такие популяции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> могут быть дополнительно разделены на субпопуляции путем положительной или отрицательной селекции по маркерам, экспрессируемым или экспрессируемым в относительно более высокой степени в одной или более субпопуляциях наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток.

[0114] В некоторых вариантах осуществления CD8<sup>+</sup> Т-клетки дополнительно обогащены или истощены по наивным клеткам, клеткам центральной памяти, клеткам эффекторной памяти и/или стволовым клеткам центральной памяти, например, путем положительной или отрицательной селекции на основе поверхностных антигенов, связанных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления обогащение по Т-клеткам центральной памяти (TCM) проводят для повышения эффективности, например, для увеличения длительности выживаемости, размножения и/или приживления после введения, что в некоторых аспектах является особенно надежным в таких субпопуляциях.

[0115] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой аутологичные Т-клетки. В этом способе у пациентов получают образцы опухоли и получают суспензию отдельных клеток. Суспензию отдельных клеток можно получить любым подходящим способом, например, механическим способом (дезагрегирование опухоли с помощью, например, диссоциатора softMACS™, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) или ферментативным способом (например, коллагеназа или ДНКазы). Ферментативно расщепленные суспензии отдельных клеток опухолей культивируют в интерлейкине-2 (IL-2).

[0116] Культивированные Т-клетки можно объединять и быстро наращивать. Быстрое наращивание обеспечивает увеличение количества антиген-специфичных Т-клеток, по меньшей мере, приблизительно в 50 раз (например, в 50, 60, 70, 80, 90, или 100 раз или больше) за период приблизительно от 10 до приблизительно 14 суток. Более предпочтительно, быстрое наращивание обеспечивает увеличение, по меньшей мере, приблизительно в 200 раз (например, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или больше) за период приблизительно от 10 до приблизительно 14 суток.

[0117] Размножение можно производить любым из ряда способов, известных в данной области. Например, Т-клетки можно быстро наращивать с использованием неспецифической стимуляции Т-клеточного рецептора в присутствии питающих лимфоцитов и либо интерлейкина-2 (IL-2), либо интерлейкина-15 (IL-15), причем предпочтительным является IL-2. Неспецифический стимул Т-клеточного рецептора может включать приблизительно 30 нг/мл ОКТ3, моноклонального антитела к CD3 мыши (доступно у Ortho-McNeil®, Raritan, N.J.). Альтернативно, Т-клетки можно быстро наращивать за счет стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) *in vitro* одним или более антигенами злокачественной опухоли (включая их антигенные части, такие как эпитоп (-ы), или клетку), которые могут быть необязательно экспрессироваться вектором, такие как связывающий пептид лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), в присутствии Т-клеточного фактора роста, такого как 300 МЕ/мл IL-2 или IL-15, причем предпочтительным является IL-2. Индуцированные *in vitro* Т-клетки быстро размножаются путем повторной стимуляции тем же антигеном/антигенами злокачественной опухоли, представленным на HLA-A2-экспрессирующих антигенпрезентирующих клетках. Альтернативно, Т-клетки можно повторно стимулировать облученными аутологичными лимфоцитами или облученными HLA-A2+ аллогенными лимфоцитами и IL-2, например.

[0118] Аутологичные Т-клетки можно модифицировать для экспрессии Т-клеточного фактора роста, который способствует росту и активации аутологичных Т-клеток. Подходящие Т-клеточные факторы роста включают, например, интерлейкин (IL)-2, IL-7, IL-15 и IL-12. Подходящие способы модификации известны в данной области. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates и John Wiley & Sons, NY, 1994. В отдельных аспектах

модифицированные аутологичные Т-клетки экспрессируют высокие уровни Т-клеточного фактора роста. Кодрующие последовательности Т-клеточного фактора роста, такого как IL-12, легко доступны в данной области, как и промоторы, функциональная связь которых с кодирующей последовательностью Т-клеточного фактора роста способствует высокому уровню экспрессии.

#### НК-клетки

[0119] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой клетки-естественные киллеры (NK). NK-клетки представляют собой субпопуляцию лимфоцитов, которые обладают спонтанной цитотоксичностью в отношении ряда опухолевых клеток, вирус-инфицированных клеток и некоторых нормальных клеток в костном мозге и тимусе. NK-клетки дифференцируются и созревают в костном мозге, лимфоузлах, селезенке, миндалинах и тимусе. NK-клетки могут быть обнаружены с помощью специфических поверхностных маркеров, таких как CD16, CD56 и CD8 у людей. NK-клетки не экспрессируют Т-клеточные антигенные рецепторы, пан Т-маркер CD3 или поверхностные иммуноглобулиновые В-клеточные рецепторы.

[0120] В определенных вариантах осуществления NK-клетки получены из мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC), нестимулированных продуктов лейкофереза (PBSC), эмбриональных стволовых клеток человека (hESC), плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), костного мозга или крови пуповины с помощью способов, хорошо известных в данной области. В частности, для получения NK-клеток используют пуповинные клетки крови. В определенных аспектах NK-клетки выделяют и размножают с помощью ранее описанного способа размножения NK-клеток *ex vivo* (Spanholtz et al., 2011; Shah et al., 2013). В этом способе мононуклеарные клетки крови выделяют центрифугированием в градиенте плотности фиколл и культивируют в биореакторе с IL-2 и искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК). Через 7 суток клеточную культуру истощают по любым клеткам, экспрессирующим CD3, и повторно культивируют в течение дополнительных 7 суток. Клетки снова являются истощают по CD3 и характеризуют для определения процентного содержания CD56+/CD3-клеток или NK-клеток. Другими способами, пуповинные клетки крови используют для получения NK-клеток путем выделения CD34+-клеток и дифференцировки в CD56+/CD3-клетки путем культивирования в среде, содержащей SCF, IL-7, IL-15 и IL-2.

[0121] В конкретных вариантах осуществления NK-клетки размножают в какой-то момент во время их получения. В конкретных случаях размножение NK-клеток включает: стимуляцию мононуклеарных клеток (МНК) из пуповинной крови в присутствии антигенпрезентирующих клеток (АПК) и IL-2; и повторную стимуляцию клеток с помощью АПК для получения размноженных NK-клеток, где, по меньшей мере, в некоторых случаях, способ проводят в биореакторе. Этап стимулирования может направлять МНК к NK-клеткам. Этап повторной стимуляции может включать или не включать присутствие IL-2. В конкретных аспектах, способ не включает удаление или



добавление каких-либо компонентов среды во время стадии стимуляции. В конкретных аспектах, способ проводят в течение менее чем 15 суток, например, 14 суток.

[0122] В определенном варианте осуществления НК-клетки размножают способом размножения *ex vivo*, включающим: (а) получение исходной популяции моноклеарных клеток (МНК) из крови пуповины; (b) стимуляция МНК в присутствии антигенпрезентирующих клеток (АПК) и IL-2; и (с) повторная стимуляция клеток с помощью АПК для получения размноженных НК-клеток, где способ проводят в биореакторе и в соответствии с требованиями надлежащей производственной практики (GMP). Стимуляция на этапе (b) может направлять МНК к НК-клеткам. Стадия (с) может включать или не включать присутствие IL-2. В конкретных аспектах, способ не включает удаление или добавление каких-либо компонентов среды во время стадии (b). В конкретных аспектах, способ проводят в течение менее чем 15 суток, например, 14 суток.

[0123] В некоторых аспектах, способ дополнительно включает истощение клеток, положительных по одному или более конкретным маркерам, таким как CD3, например. В определенных аспектах, этап обеднения проводят между этапами (b) и (с). В некоторых аспектах клетки удаляют из биореактора для истощения по CD3 и помещают в биореактор для этапа (с).

[0124] В определенных аспектах, получение исходной популяции МНК из пуповинной крови включает размораживание пуповинной крови в присутствии декстрана, сывороточного альбумина человека (САЧ), ДНКазы и/или хлорида магния. В конкретных аспектах, получение исходной популяции МНК из пуповинной крови включает размораживание пуповинной крови в присутствии декстрана и/или ДНКазы. В конкретных аспектах, пуповинную кровь отмывают в присутствии 5-20% декстрана, например, 10% декстрана. В определенных аспектах, пуповинную кровь суспендируют в присутствии хлорида магния, например, с концентрацией 100-300 мМ, в частности, 200 мМ. В некоторых аспектах получение включает проведение центрифугирования в градиенте плотности фиколл для получения моноклеарных клеток (МНК).

[0125] В определенных аспектах биореактор является газопроницаемым биореактором. В конкретных аспектах, газопроницаемый биореактор представляет собой G-Rex100M или G-Rex100. В некоторых аспектах стимуляцию этапа (b) проводят в 3-5 л среды, например, в 3, 3,5, 4, 4,5, или 5 л.

[0126] В некоторых аспектах АПК являются гамма-облученными. В определенных аспектах АПК сконструированы так, чтобы экспрессировать мембранносвязанный IL-21 (mbIL-21). В конкретных аспектах, АПК сконструированы для экспрессии IL-21, IL-15 и/или IL-2. В некоторых аспектах МНК и АПК культивируют в соотношении 1:2. В некоторых аспектах концентрация IL-2 составляет 50-200 МЕ/мл, например, 100 МЕ/мл. В конкретных аспектах, IL-2 восполняют каждые 2-3 суток.

[0127] В конкретных аспектах, этап (b) проводят в течение 6-8 суток, например, 7 суток. В некоторых аспектах, этап (с) проводят в течение 6-8 суток, например, 7 суток. В некоторых аспектах этап (с) не включает разделение клеток. В конкретных аспектах,

клетки дважды дают ПЛ-2 на этапе (с), и в определенных случаях, никакие другие компоненты среды не добавляют или не удаляют на этапе (с).

[0128] В некоторых аспектах, способ включает использование 3, 4, 5 или 6 биореакторов. В конкретных аспектах, способ включает использование менее чем 10 биореакторов.

[0129] В конкретных аспектах НК-клетки размножают, по меньшей мере, в 500, 800, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000 или 5000 раз. В частности, культивирование НК-клеток в биореакторе дает более чем 1000-кратное увеличение НК-клеток по сравнению со статической жидкой культурой.

[0130] В определенных аспектах, способ не включает совпадение с лейкоцитарным антигеном человека (HLA). В некоторых аспектах исходная популяция НК-клеток получена не от гаплоидентичного донора.

[0131] В некоторых аспектах, размноженные НК-клетки обладают повышенной противоопухолевой активностью по сравнению с НК-клетками, размноженными из периферической крови. В определенных аспектах, размноженные НК-клетки имеют более высокую экспрессию одного или более генов клеточного цикла, одного или более генов клеточного деления и/или одного или более генов репликации ДНК по сравнению с НК-клетками, размноженными из периферической крови. В некоторых аспектах размноженные НК-клетки обладают более высокой пролиферативной способностью по сравнению с размноженными НК-клетками периферической крови. В некоторых аспектах размноженные НК-клетки не проявляют истощения. В определенных аспектах истощение определяют путем измерения экспрессии перфорина, гранзима, CD57, KLRG1 и/или PD1. В некоторых аспектах, размноженные НК-клетки имеют высокую экспрессию перфорина и/или гранзима. В определенных аспектах, размноженные НК-клетки имеют низкий уровень экспрессии CD57, KLRG1, и/или PD1 или ее отсутствие.

[0132] В некоторых аспектах размноженные НК-клетки содержат клинически значимую дозу. В определенных аспектах пуповинная кровь представляет собой замороженную пуповинную кровь. В конкретных аспектах, замороженную пуповинную кровь протестировали на одно или более инфекционных заболеваний, таких как гепатит А, гепатит В, гепатит С, *Toxoplasma gondii*, ВИЧ, Т-лимфотропный вирус человека, сифилис, Вирус Зика и т.д. В некоторых аспектах, пуповинная кровь представляет собой совокупность пуповинной крови, например, из 3, 4, 5, 6, 7, или 8 отдельных единиц пуповинной крови.

[0133] В некоторых аспектах НК-клетки не являются аутологичными, например, в отношении индивидуума-реципиента. В определенных аспектах, НК-клетки не являются аллогенными, например, в отношении индивидуума-реципиента.

[0134] В некоторых аспектах АПК представляют собой универсальные антигенпредставляющие клетки (уАПК). В определенных аспектах уАПК сконструированы так, чтобы экспрессировать (1) CD48 и/или CS1 (CD319), (2) мембраносвязанный интерлейкин-21 (mbIL-21) и (3) лиганд 41BB (41BBL). В некоторых

аспектах уАПК экспрессируют CD48. В определенных аспектах, уАПК экспрессируют CS1. В конкретных аспектах, уАПК экспрессируют CD48 и CS1. В некоторых аспектах уАПК практически не имеют экспрессии эндогенных молекул HLA класса I, II, и/или CD1d. В определенных аспектах уАПК экспрессируют ICAM-1 (CD54) и/или LFA-3 (CD58). В частности, уАПК далее определяют как иАПК, происходящие из лейкозной клетки, такие как клетки K562.

#### Стволовые клетки

[0135] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки по настоящему изобретению могут быть стволовыми клетками, такими как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (PSC), мезенхимальные стволовые клетки (MSC), или гематопозитические стволовые клетки (HSC).

[0136] Плюрипотентные стволовые клетки, используемые в настоящем документе, могут быть индуцированными плюрипотентными стволовыми (iPS) клетками, обычно сокращенно iPS-клетки или iPSC. За исключением половых клеток, любую клетку можно использовать в качестве отправной точки для iPSC. Например, типы клеток могут представлять собой кератиноциты, фибробласты, гематопозитические клетки, мезенхимальные клетки, клетки печени, или клетки желудка. Нет ограничений по степени клеточной дифференцировки или возрасту животного, у которого собирают клетки; даже недифференцированные клетки-предшественники (включая соматические стволовые клетки) и окончательно дифференцированные зрелые клетки можно использовать в качестве источников соматических клеток в способах, описываемых в настоящем документе.

[0137] Соматические клетки можно перепрограммировать для производства iPS-клеток с использованием способов, известных специалисту в данной области. В основном для производства плюрипотентных стволовых клеток из соматической клетки используют факторы ядерного репрограммирования. В некоторых вариантах осуществления используют, по меньшей мере, три, или, по меньшей мере, четыре из Klf4, c-Myc, Oct3/4, Sox2, Nanog и Lin28. В других вариантах осуществления используют Oct3/4, Sox2, c-Myc и Klf4 или Oct3/4, Sox2, Nanog и Lin28.

[0138] После получения iPS можно культивировать в среде, достаточной для поддержания плюрипотентности. В определенных вариантах осуществления можно использовать неопределенные условия; например, плюрипотентные клетки можно культивировать на фибробластных питающих клетках или среде, которая подверглась воздействию фибробластных питающих клеток, чтобы поддерживать стволовые клетки в недифференцированном состоянии. В некоторых вариантах осуществления клетку культивируют в присутствии эмбриональных фибробластов мыши, обработанных радиацией или антибиотиком для прекращения деления клеток, в качестве питающих клеток. Альтернативно, плюрипотентные клетки можно культивировать и поддерживать по существу в недифференцированном состоянии с использованием определенной, независимой от питающих клеток, системы культивирования, такой как среда TERSR™ или

среда E8™/Essential 8™.

#### Генетически сконструированные антигенные рецепторы

[0139] Иммунные клетки по настоящему изобретению могут быть сконструированы с помощью генной инженерии для экспрессии антигенных рецепторов, таких как сконструированные TCR, CAR, химерные цитокиновые рецепторы, хемокиновые рецепторы, их сочетания и так далее. Например, иммунные клетки модифицируют для экспрессии CAR и/или TCR, обладающих антигенной специфичностью в отношении антигена злокачественной опухоли. Множественные CAR и/или TCR, такие как для разных антигенов, можно добавлять к иммунным клеткам. В некоторых аспектах иммунные клетки сконструированы таким образом, чтобы экспрессировать CAR или TCR путем включения CAR или TCR в локус ингибиторного гена с использованием CRISPR.

[0140] Подходящие способы модификации известны в данной области. См., например, Sambrook и Ausubel, выше. Например, клетки можно трансдуцировать для экспрессии TCR, обладающего антигенной специфичностью в отношении антигена злокачественной опухоли, с использованием способов трансдукции, описанных в Heemskerk et al., 2008 и Johnson et al., 2009.

[0141] Электропорацию РНК, кодирующей полноразмерные цепи  $\alpha$  и  $\beta$  TCR (или  $\gamma$  и  $\delta$ ), можно использовать в качестве альтернативы для преодоления длительных проблем с аутореактивностью, вызванных спариванием ретровирусно трансдуцированных и эндогенных цепей TCR. Даже если такое альтернативное спаривание имеет место в стратегии временной трансфекции, возможно образовавшиеся аутореактивные Т-клетки через некоторое время потеряют эту аутореактивность, потому что введенные цепи  $\alpha$  и  $\beta$  TCR экспрессируются только временно. Когда экспрессия введенных цепей  $\alpha$  и  $\beta$  TCR уменьшается, остаются только нормальные аутологичные Т-клетки. Это не тот случай, когда полноразмерные цепи TCR вводят путем стабильной ретровирусной трансдукции, при которой никогда не исчезают введенные цепи TCR, вызывая постоянно присутствующую аутореактивность у пациента.

[0142] В некоторых вариантах осуществления клетки содержат одну или более нуклеиновых кислот, введенных с помощью генетической инженерии, которые кодируют один или более антигенных рецепторов, и генно-инженерные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, т.е. обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, такие как кислоты, полученные из другого организма или клетки, которые, например, обычно не обнаруживаются в сконструированной клетке и/или организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты не являются природным, например, нуклеиновая кислота не встречается в природе (например, химерная).

[0143] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с антигеном. В

некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой белок, экспрессируемый на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой TCR-подобный CAR, и антиген представляет собой процессированный пептидный антиген, такой как пептидный антиген внутриклеточного белка, который, подобно TCR, распознается на клеточной поверхности в контексте молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС).

[0144] Примеры антигенных рецепторов, включающие CAR и рекомбинантные TCR, а также способы для конструирования и введения рецепторов в клетки, включают примеры, описанные, например, в публикациях международной патентной заявки WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, публикациях патентной заявки США US2002131960, US2013287748, US20130149337, патентах США №№: 6451995, 7446190, 8252592, 8339645, 8398282, 7446179, 6410319, 7070995, 7265209, 7354762, 7446191, 8324353, и 8479118, и европейской патентной заявке EP2537416, и/или примеры, описанные у Sadelain et al., 2013; Davila et al., 2013; Turtle et al., 2012; Wu et al., 2012. В некоторых аспектах, генетически сконструированные антигенные рецепторы включают CAR, как описано в патенте США №7446190, и рецепторы, описанные в публикации международной патентной заявки №:WO/2014055668 A1.

#### Химерные антигенные рецепторы

[0145] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит: а) один или более внутриклеточных сигнальных доменов, б) трансмембранный домен, и с) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающую область.

[0146] В некоторых вариантах осуществления сконструированные антигенные рецепторы включают CAR, включая активирующие или стимулирующие CAR, костимулирующие CAR (см. WO2014/055668) и/или ингибирующие CAR (iCAR, см. Fedorov et al., 2013). CAR, в основном включают, внеклеточный антиген- (или лиганд-) связывающий домен, связанный с одним или более внутриклеточными сигнальными компонентами, в некоторых аспектах через линкеры и/или трансмембранный домен (-ы). Такие молекулы, как правило, симулируют или имитируют сигнал через естественный антигенный рецептор, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором и/или сигнал только через костимулирующий рецептор.

[0147] Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к применению нуклеиновых кислот, включая нуклеиновые кислоты, кодирующие антиген-специфический полипептид CAR, включая CAR, который был гуманизирован для снижения иммуногенности (hCAR), содержащий внутриклеточный сигнальный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен, содержащий один или более сигнальных мотивов. В определенных вариантах осуществления CAR может распознавать эпитоп, содержащий совместное пространство между одним или более антигенами. В определенных вариантах осуществления связывающая область может включать определяющие комплементарность области моноклонального антитела, переменные

области моноклонального антитела и/или его антигенсвязывающие фрагменты. В другом варианте осуществления эта специфичность происходит от пептида (например, цитокина), который связывается с рецептором.

[0148] Предполагается, что нуклеиновые кислоты человеческого CAR могут быть человеческими генами, используемыми для усиления клеточной иммунотерапии для пациентов-людей. В конкретном варианте осуществления изобретение включает полноразмерную кДНК CAR или кодирующую область. Антигенсвязывающие области или домены могут содержать фрагмент  $V_H$  и  $V_L$  цепей одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), полученного из определенного моноклонального антитела человека, такого как, описанные в патенте США 7109304, включенном в настоящий документ в качестве ссылки. Фрагмент также может быть любым количеством различных антигенсвязывающих доменов антитела, специфичного к антигену человека. В более конкретном варианте осуществления фрагмент представляет собой антиген-специфический scFv, кодируемый последовательностью, которая оптимизирована для использования человеческих кодонов для экспрессии в клетке человека.

[0149] Конфигурация может быть многомерной, такой как диатело или мультимеры. Мультимеры, наиболее вероятно, образованы перекрестным спариванием переменной части легкой и тяжелой цепи в диатело. Шарнирная часть конструкции может иметь несколько альтернатив: от полного удаления до сохранения первого цистеина, до замены пролином серина, до состояния укорочения до первого цистеина. Часть Fc может быть удалена. Любой белок, который является стабильным и/или димеризуется, может служить этой цели. Можно использовать только один из Fc-доменов, например, домен CH2 или CH3 от иммуноглобулина человека. Можно также использовать шарнирную область, CH2 и CH3 иммуноглобулина человека, которая была модифицирована для улучшения димеризации. Также можно использовать только шарнирную часть иммуноглобулина. Можно также использовать части CD8alpha.

[0150] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота CAR содержит последовательность, кодирующую другие костимуляторные рецепторы, такие как трансмембранный домен и модифицированный домен CD28 для внутриклеточной передачи сигнала. Другие костимуляторные рецепторы в качестве неограничивающих примеров включают один или более из CD28, CD27, OX-40 (CD134), DAP10, DAP12 и 4-1BB (CD137). В дополнение к первичному сигналу, инициированному CD3 $\zeta$ , дополнительный сигнал, обеспечиваемый костимуляторным рецептором человека, вставленным в человеческий CAR, важен для полной активации NK-клеток и может помочь улучшить персистенцию *in vivo* и терапевтический успех адоптивной иммунотерапии.

[0151] В некоторых вариантах осуществления CAR конструируют со специфичностью к конкретному антигену (или маркеру или лиганду), такому как антиген, экспрессируемый в конкретных типах клеток, на который нацелена адоптивная терапия, например, маркер злокачественной опухоли, и/или антиген, предназначенный для

индукции ослабленного ответа, такой как антиген, экспрессирующийся на нормальном или здоровом типе клеток. Таким образом, CAR, как правило, включает в свою внеклеточную часть одну или более антигенсвязывающих молекул, такую как один или более антигенсвязывающих фрагментов, доменов или частей, или один или более переменных доменов антитела, и/или молекул антитела. В некоторых вариантах осуществления CAR включает антигенсвязывающую часть или части молекулы антитела, такую как одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), полученный из переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой (VL) цепи моноклонального антитела (mAb).

[0152] В определенных вариантах осуществления химерного антигенного рецептора, антиген-специфическая часть рецептора (которая может быть обозначена как внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающую область) включает связывающий домен для ассоциированного с опухолью антигена или связывающий домен для патоген-специфического антигена. Антигены включают углеводные антигены, распознаваемые паттерн-распознающими рецепторами, такими как дектин-1. Опухольассоциированный антиген может быть любого вида при условии, что он экспрессируется на клеточной поверхности опухолевых клеток. Иллюстративные варианты осуществления опухолюассоциированных антигенов включают CD19, CD20, раково-эмбриональный антиген, альфафетопротеин, CA-125, MUC-1, CD56, EGFR, c-Met, AKT, Her2, Her3, антиген эпителиальной опухоли, антиген, ассоциированный с меланомой, мутировавший p53, мутировавший gas и т.д. В определенных вариантах осуществления CAR может коэкспрессироваться с цитокином для улучшения персистенции при низком количестве опухолюассоциированного антигена. Например, CAR может коэкспрессироваться с одним или более цитокинами, такими как IL-7, IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21 или их сочетание.

[0153] Последовательность открытой рамки считывания, кодирующую химерный рецептор, можно получить из источника геномной ДНК, источника кДНК или можно синтезировать (например, через ПЦР) или из их сочетания. В зависимости от размера геномной ДНК и количества интронов, может быть желательным использовать кДНК или их сочетание, поскольку обнаружено, что интроны стабилизируют мРНК. Кроме того, может быть дополнительным преимуществом использование эндогенных или экзогенных некодирующих областей для стабилизации мРНК.

[0154] Предполагается, что химерная конструкция может быть введена в иммунные клетки в виде «голой» ДНК или в подходящем векторе. Способы стабильной трансфекции клеток путем электропорации с использованием «голой» ДНК известны в данной области. См., например, патент США № 6410319. «Голая ДНК», в основном, относится к ДНК, кодирующей химерный рецептор и содержащейся в плазмидном экспрессирующем векторе в правильной ориентации для экспрессии.

[0155] Альтернативно, вирусный вектор (например, ретровирусный вектор, аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор или лентивирусный

ветор) можно использовать для введения химерной конструкции в иммунные клетки. Подходящие векторы для применения в соответствии со способом по настоящему изобретению не реплицируются в иммунных клетках. Известно большое количество векторов на основе вирусов, где количество копий вируса, сохраняемых в клетке, достаточно низкое для поддержания жизнеспособности клетка, например, такие как векторы на основе ВИЧ, SV40, EBV, HSV или BPV.

[0156] В некоторых аспектах, антиген-специфическое связывание, или компонент распознавания связан с одним или более трансмембранными и внутриклеточными сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления CAR включает трансмембранный домен, слитый с внеклеточным доменом CAR. В одном из вариантов осуществления используют трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен выбран или модифицирован путем замены аминокислот, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами того же или другого поверхностного мембранного белка, чтобы минимизировать взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса.

[0157] Трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления получен из природного или синтетического источника. Если источник является природным, домен в некоторых аспектах является производным любого мембраносвязанного белка или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают те, которые получены из молекул альфа, бета или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, дзета CD3, эpsilon CD3, гамма CD3, гамма CD3, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD154, ICOS/CD278, GITR/CD357, NKG2D и DAP. Альтернативно трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления является синтетическим. В некоторых аспектах синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах триплет фенилаланин, триптофан и валин будет находиться на каждом конце синтетического трансмембранного домена.

[0158] В определенных вариантах осуществления платформенные технологии, описываемые в настоящем документе для генетической модификации иммунных клеток, таких как НК-клетки, включают (i) невирусный перенос генов с использованием устройства электропорации (например, нуклеофектора), (ii) CAR, которые передают сигнал через эндодомены (например, CD28/CD3- $\zeta$ , CD137/CD3- $\zeta$  или другие комбинации), (iii) CAR с переменными длинами внеклеточных доменов, соединяющих домен распознавания антигена с клеточной поверхностью, и, в некоторых случаях, (iv) искусственные антигенпредставляющие клетки (иАПК), полученные из K562, чтобы иметь возможность надежно и количественно размножить CAR<sup>+</sup>-иммунные клетки (Singh et al., 2008; Singh et al., 2011).

#### Т-клеточный рецептор (TCR)

[0159] В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные



антигенные рецепторы включают рекомбинантные TCR и/или TCR, клонированные из природных Т-клеток. «Т-клеточный рецептор» или «TCR» относится к молекуле, которая содержит переменные цепи  $\alpha$  и  $\beta$  (также известные как TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , соответственно) или переменные цепи  $\gamma$  и  $\delta$  (также известные как TCR $\gamma$  и TCR $\delta$ , соответственно) и которая способна специфически связываться с антигенным пептидом, связанным с рецептором МНС. В некоторых вариантах осуществления TCR находится в форме  $\alpha\beta$ .

[0160] Как правило, TCR, которые существуют в формах  $\alpha\beta$  и  $\gamma\delta$ , в основном, структурно похожи, но экспрессирующие их Т-клетки могут иметь различные анатомические местоположения или функции. TCR может находиться на поверхности клетки или в растворимой форме. В основном, TCR находится на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов), где он, в основном, отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). В некоторых вариантах осуществления TCR также может содержать константный домен, трансмембранный домен и/или короткий цитоплазматический хвост (см., например, Janeway et al, 1997). Например, в некоторых аспектах, каждая цепь TCR может содержать один N-концевой переменный домен иммуноглобулина, один константный домен иммуноглобулина, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост на С-конце. В некоторых вариантах осуществления TCR связан с инвариантными белками комплекса CD3, участвующими в опосредовании сигнала трансдукции. Если не указано иначе, термин "TCR" следует понимать как охватывающий функциональные фрагменты TCR. Термин также включает интактный или полноразмерный TCR, включая TCR в форме  $\alpha\beta$  или  $\gamma\delta$ .

[0161] Таким образом, для целей настоящего документа ссылка на TCR включает любой TCR или функциональный фрагмент, такой как антигенсвязывающая часть TCR, который связывается с конкретным антигенным пептидом, связанным с молекулой МНС, т.е. комплексом МНС-пептид. «Антигенсвязывающая часть» или «антиген-связывающий фрагмент» TCR, который можно использовать взаимозаменяемо, относится к молекуле, которая содержит часть структурных доменов TCR, но которая связывает антиген (например, комплекс МНС-пептид), с которым связывается целый TCR. В некоторых случаях антигенсвязывающая часть содержит переменные домены TCR, такие как переменная цепь  $\alpha$  и переменная цепь  $\beta$  TCR, достаточные для образования участка связывания для связывания со специфическим комплексом МНС-пептид, где, в основном, каждая цепь содержит три определяющие цепь комплементарности области.

[0162] В некоторых вариантах осуществления переменные домены цепей TCR связываются с образованием петель или определяющих комплементарности области (CDR), аналогичных иммуноглобулинам, которые придают антигенное распознавание и определяют пептидную специфичность путем образования участка связывания молекулы TCR и определения пептидной специфичности. Как правило, подобно иммуноглобулинам, CDR разделены каркасными областями (FR) (см., например, Jores et al., 1990; Chothia et al., 1988; Lefranc et al., 2003). В некоторых вариантах осуществления CDR3 является основной CDR, ответственной за распознавание процессированного антигена, хотя также было

показано, что CDR1 цепи альфа взаимодействует с N-концевой частью антигенного пептида, тогда как CDR1 цепи бета взаимодействует с С-концевой частью пептида. Полагают, что CDR2 распознает молекулу МНС. В некоторых вариантах осуществления переменная область  $\beta$ -цепи может содержать дополнительную область гипервариабельности (HV4).

[0163] В некоторых вариантах осуществления цепи TCR содержат константный домен. Например, как у иммуноглобулинов, внеклеточная часть цепи TCR (например,  $\alpha$ -цепи,  $\beta$ -цепи) может содержать два иммуноглобулиновых домена, переменный домен (например,  $V\alpha$  или  $V\beta$ ; как правило, аминокислоты от 1 до 116 на основе нумерации по Кабат, Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5<sup>th</sup> ed) на N-конце и один константный домен (например, константный домен  $\alpha$ -цепи или  $C\alpha$ , как правило, аминокислоты от 117 до 259 на основе Кабат, константный домен  $\beta$ -цепи или  $C\beta$ , как правило, аминокислоты от 117 до 295 на основе Кабат), прилегающий к клеточной мембране. Например, в некоторых случаях внеклеточная часть TCR, образованная двумя цепями, содержит два проксимальных по отношению к мембране константных домена, и два дистальных по отношению к мембране переменных домена, содержащих CDR. Константный домен TCR содержит короткие соединительные последовательности, в которых остаток цистеина образует дисульфидную связь, формируя связь между двумя цепями. В некоторых вариантах осуществления TCR может иметь дополнительные остатки цистеина в каждой из  $\alpha$  и  $\beta$  цепей, так что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

[0164] В некоторых вариантах осуществления цепи TCR могут содержать трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен положительно заряжен. В некоторых случаях цепи TCR содержат цитоплазматический хвост. В некоторых случаях структура позволяет TCR связываться с другими молекулами, такими как CD3. Например, TCR содержит константные домены с трансмембранной областью, которые могут закоривать белок в клеточной мембране и связываться с инвариантными субъединицами сигнального аппарата или комплекса CD3.

[0165] В основном, CD3 представляет собой мультибелковый комплекс, который может содержать три различных цепи ( $\gamma$ ,  $\delta$  и  $\epsilon$ ) у млекопитающих и  $\zeta$ -цепь. Например, у млекопитающих комплекс может содержать цепь CD3 $\gamma$ , цепь CD3 $\delta$ , две цепи CD3 $\epsilon$  и гомодимер цепи CD3 $\zeta$ . Цепи CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , и CD3 $\epsilon$  являются близкородственными белками клеточной поверхности из суперсемейства иммуноглобулинов, содержащими один иммуноглобулиновый домен. Трансмембранные области цепей CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , и CD3 $\epsilon$  являются отрицательно заряженными, что является характеристикой, которая позволяет этим цепям связываться с положительно заряженными цепями Т-клеточного рецептора. Внутриклеточные хвосты цепей CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , и CD3 $\epsilon$  содержат один консервативный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый мотив активации или ITAM, тогда как каждая цепь CD3 $\zeta$  имеет три мотива. В основном, ITAM вносят вклад в

сигнальную способность комплекса TCR. Эти дополнительные молекулы имеют отрицательно заряженные трансмембранные области и играют роль в распространении сигнала от TCR в клетку. CD3- и  $\zeta$ -цепи вместе с TCR образуют так называемый комплекс T-клеточного рецептора.

[0166] В некоторых вариантах осуществления TCR может быть гетеродимером двух цепей  $\alpha$  и  $\beta$  (или необязательно  $\gamma$  и  $\delta$ ) или может быть конструкцией из одноцепочечного TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой гетеродимер, содержащий две отдельные цепи ( $\alpha$  и  $\beta$  цепи или  $\gamma$  и  $\delta$  цепи), которые связаны, например, посредством дисульфидной связи или дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления TCR для целевого антигена (например, антигена злокачественной опухоли) идентифицируют и вводят в клетки. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, можно получать из ряда источников, например, путем амплификации общедоступных последовательностей ДНК TCR посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР). В некоторых вариантах осуществления TCR получают из биологического источника, например, из клетки, такой как T-клетка (например, цитотоксическая T-клетка), из T-клеточных гибридом или другого общедоступного источника. В некоторых вариантах осуществления T-клетки можно получать из клеток, выделенных *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления клон T-клетки с высокой аффинностью может быть выделен у пациента, и выделен TCR. В некоторых вариантах осуществления T-клетки могут представлять собой культивируемую гибридому T-клеток или клон T-клетки. В некоторых вариантах осуществления клон TCR для целевого антигена был получен в трансгенных мышах, сконструированных с генами иммунной системы человека (например, системы лейкоцитарного антигена человека или HLA). См., например, опухолевые антигены (см., например, Parkhurst et al., 2009 и Cohen et al., 2005). В некоторых вариантах осуществления для выделения TCR против целевого антигена используют фаговый дисплей (см., например, Varela-Rohena et al., 2008 и Li, 2005). В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающая часть могут быть получены синтетическим путем на основе знания последовательности TCR.

#### Антигенпрезентирующие клетки

[0167] Антигенпрезентирующие клетки, которые включают макрофаги, В-лимфоциты и дендритные клетки, различаются по экспрессии конкретной молекулы МНС. АПК интернализируют антиген и повторно экспрессируют часть этого антигена вместе с молекулой МНС на своей внешней клеточной мембране. МНС представляет собой большой генетический комплекс с множеством локусов. Локусы МНС кодируют два основных класса мембранных молекул МНС, обозначаемых как МНС класса I и класса II. Хелперные Т-лимфоциты, в основном, распознают антиген, связанный с молекулами МНС класса II, а цитотоксические Т-лимфоциты распознают антиген, связанный с молекулами МНС класса I. У людей МНС обозначается как комплекс HLA, а у мышей - комплекс H-2.

[0168] В некоторых случаях иАПК подходят для приготовления терапевтических композиций и продуктов для клеточной терапии из вариантов осуществления. Для общих рекомендаций относительно получения и применения антигенпрезентирующих систем, см., например, патенты США №№ 6225042, 6355479, 6362001 и 6790662; публикации патентной заявки США №№ 2009/0017000 и 2009/0004142; и международную публикацию № WO2007/103009.

[0169] Системы иАПК могут содержать, по меньшей мере, одну экзогенную вспомогательную молекулу. Можно использовать любое подходящее количество и комбинацию вспомогательных молекул. Вспомогательную молекулу может выбирать из таких вспомогательных молекул, как костимуляторные молекулы и молекулы адгезии. Типичные костимуляторные молекулы включают CD86, CD64 (FcγRI), лиганд 41BB и IL-21. Молекулы адгезии могут включать связывающие гликопротеины, такие как селектины, трансмембранные связывающие гликопротеины, такие как интегрины, кальций-зависимые белки, такие как кадгеринины, и белки суперсемейства однопроходных трансмембранных иммуноглобулинов (Ig), таких как молекулы межклеточной адгезии (ICAM), которые способствуют, например, контакту клетка-клетка или клетка-матрикс. Типичные молекулы адгезии включают LFA-3 и ICAM, такие как ICAM-1. Техники, способы и реагенты, полезные для отбора, клонирования, получения и экспрессии примеров вспомогательных молекул, включая костимуляторные молекулы и молекулы адгезии, представлены, например, в патентах США №№ 6225042, 6355479 и 6362001.

#### Антигены

[0170] К антигенам, на которые нацелены генетически сконструированные антигенные рецепторы, относятся антигены, экспрессируемые в контексте заболевания, состояния или типа клеток, на которые нацелена адоптивная клеточная терапия. К заболеваниям и состояниям относятся пролиферативные, неопластические, злокачественные опухоли и нарушения, включая раки и опухоли, в том числе гематологические злокачественные опухоли, злокачественные опухоли иммунной системы, такие как лимфомы, лейкозы, и/или миеломы, такие как В-, Т- и миелолейкозы, лимфомы и множественные миеломы. В некоторых вариантах осуществления антиген избирательно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках заболевания или состояния, например, опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других вариантах осуществления антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на сконструированных клетках.

[0171] Любой подходящий антиген может быть мишенью в настоящем способе. Антиген может быть ассоциирован с определенными злокачественными клетками, но не ассоциирован с незлокачественными клетками, в некоторых случаях. Примеры антигенов в качестве неограничивающих примеров включают, антигенные молекулы от возбудителей инфекции, аутоантигены, опухоль/злокачественная опухоль-ассоциированные антигены, и опухолевые неоантигены (Linnemann et al., 2015). В

отдельных аспектах, антигены включают NY-ESO, EGFRvIII, Muc-1, Her2, CA-125, WT-1, Mage-A3, Mage-A4, Mage-A10, TRAIL/DR4 и CEA. В отдельных аспектах, антигены для двух или более антигенных рецепторов в качестве неограничивающих примеров включают, CD19, EBNA, WT1, CD123, NY-ESO, EGFRvIII, MUC1, HER2, CA-125, WT1, Mage-A3, Mage-A4, Mage-A10, TRAIL/DR4, и/или CEA. Последовательности этих антигенов известны в данной области, например, в базе данных GenBank®: CD19 (Номер доступа NG\_007275.1), EBNA (Номер доступа NG\_002392.2), WT1 (Номер доступа NG\_009272.1), CD123 (Номер доступа NC\_000023.11), NY-ESO (Номер доступа NC\_000023.11), EGFRvIII (Номер доступа NG\_007726.3), MUC1 (Номер доступа NG\_029383.1), HER2 (Номер доступа NG\_007503.1), CA-125 (Номер доступа NG\_055257.1), WT1 (Номер доступа NG\_009272.1), Mage-A3 (Номер доступа NG\_013244.1), Mage-A4 (Номер доступа NG\_013245.1), Mage-A10 (Номер доступа NC\_000023.11), TRAIL/DR4 (Номер доступа NC\_000003.12) и/или CEA (Номер доступа NC\_000019.10).

[0172] Опухولةассоциированные антигены, в качестве примеров, могут быть получены из злокачественных опухолей предстательной железы, молочной железы, толстой кишки, легкого, поджелудочной железы, почек, из мезотелиомы, из злокачественных опухолей яичника, печени, головного мозга, кости, желудка, селезенки, яичка, шеи, ануса, желчного пузыря, щитовидной железы или из меланомы. Примеры опухولةассоциированных антигенов или антигенов, полученных из опухоловых клеток, включают MAGE 1, 3 и MAGE 4 (или другие антигены MAGE, такие как те, которые описаны в международной патентной публикации № WO99/40188); PRAME; BAGE; RAGE, Lage (также известный как NY ESO 1); SAGE; и HAGE или GAGE. Эти неограничивающие примеры опухоловых антигенов, которые экспрессируются в широком диапазоне типов опухолей, таких как меланома, карцинома легкого, саркома и карцинома мочевого пузыря. См., например, патент США № 6544518. Опухولةассоциированные антигены рака предстательной железы включают, например, специфический мембранный антиген предстательной железы (PSMA), специфический антиген простаты (PSA), кислые фосфаты предстательной железы, NKX3.1 и эпителиальный антиген предстательной железы с шестью трансмембранными доменами (STEAP).

[0173] Другие опухولةассоциированные антигены включают Plu-1, HASH-1, HasH-2, Cripto и Criptin. Дополнительно, опухоловый антиген может быть аутопептидным гомоном, таким как полноразмерный гонадотропин-высвобождающий гормон (GnRH), короткий пептид длиной в 10 аминокислот, полезный при лечении многих злокачественных опухолей.

[0174] Опухоловые антигены включают опухоловые антигены, полученные из злокачественных опухолей, которые характеризуются экспрессией опухولةассоциированного антигена, такой как экспрессия HER-2/neu. Опухولةассоциированные антигены, представляющие интерес, включают линиеспецифические опухоловые антигены, такие как антигены линии меланоцит-

меланома MART-1/Melan-A, gp100, gp75, mda-7, тирозиназа и родственный тирозиназе белок. Иллюстративные опухолеассоциированные антигены в качестве неограничивающих примеров включают опухолевые антигены, полученные из или содержащие любой один или более из, p53, Ras, c-Myc, цитоплазматические серин/треонин киназы (например, A-Raf, B-Raf и C-Raf, циклинзависимые киназы), MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, тирозиназа, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Сур-В, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), рецепторы TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, антиген опухоли Вильмса (WT1), AFP, катенин/м, каспаза-8/м, CEA, CDK-4/м, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Myosin/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, аннексин II, CDC27/m, TPI/mbcra-bl, BCR-ABL, регуляторный фактор 4 интерферона (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR, опухолеассоциированный трансдуктор кальциевого сигнала 1 (TACSTD1) TACSTD2, рецептор тирозинкиназы (например, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) (в частности, EGFRvIII), рецептор фактора роста тромбоцитов (PDGFR), фактор роста эндотелия сосудов (VEGFR)), цитоплазматические тирозинкиназы (например, семейство src, семейство syk-ZAP70), интегрин-связанная киназа (ILK), трансдукторы сигналов и активаторы транскрипции STAT3, STATS и STATE, факторы, индуцируемые гипоксией (например, HIF-1 и HIF-2), ядерный фактор каппа В (NF-B), рецепторы Notch (например, Notch 1-4), c-Met, мишени рапамицина у млекопитающих (mTOR), WNT, внеклеточные сигнал-регулируемые киназы (ERK) и их регуляторные субъединицы, PMSA, PR-3, MDM2, мезотелин, почечноклеточная карцинома-5T4, SM22-альфа, карбоангидразы I (CAI) и IX (CAIX) (также известный как G250), STEAD, TEL/AML1, GD2, протеиназа 3, hTERT, точки остановки транслокации при саркоме, EphA2, MЛ-IAP, EpCAM, ERG (ген слияния TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, рецептор андрогенов, циклин В1, полисиаловая кислота, MYCN, RhoC, GD3, фукозил GM1, мезотелин, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLobоH, NY-BR-1, RGsS, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, белок 17 спермы, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, легумаин, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, связанный с fos антиген 1, CBX2, CLDN6, SPANX, TPTE, ACTL8, ANKRD30A, CDKN2A, MAD2L1, CTAG1B, SUNC1, LRRN1 и идиотип.

[0175] Антигены могут включать эпитопные области или эпитопные пептиды, происходящие из генов, мутировавших в опухолевых клетках, или генов, транскрибируемых на разных уровнях в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками, таких как фермент теломераза, сурвивин, мезотелин, мутированный gas, реаранжировка bcr/abl, Her2/neu, мутировавший или дикого типа p53, цитохром P450 1B1, и аномально экспрессируемые последовательности интронов, такие как N-ацетилглюкозаминилтрансфераза-V; клональные перестройки генов иммуноглобулинов, порождающие уникальные идиотипы при миеломе и В-клеточных

лимфомах; опухолевые антигены, которые включают эпитопные области или эпитопные пептиды, полученные в результате онковирусных процессов, такие как белки Е6 и Е7 вируса папилломы человека; белок LMP2 вируса Эпштейна-Барра; немутантные онкофетальные белки с опухоль-селективной экспрессией, такие как раково-эмбриональный антиген и альфа-фетопротеин.

[0176] В других вариантах осуществления антиген получен или происходит из патогенного микроорганизма или из условно-патогенного микроорганизма (также называемого в настоящем документе микроорганизм инфекционного заболевания), такого как вирус, грибок, паразит и бактерия. В некоторых вариантах осуществления антигены, полученные из такого микроорганизма, включают полноразмерные белки.

[0177] Примеры патогенных организмов, антигены которых рассматриваются для применения в способе, описываемом в настоящем документе, включают вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус простого герпеса (HSV), респираторно-синцитиальный вирус (RSV), цитомегаловирус (CMV), вирус Эпштейна-Барр (EBV), вирус гриппа А, В и С, вирус везикулярного стоматита (VSV), полиомавирус (например, вирус ВК и вирус JC), аденовирус, виды *Staphylococcus*, включая устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus* (MRSA), и виды *Streptococcus*, включая *Streptococcus pneumoniae*. Как будет понятно специалисту, белки, полученные из этих и других патогенных микроорганизмов для применения в качестве антигена, как описано в настоящем документе, и нуклеотидные последовательности, кодирующие белки, могут быть идентифицированы в публикациях и в общедоступных базах данных, таких как GENBANK®, SWISS-PROT® и TREMBL®.

[0178] Антигены, полученные из вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) включают любые из структурных белков вириона ВИЧ (например, gp120, gp41, p17, p24), протеазу, обратную транскриптазу, или белки ВИЧ, кодируемые *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* и *vpr*.

[0179] Антигены, полученные из вируса простого герпеса (например, HSV1 и HSV2), в качестве неограничивающих примеров включают белки, экспрессируемые из поздних генов HSV. Группа поздних генов преимущественно кодирует белки, образующие частицу вириона. Такие белки включают пять белков из (UL), которые образуют вирусный капсид: UL6, UL18, UL35, UL38 и белок главного капсида UL19, UL45 и UL27, каждый из которых можно использовать как антиген, описанный в настоящем документе. Другие иллюстративные белки HSV, предусмотренные для применения в качестве антигенов в настоящем документе, включают белки ICP27 (H1, H2), белки гликопротеина В (gB) и гликопротеина D (gD). Геном HSV включает, по меньшей мере, 74 гена, каждый из которых кодирует белок, который потенциально можно использовать как антиген.

[0180] Антигены, полученные из цитомегаловируса (CMV), включают структурные белки CMV, вирусные антигены, экспрессируемые во время предранней и ранней фаз вирусной репликации, гликопротеины I и III, белок капсида, белок оболочки, белок нижнего матрикса pp65 (ppUL83), p52 (ppUL44), IE1 и IE2 (UL123 и UL122), белковые

продукты из кластера генов из UL128-UL150 (Rykman, et al., 2006), оболочечный гликопротеин В (gB), gH, gN, и pp150. Как будет понятно специалисту, белки CMV для применения в качестве антигенов, описываемые в настоящем документе, можно идентифицировать в общедоступных базах данных, таких как GENBANK®, SWISS-PROT® и TREMBL® (см. например, Bennekov et al., 2004 ; Loewendorf et al., 2010; Marschall et al., 2009).

[0181] Антигены, полученные из вируса Эпштейна-Барра (EBV), которые рассматриваются для применения в определенных вариантах осуществления, включают литические белки EBV gp350 и gp110, белки EBV, продуцируемые во время латентного цикла инфекции, включая ядерный антиген Эпштейна-Барра (EBNA)-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-лидерный белок (EBNA-LP) и латентные мембранные белки (LMP)-1, LMP-2A и LMP-2B (см., например, Lockey et al., 2008).

[0182] Антигены, полученные из респираторно-синцитиального вируса (RSV), которые рассматриваются для применения по настоящему документу, включают любой из одиннадцати белков, кодируемых геном RSV, или его антигенные фрагменты: NS1, NS2, N (нуклеокапсидный белок), М (матричный белок), SH, G и F (белки вирусной оболочки), M2 (второй матричный белок), M2-1 (фактор элонгации), M2-2 (регуляция транскрипции), РНК-полимераза и фосфопротеин Р.

[0183] Антигены, полученные из вируса везикулярного стоматита (VSV), которые рассматриваются для применения, включают любой из основных белков, кодируемый геном VSV, и его антигенные фрагменты: большой белок (L), гликопротеин (G), нуклеопротеин (N), фосфопротеин (P) и матричный белок (M) (см., например, Rieder et al., 1999).

[0184] Антигены, полученные из вируса гриппа, которые рассматриваются для применения в определенных вариантах осуществления, включают гемагглютинин (HA), нейраминидазу (NA), нуклеопротеин (NP), матричные белки M1 и M2, NS1, NS2 (NEP), PA, PB1, PB1-F2 и PB2.

[0185] Типичные вирусные антигены также в качестве неограничивающих примеров включают аденовирусные полипептиды, альфавирусные полипептиды, калицивирусные полипептиды (например, капсидный антиген калицивируса), полипептиды коронавируса, полипептиды вируса чумки, полипептиды вируса Эбола, полипептиды энтеровируса, полипептиды флавивируса, полипептиды вируса гепатита (AE) (коровый или поверхностный антиген гепатита В, гликопротеины E1 или E2, коровые или неструктурные белки вируса гепатита С), полипептиды вируса герпеса (включая вирус простого герпеса или гликопротеин вируса ветряной оспы), полипептиды вируса инфекционного перитонита, полипептиды вируса лейкоза, полипептиды Марбургского вируса, полипептиды ортомиксовируса, полипептиды вируса папилломы, полипептиды вируса парагриппа (например, полипептиды гемагглютинина и нейраминидазы), полипептиды парамиксовируса, полипептиды парвовируса, полипептиды пестивируса, полипептиды пикорнавируса (например, полипептид капсида



полиовируса), полипептиды вируса оспы (например, полипептид вируса осповакцины), полипептиды вируса бешенства (например, гликопротеин G вируса бешенства), полипептиды реовируса, полипептиды ретровируса и полипептиды ротавируса.

[0186] В некоторых вариантах осуществления антиген может быть бактериальным антигеном. В определенных вариантах осуществления представляющий интерес бактериальный антиген может быть секретлируемым полипептидом. В других определенных вариантах осуществления бактериальные антигены включают антигены, которые имеют часть или части полипептида, представленные на внешней клеточной поверхности бактерий.

[0187] Антигены, полученные из видов *Staphylococcus*, включая метициллин-резистентный золотистый стафилококк (MRSA), которые рассматриваются для применения, включают регуляторы вирулентности, такие как система Agr, Sar и Sae, система Arl, гомологи Sar (Rot, MgrA, SarS, SarR, SarT, SarU, SarV, SarX, SarZ и TcaR), система Srr и TRAP. Другие белки *Staphylococcus*, которые могут служить в качестве антигенов, включают белки Clp, HtrA, MsrR, аконитазу, CcpA, SvrA, Msa, CfvA и CfvB (см., например, *Staphylococcus: Molecular Genetics*, 2008 Caister Academic Press, Ed. Jodi Lindsay). Геномы двух видов *Staphylococcus aureus* (N315 и Mu50) были секвенированы и являются общедоступными, например, в PATRIC (PATRIC: The VBI PathoSystems Resource Integration Center, Snyder et al., 2007). Как будет понятно специалисту, белки *Staphylococcus* для применения в качестве антигенов также могут быть идентифицированы в других общедоступных базах данных, таких как GenBank®, Swiss-Prot® и TrEMBL®.

[0188] Антигены, полученные из *Streptococcus pneumoniae*, которые рассматриваются для применения в определенных вариантах осуществления, включают пневмолизин, PspA, холин-связывающий белок A (CbpA), NanA, NanB, SpnHL, PavA, LytA, Pht и пилиновые белки (RrgA; RrgB; RrgC). Антигенные белки *Streptococcus pneumoniae* также известны в данной области и их можно использовать в качестве антигена в некоторых вариантах осуществления (см., например, Zysk et al., 2000). Полная геномная последовательность вирулентного штамма *Streptococcus pneumoniae* была секвенирована, и, как будет понятно специалисту, белки *S. pneumoniae* для применения по настоящему документу также могут быть идентифицированы в других общедоступных базах данных, таких как GENBANK®, SWISS-PROT® и TREMBL®. Белки, представляющие особый интерес для антигенов согласно настоящему изобретению, включают факторы вирулентности и белки, которые, по прогнозам, будут находиться на поверхности пневмококков (см., например, Frolet et al., 2010).

[0189] Примеры бактериальных антигенов, которые можно использовать в качестве антигенов в качестве неограничивающих примеров включают полипептиды *Actinomyces*, полипептиды *Bacillus*, полипептиды *Bacteroides*, полипептиды *Bordetella*, полипептиды *Bartonella*, полипептиды *Borrelia* (например, *B. burgdorferi* OspA), полипептиды *Brucella*, полипептиды *Campylobacter*, полипептиды *Carnocytophaga*, полипептиды *Chlamydia*, полипептиды *Corynebacterium*, полипептиды *Coxiella*, полипептиды *Dermatophilus*,

полипептиды *Enterococcus*, полипептиды *Ehrlichia*, полипептиды *Escherichia*, полипептиды *Francisella*, полипептиды *Fusobacterium*, полипептиды *Haemobartonella*, полипептиды *Haemophilus* (например, белок наружной мембраны *H. influenzae* тип b), полипептиды *Helicobacter*, полипептиды *Klebsiella*, полипептиды L-формы бактерий, полипептиды *Leptospira*, полипептиды *Listeria*, полипептиды *Mycobacteria*, полипептиды *Mycoplasma*, полипептиды *Neisseria*, полипептиды *Neorickettsia*, полипептиды *Nocardia*, полипептиды *Pasteurella*, полипептиды *Peptococcus*, полипептиды *Peptostreptococcus*, полипептиды *Pneumococcus* (т.е., полипептиды *S. pneumoniae*) (см. описание в настоящем документе), полипептиды *Proteus*, полипептиды *Pseudomonas*, полипептиды *Rickettsia*, полипептиды *Rochalimaea*, полипептиды *Salmonella*, полипептиды *Shigella*, полипептиды *Staphylococcus*, полипептиды группы A streptococcus (например, M-белки *S. pyogenes*), полипептиды группы B streptococcus (*S. agalactiae*), полипептиды *Treponema*, и полипептиды *Yersinia* (например, антигены F1 и V *Y. pestis*).

[0190] Примеры грибковых антигенов в качестве неограничивающих примеров включают полипептиды *Absidia*, полипептиды *Acremonium*, полипептиды *Alternaria*, полипептиды *Aspergillus*, полипептиды *Basidiobolus*, полипептиды *Bipolaris*, полипептиды *Blastomyces*, полипептиды *Candida*, полипептиды *Coccidioides*, полипептиды *Conidiobolus*, полипептиды *Cryptococcus*, полипептиды *Curvalaria*, полипептиды *Epidermophyton*, полипептиды *Exophiala*, полипептиды *Geotrichum*, полипептиды *Histoplasma*, полипептиды *Madurella*, полипептиды *Malassezia*, полипептиды *Microsporum*, полипептиды *Moniliella*, полипептиды *Mortierella*, полипептиды *Mucor*, полипептиды *Raecilomyces*, полипептиды *Penicillium*, полипептиды *Phialemonium*, полипептиды *Phialophora*, полипептиды *Prototheca*, полипептиды *Pseudallescheria*, полипептиды *Pseudomicrodochium*, полипептиды *Pythium*, полипептиды *Rhinosporidium*, полипептиды *Rhizopus*, полипептиды *Scolecobasidium*, полипептиды *Sporothrix*, полипептиды *Stemphylium*, полипептиды *Trichophyton*, полипептиды *Trichosporon* и полипептиды *Xylohypha*.

[0191] Примеры антигенов простейших паразитов в качестве неограничивающих примеров включают полипептиды *Babesia*, полипептиды *Balantidium*, полипептиды *Besnoitia*, полипептиды *Cryptosporidium*, полипептиды *Eimeria*, полипептиды *Encephalitozoon*, полипептиды *Entamoeba*, полипептиды *Giardia*, полипептиды *Hammondia*, полипептиды *Hepatozoon*, полипептиды *Isospora*, полипептиды *Leishmania*, полипептиды *Microsporidia*, полипептиды *Neospora*, полипептиды *Nosema*, полипептиды *Pentatrichomonas*, полипептиды *Plasmodium*. Примеры антигенов гельминтных паразитов в качестве неограничивающих примеров включают полипептиды *Acanthocheilonema*, полипептиды *Aelurostrongylus*, полипептиды *Ancylostoma*, полипептиды *Angiostrongylus*, полипептиды *Ascaris*, полипептиды *Brugia*, полипептиды *Bunostomum*, полипептиды *Capillaria*, полипептиды *Chabertia*, полипептиды *Cooperia*, полипептиды *Crenosoma*, полипептиды *Dictyocaulus*, полипептиды *Dioctophyme*, полипептиды *Dipetalonema*, полипептиды *Diphyllobothrium*, полипептиды *Diplydium*, полипептиды *Diriofilaria*,

полипептиды *Dracunculus*, полипептиды *Enterobius*, полипептиды *Filaroides*, полипептиды *Haemonchus*, полипептиды *Lagochilascaris*, полипептиды *Loa*, полипептиды *Mansonella*, полипептиды *Muellerius*, полипептиды *Nanophyetus*, полипептиды *Necator*, полипептиды *Nematodirus*, полипептиды *Oesophagostomum*, полипептиды *Onchocerca*, полипептиды *Opisthorchis*, полипептиды *Ostertagia*, полипептиды *Parafilaria*, полипептиды *Paragonimus*, полипептиды *Parascaris*, полипептиды *Physaloptera*, полипептиды *Protostrongylus*, полипептиды *Setaria*, полипептиды *Spirocerca*, полипептиды *Spirometra*, полипептиды *Stephanofilaria*, полипептиды *Strongyloides*, полипептиды *Strongylus*, полипептиды *Thelazia*, полипептиды *Toxascaris*, полипептиды *Toxocara*, полипептиды *Trichinella*, полипептиды *Trichostrongylus*, полипептиды *Trichuris*, полипептиды *Uncinaria*, и полипептиды *Wuchereria* (например, циркумспороzoитный белок *P. falciparum* (PfCSP)), поверхностный белок 2 спорозоида (PfSSP2), карбоксильный конец антигена 1 печеночной стадии (PfLSA1 c-term), и секретируемый белок 1 (PfExp-1), полипептиды *Pneumocystis*, полипептиды *Sarcocystis*, полипептиды *Schistosoma*, полипептиды *Theileria*, полипептиды *Toxoplasma* и полипептиды *Trypanosoma*.

[0192] Примеры антигенов эктопаразитов в качестве неограничивающих примеров включают полипептиды (в том числе антигены, а также аллергены) от блох; клещей, в том числе твердых и мягких; мух, таких как гнус, комары, москиты, мошки, лошадиные мухи, малые коровьи жигалки, оленьи слепни, мухи цеце, жигалки обыкновенные, мухи, вызывающие миаз, и кусающие мошки; муравьи; пауки, вши; клещи; и настоящие клопы, так как постельные клопы и триатомовые клопы.

#### Суицидные гены

[0193] В некоторых случаях любые клетки по настоящему изобретению модифицированы для продуцирования одного или более агентов, кроме гетерологичных цитокинов, сконструированных рецепторов и т.д. В конкретных вариантах осуществления клетки, такие как НК-клетки, сконструированы так, чтобы содержать один или более суицидных генов, и как применяют в настоящем документе, термин «суицидный ген» определяют как ген, который при введении пролекарственного средства вызывает переход продукта гена в соединение, которое убивает его клетку-хозяина. В некоторых случаях НК-клеточная терапия может быть предметом для воздействия одного или более суицидальных генов любого типа, когда у человека, получающего НК-клеточную терапию и/или получившего НК-клеточную терапию, проявляются один или более симптомов одного или более побочных эффектов, таких как синдром высвобождения цитокинов, нейротоксичность, анафилаксия/аллергия, и/или целевая/нецелевая токсичность для опухоли (в качестве примеров) или терапия рассматривается как риск возникновения одного или более симптомов, в том числе в ближайшем будущем. Использование суицидного гена может быть частью запланированного протокола терапии или его можно использовать только при признании необходимости в его использовании. В некоторых случаях клеточная терапия прекращается использованием агента/агентов, нацеленных на суицидный ген или продукт гена, потому что терапия больше не требуется.

[0194] Примеры суицидных генов включают сконструированные мутантные полипептиды несекретируемого (включая связанный с мембраной) фактора некроза опухоли (TNF)-альфа (см. PCT/US19/62009, который полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки), и они могут быть нацелены путем доставки при помощи антитела, связывающего мутантный TNF-альфа. Примеры комбинаций суицидного гена/пролекарственного средства, которые можно использовать, представляют собой тимидинкиназу вируса простого герпеса (HSV-tk) и ганцикловир, ацикловир или FIAU; оксидоредуктазу и циклогексимид; цитозиндезаминазу и 5-фторцитозин; тимидинкиназу-тимидилаткиназу (Tdk:Tmk) и AZT; и дезоксицитидинкиназу и цитозинарабинозид. Можно использовать пуриннуклеозидфосфорилазу E.coli, так называемый суицидный ген, который превращает пролекарственное средство 6-метилпуриндезоксирибозид в токсичный пурин 6-метилпурин. Другие суицидные гены включают в качестве примеров CD20, CD52, индуцибельную каспазу 9, пуриннуклеозидфосфорилазу (PNP), ферменты цитохрома р450 (CYP), карбоксипептидазы (CP), карбоксилэстеразу (CE), нитроредуктазу (NTR), фермент рибозилтрансферазу (XGRTP), метионин- $\alpha,\gamma$ -лиазу (MET) и тимидинфосфорилазу (TP).

#### Способы доставки

[0195] Специалист в данной области будет хорошо подготовлен для конструирования векторов с помощью стандартных рекомбинантных способов (см., например, Sambrook et al., 2001 и Ausubel et al., 1996, оба включены в настоящий документ в качестве ссылок) для экспрессии антигенных рецепторов по настоящему изобретению. Векторы в качестве неограничивающих примеров включают плазмиды, космиды, вирусы (бактериофаг, вирусы животных и вирусы растений) и искусственные хромосомы (например, YAC), такие как ретровирусные векторы (например, векторы, полученные из вируса лейкоза Молони у мышей (MoMLV), MSCV, SFFV, MPSV, SNV и т.д.), лентивирусные векторы (например, полученные из ВИЧ-1, ВИЧ-2, SIV, BIV, FIV и т.д.), аденовирусные (Ad) векторы, включая их компетентные по репликации, ограниченные по репликации и выпотрошенные формы, аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы, векторы на основе обезьяньего вируса 40 (SV-40), векторы на основе вируса бычьей папилломы, векторы на основе вируса Эпштейна-Барр, векторы на основе вируса герпеса, векторы на основе вируса осповакцины, векторы на основе вируса саркомы Харви у мышей, векторы на основе вируса опухоли молочной железы мышей, векторы на основе вируса саркомы Рауса, векторы на основе парвовируса, векторы на основе вируса везикулярного стоматита, векторы на основе вируса Мараба и векторы на основе аденовируса группы В энadenотусирев.

[0196] В конкретных вариантах осуществления вектор представляет собой мультицистронный вектор, как описано в PCT/US19/62014, который полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки. В таких случаях один вектор может кодировать CAR или TCR (и экспрессирующая конструкция может быть сконфигурирована в модульном формате, позволяющем заменять части CAR или TCR), суицидный ген и один

или более цитокинов.

#### Вирусные векторы

[0197] В определенных аспектах настоящее изобретение относится к вирусным векторам, кодирующим антигенный рецептор. При получении рекомбинантных вирусных векторов гены, которые не являются существенными, как правило, заменяют геном или кодирующей последовательностью для гетерологичного (или ненативного) белка. Вирусный вектор представляет собой тип экспрессирующей конструкции, которая использует вирусную последовательность для введения нуклеиновой кислоты и, возможно, белков в клетку. Способность некоторых вирусов инфицировать клетки или входить в клетки через рецептор-опосредованный эндоцитоз и интегрироваться в геномы клетки-хозяина, и стабильно и эффективно экспрессировать вирусные гены сделала их привлекательными кандидатами для переноса чужеродных нуклеиновых кислот в клетки (например, клетки млекопитающих). Неограничивающие примеры вирусных векторов, которые можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты по определенным аспектам настоящего изобретения, описаны ниже.

[0198] Лентивирусы представляют собой сложные ретровирусы, которые, в дополнение к обычным ретровирусным генам *gag*, *pol* и *env*, содержат другие гены с регуляторной или структурной функцией. Лентивирусные векторы хорошо известны в данной области (см., например, патенты США 6013516 и 5994136).

[0199] Рекомбинантные лентивирусные векторы способны инфицировать неделящиеся клетки и их можно использовать для переноса генов и экспрессии последовательностей нуклеиновой кислоты, как *in vivo*, так и *ex vivo*. Например, рекомбинантный лентивирус, способный инфицировать неделящуюся клетку, где подходящую клетку-хозяина трансфицируют двумя или более векторами, несущими функции упаковки, а именно *gag*, *pol* и *env*, а также *rev* и *tat*, описан в патенте США 5994136, включенном в настоящий документ в качестве ссылки.

#### Регуляторные элементы

[0200] Экспрессирующие кассеты, включенные в векторы, подходящие для настоящего изобретения, в частности, содержат (в направлении 5'-3') эукариотический промотор транскрипции, функционально связанный с белок-кодирующей последовательностью, сигналы сплайсинга, включая промежуточные последовательности, и последовательность терминации транскрипции/полиаденилирования. Промоторы и энхансеры, контролирующие транскрипцию белок-кодирующих генов в эукариотических клетках, состоят из множества генетических элементов. Клеточный аппарат способен собирать и интегрировать регуляторную информацию, передаваемую каждым элементом, позволяя различным генам развиваться по отдельным, часто сложным моделям регуляции транскрипции. Промотор, используемый в отношении настоящего изобретения, включает конститутивный, индуцируемый и тканеспецифический промоторы.

#### Промоторы/Энхансеры

[0201] Экспрессирующие конструкции, предлагаемые в настоящем документе,

содержат промотор для управления экспрессией антигенного рецептора. Промотор, в основном, состоит из последовательности, функционирующей для обозначения позиции начального сайта для синтеза РНК. Самым известным примером этого промотора является ТАТА-бокс, но в некоторых промоторах, в которых отсутствует ТАТА-бокс, как, например, промотор для гена терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы у млекопитающих, и промотор для поздних генов SV40, отдельный элемент, лежащий над самым начальным сайтом, помогает зафиксировать место инициации. Дополнительные промоторные элементы регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в районе 30-110 п.н. перед начальным сайтом, хотя было показано, что ряд промоторов содержат функциональные элементы также и за начальным сайтом. Чтобы поставить кодирующую последовательность «под контроль» промотора, нужно позиционировать 5'-конец сайта инициации транскрипции транскрипционной рамки считывания «ниже по течению» (т.е. 3' от) выбранного промотора. Промотор «вверх по течению» стимулирует транскрипцию ДНК и способствует экспрессии закодированной РНК.

[0202] Расстояние между промоторными элементами часто бывает гибким, так что промоторная функция сохраняется, когда элементы переворачиваются или перемещаются относительно друг друга. В промоторе tk расстояние между промоторными элементами можно увеличить до 50 п.н., до того, как активность начнет снижаться. В зависимости от промотора оказывается, что отдельные элементы могут функционировать либо совместно, либо независимо для активации транскрипции. Промотор можно использовать или не использовать в сочетании с «энхансером», который обозначает цис-действующую регуляторную последовательность, участвующую в активации транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты.

[0203] Промотор может быть промотором, естественным образом ассоциированным с последовательностью нуклеиновой кислоты, которую можно получать путем выделения 5'-некодирующих последовательностей, расположенных перед кодирующим сегментом и/или экзоном. Такой промотор может быть обозначен как «эндогенный». Точно так же энхансером может быть энхансер, естественно связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, расположенный либо ниже, либо выше этой последовательности. Альтернативно, определенные преимущества будут получены путем размещения сегмента кодирующей нуклеиновой кислоты под контролем рекомбинантного или гетерологичного промотора, который обозначает промотор, который обычно не связан с последовательностью нуклеиновой кислоты в ее естественном окружении. Рекомбинантный или гетерологичный энхансер относится также к энхансеру, обычно не связанному с последовательностью нуклеиновой кислоты в ее естественном окружении. Такие промоторы или энхансеры могут включать в себя промоторы или энхансеры других генов, и промоторы или энхансеры, выделенные из любого другого вируса, или прокариотической или эукариотической клетки, и промоторы или энхансеры, не «природные», т.е. содержащие различные элементы различных областей регуляции

транскрипции, и/или мутации, которые изменяют экспрессию. Например, промоторы, которые наиболее широко используются в конструкции рекомбинантной ДНК, включают промоторные системы  $\beta$ -лактамазы (пенициллиназы), лактозы и триптофана (*trp*). В дополнение к получению последовательностей нуклеиновой кислоты промоторов и энхансеров синтетическим путем, последовательности можно получать с использованием рекомбинантного клонирования и/или технологии амплификации нуклеиновых кислот, включая ПЦР™, в связи с композициями, описываемыми в настоящем документе. Кроме того, предполагается, что также могут быть использованы контрольные последовательности, которые направляют транскрипцию и/или экспрессию последовательностей внутри неядерных органелл, таких как митохондрии, хлоропласты и т.п.

[0204] Естественно, будет важно использовать промотор и/или энхансер, который эффективно направляет экспрессию сегмента ДНК в органелле, типе клеток, ткани, органе или организме, выбранных для экспрессии. Специалисты в данной области молекулярной биологии в основном знают использование комбинаций промоторов, энхансеров и типов клеток для экспрессии белка (см., например, Sambrook et al. 1989, включен в настоящий документ в качестве ссылки). Используемые промоторы могут быть конститутивными, тканеспецифическими, индуцируемыми и/или полезными при соответствующих условиях для управления высоким уровнем экспрессии введенного сегмента ДНК, так как это является преимуществом в крупномасштабном производстве рекомбинантных белков и/или пептидов. Промотор может быть гетерологичным или эндогенным.

[0205] Дополнительно, любую комбинацию промотор/энхансер (в соответствии, например, с базой данных эукариотических промоторов EPDB, через Интернет на [epd.isb-sib.ch/](http://epd.isb-sib.ch/)) также можно использовать для управления экспрессией. Другой возможный вариант осуществления представляет собой использование цитоплазматической экспрессирующей системы T3, T7 или SP6. Эукариотические клетки могут поддерживать цитоплазматическую транскрипцию с определенных бактериальных промоторов, если предусмотрена соответствующая бактериальная полимеразы, либо как часть комплекса доставки, либо в виде дополнительной генетической экспрессирующей конструкции.

[0206] Неограничивающие примеры промоторов включают ранние или поздние вирусные промоторы, такие как, ранние или поздние промоторы SV40, предранние промоторы цитомегаловируса (CMV), ранние промоторы вируса саркомы Рауса (RSV); промоторы эукариотической клетки, такие как, например, промотор бета-актина, промотор GADPH, промотор металлотioneина; и промоторы последовательно соединенного элемента ответа, такие как промоторы элемента ответа на циклический АМФ (*cre*), промотор элемента ответа на сыворотку (*sre*), промотор сложного эфира форбола (TPA) и промоторы элементов ответа (*tre*) рядом с минимальным ТАТА-боксом. Также возможно использовать промотор опухоли молочной железы (например, минимальный промотор гормона роста, описанный в GenBank®, номер доступа X05244, нуклеотиды 283-341) или промотор опухоли молочной железы мыши (доступен в ATCC,

каталожный номер ATCC 45007). В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой CMV IE, дектин-1, дектин-2, человеческий CD11c, F4/80, SM22, RSV, SV40, Ad MLP, бета-актин, промотор МНС класса I или МНС класса II, однако любой другой промотор подходящий для управления экспрессией терапевтического гена, применим к практике по настоящему изобретению.

[0207] В определенных аспектах, способы по изобретению также относятся к энхансерным последовательностям, т.е., последовательностям нуклеиновой кислоты, которые увеличивают активность промоторов и которые обладают потенциалом действовать в цис-ориентации, и независимо от их ориентации, даже на относительно больших расстояниях (до нескольких килобаз от целевого промотора). Однако функция энхансеров не обязательно ограничена такими большими расстояниями, поскольку они также могут действовать в непосредственной близости с данным промотором.

#### Сигналы инициации и связанная экспрессия

[0208] Специфический сигнал инициации также можно использовать в экспрессирующих конструкциях, предлагаемых в настоящем изобретении, для эффективной трансляции кодирующих последовательностей. Эти сигналы включают иницирующий кодон ATG или соседние последовательности. Может потребоваться обеспечить экзогенные сигналы управления трансляцией, включая иницирующий кодон ATG. Специалист в данной области легко сможет это определить и обеспечить необходимые сигналы. Хорошо известно, что иницирующий кодон должен находиться «в рамке» с рамкой считывания желаемой кодирующей последовательности, чтобы гарантировать трансляцию всей вставки. Экзогенные сигналы контроля трансляции и кодоны инициации могут быть как естественными, так и синтетическими. Эффективность экспрессии можно повысить включением соответствующих энхансерных элементов для транскрипции.

[0209] В некоторых вариантах осуществления применяют элементы внутренних участков связывания рибосом (IRES) для создания мультигенных, или полицистронных, транскриптов. Элементы IRES способны обходить модель сканирования рибосом из трансляции, зависимой от 5'-метилированного кэпа и начинать трансляцию на внутренних сайтах. Были описаны элементы IRES от двух членов семейства пикорнавирусов (полиомиелита и энцефаломиокардита), а также транскрипт IRES от млекопитающих. Элементы IRES могут быть связаны в гетерологичные открытые рамки считывания. Множественные открытые рамки считывания могут транскрибироваться вместе, каждая из них разделена IRES, создавая полицистронные сообщения. Благодаря элементу IRES каждая открытая рамка считывания доступна рибосомам для эффективной трансляции. Несколько гены могут быть эффективно экспрессированы с помощью одного промотора/энхансера для расшифровки одного транскрипта.

[0210] Дополнительно, определенные элементы последовательности 2A могут быть использованы для создания связанной или совместной экспрессии генов в конструкциях, предлагаемых в настоящем изобретении. Например, последовательность для расщепления



можно использовать для совместной экспрессии генов путем связывания открытых рамок считывания с образованием единого цистрона. Примером последовательности для расщепления является F2A (вирусная 2A) или «2A-подобная» последовательность (например, 2A вируса *Thea asigna*; T2A).

#### Участки начала репликации

Чтобы размножить вектор в клетке-хозяине, он может содержать один или более участков начала репликации (часто называемых «ori»), например, последовательность нуклеиновой кислоты соответствующей, например, oriP EBV, как описано выше, или генно-инженерный oriP с аналогичной или повышенной запрограммированной функцией, который представляет собой специфическую последовательность нуклеиновой кислоты, на которой инициируется репликация. Альтернативно можно использовать точку начала репликации из другого вируса, реплицирующегося внехромосомно, как описано выше, или автономно реплицирующуюся последовательность (ARS).

#### Селекция и маркеры для скрининга

[0211] В некоторых вариантах осуществления клетки, содержащие конструкцию по настоящему изобретению, могут быть идентифицированы *in vitro* или *in vivo* путем включения маркера в экспрессирующий вектор. Такие маркеры придавали бы идентифицируемое изменение клетке, позволяя легко идентифицировать клетки, содержащие экспрессирующий вектор. В основном, селективный маркер представляет собой маркер, который придает свойство, позволяющее проводить селекцию. Положительный селективный маркер представляет собой маркер, присутствие которого маркера позволяет проводить селекцию по нему, а отрицательный селективный маркер представляет собой маркер, присутствие которого препятствует селекции по этому маркеру. Примером положительного селективного маркера является маркер устойчивости к лекарственному средству.

[0212] Как правило, включение селективный маркер для лекарственного средства помогает в клонировании и идентификации трансформантов, например, гены, которые придают устойчивость к неомицину, пурамицину, гигромицину, DHFR, GPT, зеоцину и гистидинолу подходят в качестве селективных маркеров. В дополнение к маркерам, придающим фенотип, который позволяет различать трансформанты на основе реализации состояний, также рассматриваются другие типы маркеров, включая такие маркеры для скрининга, как GFP, основой которого является колориметрический анализ. Могут быть использованы альтернативные скрининговые ферменты в качестве негативных селективных маркеров, такие как тимидинкиназа (tk) вируса простого герпеса или хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT). Специалист в данной области также знает, как использовать иммунологические маркеры, возможно, в сочетании с анализом FACS. Используемый маркер не считается важным, при условии, что он способен экспрессироваться одновременно с нуклеиновой кислотой, кодирующей продукт гена. Другие примеры селекции и селективные маркеры хорошо известны специалисту в данной области.

### Другие способы доставки нуклеиновой кислоты

[0213] В дополнение к вирусной доставке нуклеиновых кислот, кодирующих антигенный рецептор, далее в настоящем изобретении рассматриваются дополнительные способы рекомбинантной доставки генов в данную клетку-хозяина.

[0214] Для введения нуклеиновой кислоты, такой как ДНК или РНК, в иммунные клетки по настоящему изобретению можно использовать любой подходящий способ доставки нуклеиновой кислоты для трансформации клетки, как описано в настоящем документе, или, как известно специалисту в данной области. Такие способы в качестве неограничивающих примеров включают прямую доставку ДНК, такую как трансфекция *ex vivo*, путем инъекции, включая микроинъекцию; путем электропорации; путем осаждения фосфатом кальция; с использованием ДЭАЭ-декстрана с последующим полиэтиленгликолем; прямой ультразвуковой загрузкой; трансфекцией, опосредованной липосомами, и трансфекцией, опосредованной рецептором; путем бомбардировки микрочастицами; путем перемешивания с волокнами карбида кремния; трансформацией, опосредованной *Agrobacterium*; путем захвата ДНК, опосредованного высушиванием/ингибированием и путем любой комбинации таких способов. Посредством применения таких способов, органелла/органеллы, клетка/клетки, ткань/ткани или организм (-ы) могут быть стабильно или временно трансформированы.

### Способы лечения

[0215] Варианты осуществления настоящего изобретения включают способы лечения индивидуума от злокачественной опухоли, инфекций любого типа и любого иммунного нарушения. Индивидуум может использовать способ лечения по изобретению в качестве начального лечения или после другого лечения или во время другого лечения. Способы иммунотерапии могут быть адаптированы к потребностям индивидуума с злокачественной опухолью на основе типа или стадии злокачественной опухоли, и, в меньшей степени, в некоторых случаях иммунотерапия может быть изменена во время курса лечения индивидуума.

[0216] В конкретных случаях способы лечения следующие: 1) Адоптивная клеточная терапия с Т- или НК-клетками (размноженными *ex vivo* или экспрессирующими CAR или TCR) для лечения пациентов со злокачественной опухолью с любым типом гематологического злокачественного новообразования, (2) Адоптивная клеточная терапия с Т- или НК-клетками (размноженными *ex vivo* или экспрессирующими CAR или TCR) для лечения пациентов со злокачественной опухолью с любым типом солидных злокачественных опухолей, (3) Адоптивная клеточная терапия с Treg и регуляторными В-клетками (размноженными *ex vivo* или экспрессирующими CAR или TCR) для лечения пациентов с иммунными нарушениями, (4) адоптивная клеточная терапия с Т- или НК клетки (размноженными *ex vivo* или экспрессирующими CAR или TCR) для лечения пациентов с инфекционными заболеваниями. Настоящее изобретение впервые показывает, что нокдаун/нокаут нескольких генов в НК-клетках человека способствует улучшенной функциональности клетки и устойчивости к микроокружению опухоли. В конкретных

вариантах осуществления это оказывает прямое влияние на уход за пациентом с использованием нового иммунотерапевтического подхода, который усиливает функцию собственных иммунных клеток пациента или адоптивно перенесенных иммунных клеток. Варианты осуществления предлагают новый подход для получения высокофункциональных Т-, NK- и В-клеток (как размноженных *ex vivo*, так и сконструированных с CAR или TCR) для иммунотерапии. Он включает нацеливание на злокачественные опухоли, как гематологические, так и солидные опухоли (NK-клетки и Т-клетки, а также CAR Т-клетки и CAR NK-клетки), аутоиммунные и аллоиммунные нарушения (В-клетки, регуляторные В-клетки и регуляторные Т-клетки) и лечение инфекций (для патоген-специфичных Т-клеток).

[0217] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам иммунотерапии, включающим введение эффективного количества иммунных клеток по настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления медицинское заболевание или нарушение лечат путем переноса иммунной популяции NK-клеток, которая вызывает иммунный ответ. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения злокачественную опухоль или инфекцию лечат путем переноса иммунной клеточной популяции, которая вызывает иммунный ответ. В настоящем документе предлагаются способы лечения или задержки прогрессирования злокачественной опухоли у индивидуума, включающие введение индивидууму эффективного количества антигенспецифической клеточной терапии. Настоящие способы можно применять для лечения иммунных нарушений, солидных злокачественных опухолей, гематологических злокачественных опухолей, вирусных инфекций.

[0218] Опухоли, для которых подходят настоящие способы лечения, включают любой тип злокачественных клеток, такие как клетки, обнаруженные в солидной опухоли или гематологической опухоли. Примеры солидных опухолей в качестве неограничивающих примеров включают опухоль органа, выбранного из группы, состоящего из поджелудочной железы, толстой кишки, слепой кишки, желудка, головного мозга, головы, шеи, яичника, почки, гортани, саркомы, легкого, мочевого пузыря, меланомы, предстательной железы и молочной железы. Примеры гематологических опухолей включают опухоли костного мозга, Т- или В-клеток, злокачественные новообразования, лейкозы, лимфомы, бластомы, миеломы и т.п. Дополнительные примеры злокачественных опухолей, которые можно лечить с использованием способов, предлагаемых в настоящем документе в качестве неограничивающих примеров включают рак легких (включая мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого), злокачественную опухоль брюшины, желудка или рак желудка (включая злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта и злокачественную опухоль стромы желудочно-кишечного тракта), рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстого кишечника, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак предстательной

железы, рак женских наружных половых органов, рак щитовидной железы, различные типы рака головы и шеи, и меланому.

[0219] Злокачественная опухоль, в частности, может относиться к следующему гистологическому типу, хотя не ограничивается ими: злокачественная неоплазия, карцинома, недифференцированная карцинома, карцинома гигантских и веретенообразных клеток, мелкоклеточная карцинома, папиллярная карцинома, плоскоклеточная карцинома, лимфоэпителиальная карцинома, базально-клеточная карцинома, пиломатриксная карцинома; переходноклеточная карцинома, сосочковая переходноклеточная карцинома, аденокарцинома, злокачественная гастринома, холангиокарцинома, печеночноклеточная карцинома, комбинированная печеночноклеточная карцинома и холангиокарцинома, трабекулярная аденокарцинома, аденоидно-кистозная карцинома, аденокарцинома в аденоматозном полипе, аденокарцинома, семейный полипоз толстой кишки, солидная карцинома, злокачественная карциноидная опухоль, бронхиоло-альвеолярная аденокарцинома, папиллярная аденокарцинома, хромофобная карцинома, ацидофильная карцинома, оксифильная аденокарцинома, базофильная карцинома, светлоклеточная аденокарцинома, зернистоклеточная карцинома, фолликулярная аденокарцинома, папиллярная и фолликулярная аденокарцинома, неинкапсулирующая склерозирующая карцинома, карцинома коры надпочечника, эндометроидная карцинома, карцинома из придатков кожи, апокринная аденокарцинома, аденокарцинома сальных желез, церуминозная аденокарцинома, мукоэпидермоидная карцинома, цистаденокарцинома; папиллярная цистаденокарцинома, сосочковая серозная цистаденокарцинома, муцинозная цистаденокарцинома, муцинозная аденокарцинома, перстневидно-клеточная карцинома, инфильтративно-протоковая карцинома, медуллярная карцинома, дольчатая карцинома, воспалительная карцинома, болезнь Педжета молочной железы, карцинома ацинарных клеток, аденосквамозная карцинома, аденокарцинома с плоскоклеточной метаплазией, злокачественная тимома, злокачественная опухоль стромы яичника, злокачественная текома, злокачественная опухоль гранулезных клеток, злокачественная андробластома, карцинома клеток Сертоли, злокачественная опухоль клеток Лейдига, злокачественная опухоль липидных клеток, злокачественная параганглиома, злокачественная экстрамаммарная параганглиома, феохромоцитома, гломангиосаркома, злокачественная меланома, амеланотическая меланома, поверхностная распространяющаяся меланома, меланома типа злокачественного лентиго, акральная лентигинозная меланома, узловатая меланома, злокачественная меланома в гигантских пигментных невусах, меланома эпителиоидных клеток, злокачественный голубой невус, саркома, фибросаркома, злокачественная фиброзная гистиоцитома, миксосаркома, липосаркома, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, эмбриональная рабдомиосаркома, альвеолярная рабдомиосаркома, стромальная саркома, злокачественная смешанная опухоль, смешанная мюллерова опухоль, нефробластома, гепатобластома, карциносаркома, злокачественная мезенхимома, злокачественная опухоль Бреннера, злокачественная филлодийная опухоль, синовиальная

саркома, злокачественная мезотелиома, дисгерминома, эмбриональная карцинома, злокачественная тератома, злокачественная струма яичника, хориокарцинома, злокачественная мезонефрома, гемангиосаркома, злокачественная гемангиоэндотелиома, саркома Капоши, злокачественная гемангиоперицитома, лимфангиосаркома, остеосаркома, юкстакортикальная остеосаркома, хондросаркома, злокачественная хондробластома, мезенхимальная хондросаркома, гигантоклеточная опухоль кости, саркома Юинга, злокачественная одонтогенная опухоль, амелобластная одонтосаркома, злокачественная амелобластома, амелобластическая фибросаркома, злокачественная пинеалома, хордома, злокачественная глиома, эпендимома, астроцитомы, протоплазматическая астроцитомы, фибриллярная астроцитомы, астробластома, глиобластома, олигодендроглиома, олигодендробластома, примитивная нейроэктодермальная опухоль, мозжечковая саркома, ганглионевробластома, нейробластома, ретинобластома, обонятельная нейрогенная опухоль, злокачественная менигиома, нейрофибросаркома, злокачественная неврилеммома, злокачественная опухоль гранулярных клеток, злокачественная лимфома, заболевание Ходжкина, парагранулема, злокачественная малая лимфоцитарная лимфома, злокачественная крупноклеточная диффузная лимфома, злокачественная фолликулярная лимфома, грибовидный микоз, другие указанные неходжкинские лимфомы, В-клеточная лимфома, низкодифференцированная/фолликулярная неходжкинская лимфома (НХЛ), малая лимфоцитарная (SL) НХЛ, среднедифференцированная/фолликулярная НХЛ, среднедифференцированная диффузная НХЛ, высокодифференцированная иммунобластная НХЛ, лимфобластная высокодифференцированная НХЛ, высокодифференцированная мелкоклеточная с нерассеченными ядрами НХЛ, массивная НХЛ, лимфома мантийных клеток, лимфома, связанная со СПИДом, макроглобулинемия Вальденстрема, злокачественный гистиоцитоз, множественная миелома, саркома тучных клеток, иммунопролиферативное заболевание тонкой кишки, лейкоз, лимфоидный лейкоз, лейкоз плазматических клеток, эритролейкоз, клеточный лимфосаркомный лейкоз, миелолейкоз, базофильный лейкоз, эозинофильный лейкоз, моноцитарный лейкоз, лейкоз тучных клеток, мегакариобластный лейкоз, миелоидная саркома, волосатоклеточный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый миелолейкоз (ОМЛ) и хронический миелобластный лейкоз.

[0220] Конкретные варианты осуществления относятся к способам лечения лейкоза. Лейкоз представляет собой злокачественную опухоль крови или костного мозга, и он характеризуется аномальной пролиферацией (продукцией путем умножения) клеток крови, как правило, белых клеток крови (лейкоцитов). Это часть обширной группы заболеваний, называемых гематологические неоплазии. Лейкоз представляет собой широкий термин, охватывающий спектр заболеваний. Лейкоз клинически и патологически делится на острую и хроническую формы.

[0221] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения иммунные клетки доставляют нуждающемуся в этом индивидууму, такому как индивидууму,

имеющему злокачественную опухоль или инфекцию. Клетки затем усиливают иммунную систему человека, чтобы атаковать соответствующую злокачественную опухоль или патогенные клетки. В некоторых случаях человеку дают одну или более доз иммунных клеток. В случаях, когда индивидууму вводят две или более доз иммунных клеток, продолжительность между введениями должна быть достаточной, чтобы дать время для распространения у индивидуума, и в конкретных вариантах осуществления продолжительность между дозами составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и более суток.

[0222] В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются способы лечения или профилактики иммуно-опосредованного нарушения. В одном из вариантов осуществления у индивидуума есть аутоиммунное заболевание. Неограничивающие примеры аутоиммунных заболеваний включают очаговую алопецию, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную болезнь Аддисона, аутоиммунные заболевания надпочечника, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный оофорит и орхит, аутоиммунную тромбоцитопению, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, celiac sprate-дерматит, синдром хронической усталости и иммунной дисфункции (CFIDS), хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия, синдром Черджа-Строса, рубцовый пемфигоид, синдром CREST, синдром холодовой агглютинации, болезнь Крона, дискоидная волчанка, эссенциальная смешанная криоглобулинемия, фибромиалгия-фибромиозит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, идиопатический легочный фиброз, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП), нейропатия, вызванная IgA, юношеский артрит, красный плоский лишай, красная волчанка, болезнь Меньера, смешанное заболевание соединительной ткани, рассеянный склероз, иммуноопосредованный сахарный диабет или диабет типа 1, миастения гравис, нефротический синдром (например, заболевание с минимальным изменением, фокальный гломерулосклероз или оболочечная нефропатия), обыкновенная пузырчатка, пернициозная анемия, узелковый периартериит, полихондрия, полигландулярные синдромы, ревматическая полимиалгия, полимиозит и дерматомиозит, первичная агаммаглобулинемия, первичный билиарный цирроз, псориаз, псориатический артрит, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермия, синдром Шегрена, синдром мышечной скованности, системная красная волчанка, красная волчанка, язвенный колит, увеит, васкулиты (такие как узелковый периартериит, синдром Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит или васкулит при герпетиформном дерматите), витилиго, и гранулематоз Вегенера. Таким образом, некоторые примеры аутоиммунного заболевания, которое можно лечить с помощью способов, описываемых в настоящем изобретении, в качестве неограничивающих примеров включают рассеянный склероз, ревматоидный артрит, системную красную волчанку, сахарный диабет типа I, болезнь Крона; язвенный колит, миастению гравис, гломерулонефрит, анкилозирующий спондилит, васкулит или псориаз. У индивидуума также может быть аллергическое нарушение, такое как астма.

[0223] В еще одном варианте осуществления индивидуум является реципиентом трансплантированного органа или стволовых клеток, и иммунные клетки применяют для предотвращения и/или лечения отторжения. В конкретных вариантах осуществления у индивидуума развивается реакция или существует риск развития реакции «трансплантат против хозяина». РТПХ представляет собой возможное осложнение любого трансплантата, который использует или содержит стволовые клетки от родственного или неродственного донора. Существует два вида РТПХ: острая и хроническая. Острая РТПХ появляется в первые три месяца после трансплантации. Признаки острой РТПХ включают красноватую кожную сыпь на руках и ногах, которая может распространяться и становиться более серьезной, с шелушением или образованием пузырей на коже. Острая РТПХ может также затронуть желудок и кишечник, в этом случае присутствуют спазмы, тошнота и диарея. Пожелтение кожи и глаз (желтуха) указывает на то, что острая РТПХ затронула печень. Хроническая РТПХ классифицируется в зависимости от степени тяжести: стадия/степень 1 - легкая; стадия/степень 4 - тяжелая. Хроническая РТПХ развивается через три месяца или позже после трансплантации. Симптомы хронической РТПХ похожи на симптомы острой РТПХ, но, кроме того, хроническая РТПХ может также поражать слизистые железы глаз, слюнные железы во рту и железы, которые смазывают слизистую оболочку желудка и кишечника. Можно использовать любую из популяций иммунных клеток, описываемых в настоящем документе. Примеры трансплантированного органа включают трансплантат твердого органа, такого как почка, печень, кожа, поджелудочная железа, легкое и/или сердце, или клеточный трансплантат, такой как островки, гепатоциты, миобласты, костный мозг, гематопоэтические или другие стволовые клетки. Трансплантат может быть составным трансплантатом, таким как ткани лица. Иммунные клетки можно вводить до трансплантации, одновременно с трансплантацией или после трансплантации. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки вводят до трансплантации, например, по меньшей мере, за 1 час, по меньшей мере, за 12 часов, по меньшей мере, за 1 сутки, по меньшей мере, за 2 суток, по меньшей мере, за 3 суток, по меньшей мере, за 4 суток, по меньшей мере, за 5 суток, по меньшей мере, за 6 суток, по меньшей мере, за 1 неделю, по меньшей мере, за 2 недели, по меньшей мере, за 3 недели, по меньшей мере, за 4 недели, или, по меньшей мере, за 1 месяц до трансплантации. В одном конкретном неограничивающем примере введение терапевтически эффективного количества иммунных клеток происходит за 3-5 суток до трансплантации.

[0224] В некоторых вариантах осуществления индивидууму можно вводить немиелоаблативную лимфоистошающую химиотерапию перед иммунной клеточной терапией. Немиелоаблативная лимфоистошающая химиотерапия может быть любой подходящей подобной терапией, которую можно вводить любым подходящим путем. Немиелоаблативная лимфоистошающая химиотерапия может включать, например, введение циклофосфида и флударабина, особенно если злокачественная опухоль представляет собой меланому, которая может быть метастатической. Пример пути

введения циклофосфида и флударабина представляет собой внутривенный путь. Аналогично можно вводить любую подходящую дозу циклофосфида и флударабина. В отдельных аспектах, примерно 60 мг/кг циклофосфида вводят в течение двух суток, после чего примерно 25 мг/м<sup>2</sup> флударабина вводят в течение пяти суток.

[0225] В некоторых вариантах осуществления фактор роста, который способствует росту и активации иммунных клеток, вводят индивидууму либо одновременно с иммунными клетками, либо позже к иммунным клеткам. Иммунный фактор роста может быть любым подходящим фактором роста, который способствует росту и активации иммунных клеток. Примеры подходящих факторов роста иммунных клеток включают интерлейкин (IL)-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 и IL-21, которые можно использовать отдельно или в различных комбинациях, таких как IL-2 и IL-7, IL-2 и IL-15, IL-7 и IL-15, IL-2, IL-7 и IL-15, IL-12 и IL-7, IL-12 и IL-15, или IL-12 и IL-2.

[0226] Терапевтически эффективные количества иммунных клеток можно вводить рядом способов, включая парентеральное введение, например, внутривенную, интраперитонеальную, внутримышечную, внутригрудную, внутрисуставную инъекцию или инфузию.

[0227] Терапевтически эффективное количество иммунных клеток для применения в адаптивной клеточной терапии представляет собой такое количество, при котором достигают желаемого эффекта у индивидуума при лечении. Например, это может быть количество иммунных клеток, необходимое для ингибирования развития, или для того, чтобы вызвать регресс аутоиммунного или аллоиммунного заболевания, или которое способно облегчить симптомы, вызванные аутоиммунным заболеванием, такие как боль и воспаление. Это может быть количество, необходимое для снятия симптомов, связанных с воспалением, таких как боль, отек и повышенная температура. Это также может быть количество, необходимое для уменьшения или предотвращения отторжения пересаженного органа.

[0228] Популяцию иммунных клеток можно вводить по схемам лечения в соответствии с заболеванием, например, однократная доза или более доз от одного до нескольких суток для улучшения состояния болезни или периодические дозы в течение длительного времени для подавления прогрессирования заболевания и предотвращения рецидива заболевания. Точная доза, которую следует использовать в составе, также будет зависеть от пути введения, серьезности заболевания или нарушения и должна определяться в соответствии с суждением практикующего врача и обстоятельствами каждого пациента. Терапевтически эффективное количество иммунных клеток будет зависеть от индивидуума, подвергаемого лечению, тяжести и типа заболевания и способа введения. В некоторых вариантах осуществления дозы, которые можно использовать для лечения людей, варьируются, по меньшей мере, от  $3,8 \times 10^4$ , по меньшей мере,  $3,8 \times 10^5$ , по меньшей мере,  $3,8 \times 10^6$ , по меньшей мере,  $3,8 \times 10^7$ , по меньшей мере,  $3,8 \times 10^8$ , по меньшей мере,  $3,8 \times 10^9$ , или по меньшей мере,  $3,8 \times 10^{10}$  иммунных клеток/м<sup>2</sup>. В определенном варианте осуществления доза, используемая при лечении людей, колеблется



приблизительно от  $3,8 \times 10^9$  до приблизительно  $3,8 \times 10^{10}$  иммунных клеток/ $m^2$ . В дополнительных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество иммунных клеток может варьироваться приблизительно от  $5 \times 10^6$  клеток на кг массы тела до приблизительно  $7,5 \times 10^8$  клеток на кг массы тела, например, приблизительно от  $2 \times 10^7$  клеток до приблизительно  $5 \times 10^8$  клеток на кг массы тела, или приблизительно от  $5 \times 10^7$  клеток до приблизительно  $2 \times 10^8$  клеток на кг массы тела. Точное количество иммунных клеток легко определит специалист в данной области на основании возраста, массы, пола и физиологического состояния индивидуума. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых зависимости «доза-эффект», полученных из тест-систем *in vitro* или моделей на животных.

[0229] Иммунные клетки можно вводить в комбинации с одним или более другими терапевтическими средствами для лечения иммуно-опосредованного нарушения. Способы комбинированного лечения могут включать в себя один или более противомикробных агентов (например, антибиотики, противовирусные средства и противогрибковые агенты), противоопухолевые агенты (например, фторурацил, метотрексат, паклитаксел, флударабин, этопозид, доксорубин, или винкристин), иммуно-истощающие агенты (например, флударабин, этопозид, доксорубин или винкристин), иммуносупрессивные средства (например, азатиоприн или глюкокортикоиды, такие как дексаметазон или преднизон), противовоспалительные средства (например, глюкокортикоиды, такие как гидрокортизон, дексаметазон или преднизон, или нестероидные противовоспалительные средства, такие как ацетилсалициловая кислота, ибупрофен или напроксен натрия), цитокины (например, интерлейкин-10 или трансформирующий фактор роста-бета), гормоны (например, эстроген) или вакцины. Кроме того, можно вводить иммуносупрессивные или толерогенные агенты, включая в качестве неограничивающих примеров ингибиторы кальциневрина (например, циклоспорин и такролимус); ингибиторы mTOR (например, рапамицин); микофенолат мофетил, антитела (например, распознающие CD3, CD4, CD40, CD154, CD45, IVIG, или В-клетки); химиотерапевтические средства (например, метотрексат, тресульфат, бусульфат); облучение; или хемокины, интерлейкины или их ингибиторы (например, BAFF, IL-2, anti-IL-2R, IL-4, ингибиторы киназы JAK). Такие дополнительные фармацевтические средства можно вводить до, во время или после введения иммунных клеток, в зависимости от желаемого эффекта. Это введение клеток и агента может происходить одним и тем же путем или разными путями, и либо в том же месте, либо в другом месте.

#### Фармацевтические композиции

[0230] В настоящем документе также предлагаются фармацевтические композиции и составы, содержащие иммунные клетки (например, Т-клетки, В-клетки, или НК-клетки) и фармацевтически приемлемый носитель.

[0231] Фармацевтические композиции и составы, описанные в настоящем документе, можно получить путем смешивания активных ингредиентов (таких как антитело или полипептид), имеющих желаемую степень чистоты, с одним или более

необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 22<sup>nd</sup> edition, 2012) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители в основном, нетоксичны для реципиентов в используемых дозах и концентрациях, и в качестве неограничивающих примеров включают буферы, так как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензил хлорид аммония; гексаметония хлорид; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (менее чем приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин, или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин, или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, так как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; сольобразующие противоионы, такие как натрий; комплексные соединения с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Примеры фармацевтически приемлемых носителей в настоящем документе дополнительно включают средства для диспергирования лекарственных средств в межклеточном пространстве, такие как растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20, такие как rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International). Конкретные примеры sHASEGP и способы использования, включая rHuPH20, описаны в патентных публикациях США №№ 2005/0260186 и 2006/0104968. В одном из аспектов sHASEGP комбинируют с одним или более дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

#### Способы комбинированного лечения

[0232] В определенных вариантах осуществления композиции и способы из настоящих вариантов осуществления включают популяция иммунных клеток в комбинациях, по меньшей мере, с одной дополнительной терапией. Дополнительной терапией может быть лучевая терапия, хирургическое вмешательство (например, лампэктомия и мастэктомия), химиотерапия, генотерапия, ДНК-терапия, вирусная терапия, РНК-терапия, иммунотерапия, трансплантация костного мозга, нанотерапия, терапия моноклональным антителом или их комбинация из указанных выше. Дополнительная терапия может быть в форме адьювантной или неоадьювантной терапии.

[0233] В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой введение низкомолекулярного ферментативного ингибитора или антиметастатического средства. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой введение средств, ограничивающих побочные эффекты (например, агентов, предназначенных для уменьшения возникновения и/или тяжести

побочных эффектов лечения, таких как средства против тошноты и т.д.). В некоторых вариантах осуществления дополнительной терапией является лучевая терапия. В некоторых вариантах осуществления дополнительной терапией является хирургическое вмешательство. В некоторых вариантах осуществления дополнительной терапия представляет собой комбинацию лучевой терапии и хирургического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления дополнительной терапией является гамма-облучение. В некоторых вариантах осуществления дополнительной терапия представляет собой терапию, нацеленную на путь РБК/АКТ/mTOR, ингибитор HSP90, ингибитор тубулина, ингибитор апоптоза и/или химиопрофилактический агент. Дополнительная терапия может быть одним или более химиотерапевтическими средствами, известными в данной области.

[0234] Иммунную клеточную терапию можно вводить до, во время, после или в различных комбинациях, связанных с дополнительной терапией злокачественной опухоли, такой как терапия, связанная с иммунными контрольными точками. Введения могут быть в интервалах в диапазоне от одновременного до минут, до суток, до недель. В вариантах осуществления, где иммунная клеточная терапия предоставляется пациенту отдельно от дополнительного терапевтического средства, можно в основном обеспечить, чтобы не прошел значительный период времени между моментами каждой доставки, таким образом, чтобы два соединения все еще могли оказывать выгодный комбинированный эффект на пациента. В таких случаях предполагают, что можно предоставить пациенту терапию с антителами и терапию против злокачественных опухолей в пределах приблизительно от 12 до 24 или 72 часов друг от друга и, более конкретно, приблизительно в пределах 6-12 часов друг от друга. В некоторых ситуациях может быть желательным значительно продлить период лечения, когда перерыв между соответствующими введениями составляет от нескольких суток (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

[0235] Можно использовать различные комбинации. Для примера ниже, иммунная клеточная терапия обозначена «А», а терапия против злокачественной опухоли - «В»:

A/B/A, B/A/B, B/B/A, A/A/B, A/B/B, B/A/A, A/B/B/B, B/A/B/B, B/B/B/A, B/B/A/B, A/A/B/B, A/B/A/B, A/B/B/A, B/B/A/A, B/A/B/A, B/A/A/B, A/A/A/B, B/A/A/A, A/B/A/A, A/A/B/A.

[0236] При введении любого соединения или терапии по настоящим вариантам осуществления пациент должен следовать общим протоколам введения таких соединений, учитывая токсичность средств, если таковая имеется. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления существует этап мониторинга токсичности, который можно отнести к комбинированному лечению.

#### Химиотерапия

[0237] Широкий спектр химиотерапевтических средств можно использовать в соответствии с настоящими вариантами осуществления. Термин «химиотерапия» относится к использованию лекарственных средств для лечения злокачественной опухоли.

«Химиотерапевтическое средство» применяют для обозначения соединения или композиции, которую вводят для лечения злокачественной опухоли. Эти агенты или лекарственные средства классифицируют по способу их активности в клетке, например, влияют ли они на клеточный цикл и на каком этапе они влияют на клеточный цикл. Альтернативно средство может быть охарактеризовано на основе его способности напрямую перекрестно связывать ДНК, интеркалировать в ДНК или вызывать хромосомные и митотические aberrации, воздействуя на синтез нуклеиновой кислоты.

[0238] Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклосфосамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорид, триэтилентиофосфорид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (особенно криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, КW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, мехлоретамин оксид гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид и урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как антибиотики энедиинового ряда (например, калихимицин, особенно калихимицин гамма I и калихимицин омега I); динемидин, включая динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также хромофор неокарзиностатина и родственные хромопротеины хромофоры антибиотиков энедиинового ряда, аклациномизины, актиномицин, аутарницин, азасерин, блеомицин, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, так как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаларницин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин и зорубицин; антиметаболиты, так как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, птероптерин и триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, и тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан и тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как митотан и трилостан; воспалители

фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; эллиптиний ацетат; эпотилон; этоглуцид; галлий нитрат; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK-полисахаридный комплекс; разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно Т-2 токсин, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ара-С»); циклофосфамид; таксоиды, например, паклитаксел и доцетаксел гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; координационные комплексы платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (ВП-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминокптерин; кселода; ибандронат; иринотекан (например, СРТ-11); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилхилорнитин (ДМФО); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; карбоплатин, прокарбазин, пликомицин, гемцитабиен, навельбин, ингибиторы белка фарнезилтрансферазы, трансплатин, и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных.

#### Лучевая терапия

[0239] Другие факторы, которые вызывают повреждение ДНК и широко используются, включают общеизвестные  $\gamma$ -лучи, рентгеновские лучи и/или направленную доставку радиоактивных изотопов к опухолевым клеткам. Также рассматриваются другие формы повреждающих факторов ДНК, такие как микроволны, облучение протонным пучком и УФ-облучение. Скорее всего, все эти факторы влияют на широкий диапазон повреждений ДНК, предшественников ДНК, репликацию и восстановление ДНК, а также сборку и поддержание хромосомы. Диапазоны доз для рентгеновских лучей варьируются от суточных доз от 50 до 200 рентген за длительный период времени (от 3 до 4 недель), до однократных доз от 2000 до 6000 рентген. Диапазоны доз для радиоактивных изотопов широко варьируются и зависят от полувыведения изотопа, силы и типа испускаемой радиации и поглощения опухолевыми клетками.

#### Иммунотерапия

[0240] Специалистам в данной области понятно, что дополнительную иммунотерапию можно использовать в комбинации или в сочетании со способами вариантов осуществления. В отношении лечения злокачественных опухолей иммунотерапевтические препараты, в основном, полагаются на использование иммунных эффекторных клеток и молекулы для нацеливания и разрушения злокачественных клеток. Ритуксимаб (РИТУКСАН®) представляет собой такой пример. Иммунный эффектор может быть, например, антителом, специфичным для какого-либо маркера на поверхности

опухолевой клетки. Само антитело может служить эффектором терапии или оно может рекрутировать другие клетки, чтобы реально влиять на уничтожение клеток. Антитело также может быть конъюгировано с лекарственным средством или токсином (химиотерапевтическим препаратом, радионуклидом, цепью А рицина, холерным токсином, токсином коклюш и т.д.) и служить в качестве нацеливающего агента. Альтернативно эффектором может быть лимфоцит, несущий поверхностную молекулу, которая напрямую или косвенно взаимодействует с опухолевой клеткой-мишенью. Различные эффекторные клетки включают цитотоксические Т-клетки и NK-клетки.

[0241] Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) содержат моноклональные антитела (MAb), которые ковалентно связаны с лекарственными средствами, убивающими клетку, и которые можно использовать в способах комбинированного лечения. Этот подход сочетает высокую специфичность MA в отношении их антигенных мишеней с высокоэффективными цитотоксическими лекарственными средствами, в результате чего получают «вооруженные» MA, которые доставляют полезную нагрузку (лекарственное средство) к опухолевым клеткам с повышенным уровнем антигена. Адресная доставка лекарственного средства также сводит к минимуму его воздействие на нормальные ткани, в результате чего снижается токсичность и улучшается терапевтический индекс. Примеры лекарственных средств ADC включают ADCETRIS® (брентуксимаб ведотин) и KADCYLA® (трастузумаб эмтанзин или T-DM1)

[0242] В одном из аспектов иммунотерапии опухолевая клетка должна нести какой-то маркер, который поддается нацеливанию, т.е. не присутствует на большинстве других клеток. Существует много опухолевых маркеров, и любой из них может быть подходящим для нацеливания в отношении настоящих вариантов осуществления. Обычные опухолевые маркеры включают CD20, раково-эмбриональный антиген, тирозиназу (p97), gp68, TAG-72, HMFG, сиалированный антиген Льюиса, MucA, MucB, PLAP, рецептор ламинина, erb B и p155. Альтернативный аспект иммунотерапии представляет собой сочетание противоопухолевых эффектов с иммуностимулирующими эффектами. Также существуют иммуностимулирующие молекулы, включая цитокины, такие как IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, гамма-IFN, хемокины, такие как MIP-1, MCP-1, IL-8 и факторы роста, такие как лиганд FLT3.

[0243] Примеры иммунотерапии включают иммунные адьюванты, например, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, динитрохлорбензол и ароматические соединения; цитокиновую терапию, например, интерфероны  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , IL-1, GM-CSF и TNF; генотерапию, например, TNF, IL-1, IL-2, и p53; и моноклональные антитела, например, анти-CD20, анти-ганглиозид GM2 и анти-p185. Предполагается, что один или более препаратов против злокачественной опухоли можно использовать с терапией антителами, описываемыми в настоящем документе.

[0244] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия может представлять собой ингибитор иммунной контрольной точки. Иммунные контрольные точки либо

увеличивают сигнал (например, костимуляторные молекулы), либо уменьшают сигнал. Ингибиторы иммунных контрольных точек, которые могут быть нацелены на блокаду иммунных контрольных точек, включают рецептор аденозина A2A (A2AR), B7-H3 (также известный как CD276), аттенуатор В и Т-лимфоцитов (BTLA), цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4 (CTLA-4, также известный как CD152), индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO), иммуноглобулин клеток-киллеров (KIR), ген-3 активации лимфоцитов (LAG3), белок программированной смерти 1 (PD-1), домен Т-клеточного иммуноглобулина и домен 3 муцина (TIM-3) и V-домен Ig супрессора активации Т-клеток (VISTA). В частности, ингибиторы иммунных контрольных точек нацелены на ось PD-1 и/или CTLA-4.

[0245] Ингибиторы иммунных контрольных точек могут быть лекарственными средствами, такими как низкомолекулярные соединения, рекомбинантные формы лиганда или рецепторов, или, в частности, антителами, такими как антитела человека. Можно использовать известные ингибиторы белков иммунной контрольной точки белки или их аналоги, в частности, химеризованные, гуманизированные или человеческие формы антител. Как известно специалисту, для определенных антител, упомянутых в настоящем изобретении, могут использоваться альтернативные и/или эквивалентные названия. Такие альтернативные и/или эквивалентные названия являются взаимозаменяемыми в отношении настоящего изобретения. Например, известно, что ламбролизумаб также известен под альтернативными и эквивалентными названиями МК-3475 и пембролизумаб.

[0246] В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PD-1 с его партнерами по связыванию с лигандом. В конкретном аспекте партнерами по связыванию с лигандом PD-1 являются PDL1 и/или PDL2. В другом варианте осуществления антагонист связывания PDL1 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PDL1 с его партнерами по связыванию. В конкретном аспекте партнерами по связыванию PDL1 являются PD-1 и/или B7-1. В другом варианте осуществления антагонист связывания PDL2 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PDL2 с его партнерами по связыванию. В конкретном аспекте партнером по связыванию PDL2 является PD-1. Антагонист может быть антителом, его антигенсвязывающим фрагментом, иммуноадгезином, слитым белком или олигопептидом.

[0247] В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1, представляет собой антитело к PD-1 (например, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело). В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба и CT-011. В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1, представляет собой иммуноадгезин (например, иммуноадгезин, содержащий внеклеточную или PD-1-связывающую часть PDL1 или PDL2, слитую с константной областью (например, последовательностью Fc-области иммуноглобулина)). В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой АМФ-224. Ниволумаб,

также известный как MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558 и OPDIVO®, представляет собой антитело к PD-1, которое можно использовать. Пембролизумаб, также известный как MK-3475, Merck 3475, ламбролизумаб, KEYTRUDA® и SCH-900475, представляет собой пример антитела к PD-1. CT-011, также известный как hBAT или hBAT-1, также является антителом к PD-1. АМФ-224, также известный как B7-DCIg, представляет собой PDL2-Fc слитый растворимый рецептор.

[0248] Другой иммунной контрольной точкой, на которую можно воздействовать способами, предусмотренными в настоящем документе, является цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4 (CTLA-4), также известный как CD152. Полная последовательность кДНК человеческого CTLA-4 имеет номер доступа GeneBank L15006. CTLA-4 находится на поверхности Т-клетки и действует как «выключатель» при связывании с CD80 или CD86 на поверхности антигенпрезентирующих клеток. CTLA4 является членом иммуноглобулинового суперсемейства, которое экспрессируется на поверхности Т-хелперных клеток и передает ингибирующий сигнал на Т-клетки. CTLA4 подобен Т-клеточному костимуляторному белку, CD28, и обе молекулы связываются с CD80 и CD86, также называемыми B7-1 и B7-2 соответственно, на антигенпрезентирующих клетках. CTLA4 передает ингибирующий сигнал к Т-клеткам, тогда как CD28 передает стимулирующий сигнал. Внутриклеточный CTLA4 также содержится в регуляторных Т-клетках и может иметь важное значение для их функции. Активация Т-клеток через Т-клеточный рецептор и CD28 приводит к увеличению экспрессии CTLA-4, ингибиторного рецептора для молекул B7.

[0249] В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело к CTLA-4 (например, антитело человека, гуманизованное антитело или химерное антитело), его антигенсвязывающий фрагмент, иммуноадгезин, слитый белок, или олигопептид.

[0250] Антитела к человеческому CTLA-4 (или домены VH и/или VL, полученные на его основе), подходящие для использования в настоящих способах, можно получать с использованием способов, хорошо известных в данной области. Альтернативно, можно использовать общепринятые антитела к CTLA-4. Примером антитела к CTLA-4 является ипилимумаб (также известный как 10D1, MDX-010, MDX-101 и Yervoy®) или его антигенсвязывающие фрагменты и варианты. В других вариантах осуществления антитело содержит CDR или VR тяжелой и легкой цепи ипилимумаба. Таким образом, в одном из вариантов осуществления антитело содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 области VH ипилимумаба и домены CDR1, CDR2 и CDR3 области VL ипилимумаба. В другом варианте осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на CTLA-4, что и вышеупомянутые антитела. В другом варианте осуществления антитело имеет, по меньшей мере, приблизительно 90% идентичности аминокислотных последовательностей с указанными выше антителами (например, по меньшей мере, примерно 90%, 95%, или 99% идентичности вариабельной области с ипилимумабом).



### Хирургическое вмешательство

[0251] Приблизительно 60% людей с злокачественной опухолью будут подвергаться хирургическому вмешательству какого-либо типа, которое включает профилактическую, диагностическую или стадийную, лечебную и паллиативную хирургию. Лечебная хирургия включает резекцию, при которой вся или часть раковой ткани физически удаляется, иссекается и/или уничтожается, и такая хирургия может использоваться в сочетании с другими терапиями, такими как лечение по настоящим вариантам осуществления, химиотерапия, лучевая терапия, гормональная терапия, генотерапия, иммунотерапия и/или альтернативные методы лечения. Резекция опухоли относится к физическому удалению, по меньшей мере, части опухоли. В дополнение к резекции опухоли хирургическое лечение включает лазерную хирургию, криохиргию, электрохиргию и хирургию под контролем микроскопа (хиргию Мооса).

[0252] После удаления части или всех злокачественных клеток, ткани или опухоли в организме может образоваться полость. Лечение может осуществляться перфузией, прямой инъекцией или местным нанесением на пораженный участок дополнительной терапии против злокачественной опухоли. Такое лечение можно повторять, например, каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, или 7 суток, или каждые 1, 2, 3, 4, и 5 недель или каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. Эти способы лечения также могут иметь различные дозировки.

### Другие средства

[0253] Предполагается, что другие средства можно использовать в комбинации с определенными аспектами настоящих вариантов осуществления для повышения терапевтической эффективности лечения. Эти дополнительные средства включают агенты, которые влияют на положительную регуляцию клеточных рецепторов и щелевые контакты, цитостатические средства и агенты для дифференцировки, ингибиторы клеточной адгезии, агенты, повышающие чувствительность гиперпролиферативных клеток к индукторам апоптоза, или другие биологические средства. Увеличение межклеточной передачи сигналов за счет увеличения количества щелевых контактов может усилить анти-гиперпролиферативные эффекты на соседнюю популяцию гиперпролиферативных клеток. В других вариантах осуществления цитостатики или агенты для дифференцировки можно использовать в комбинации с определенными аспектами настоящих вариантов осуществления для повышения анти-гиперпролиферативной эффективности лечения. Ингибиторы клеточной адгезии предназначены для повышения эффективности настоящих вариантов осуществления. Примеры ингибиторов клеточной адгезии представляют собой ингибиторы киназы фокальной адгезии (ФАК) и Ловастатин. Дополнительно предполагается, что другие агенты, которые повышают чувствительность гиперпролиферативной клетки к апоптозу, такие как антитело c225, могут быть использованы в комбинации с определенными аспектами настоящих вариантов осуществления для повышения эффективности лечения.

### Промышленные изделия или наборы

[0254] В настоящем документе также предлагается промышленное изделие или набор, содержащие иммунные клетки. Промышленное изделие или набор могут дополнительно содержать вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по использованию иммунных клеток для лечения или задержки прогрессирования злокачественной опухоли у индивидуума или для усиления иммунной функции у индивидуума, имеющего злокачественную опухоль. Любые из антигенспецифических иммунных клеток, описываемых в настоящем документе, могут быть включены в промышленное изделие или наборы. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, пакеты и шприцы. Контейнер может быть сформирован из ряда материалов, таких как стекло, пластик (например, поливинилхлорид или полиолефин) или металлический сплав (например, нержавеющая сталь или сплав «хастеллой»). В некоторых вариантах осуществления контейнер содержит состав, и этикетка на контейнере или связанная с ним может указывать на инструкцию для применения. Промышленное изделие или набор может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыш в упаковку с инструкциями по использованию. В некоторых вариантах осуществления промышленное изделие дополнительно включает один или более других средств (например, химиотерапевтическое средство и противоопухолевое средство). Подходящие контейнеры для одного или более средств включают, например, бутылки, флаконы, пакеты и шприцы.

#### Примеры

[0255] Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Специалисты в данной области должны принять во внимание, что способы, раскрытые в следующих ниже примерах, представляют собой способы, обнаруженные автором изобретения для правильного функционирования практического применения изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как предпочтительные способы для его практического осуществления. Однако специалисты в данной области должны, в свете настоящего изобретения, принять во внимание, что множество изменений может быть внесено в конкретные описанные варианты осуществления, и может быть получен аналогичный или сходный результат без отклонения от сущности и объема изобретения.

#### Пример 1 - Мультиплексное редактирование генов

[0256] Чтобы проверить эффективность одновременного разрушения нескольких генов в иммунных клетках, таких как Т-клетки и NK-клетки, было проведено несколько исследований по тестированию разрушения различных комбинаций генов с использованием CRISPR. В первом исследовании, использовали CRISPR/Cas9 для нарушения экспрессии NKG2A, CD47, TGFBR2 и CISH в NK-клетках. В этом наборе гены NKG2A и CD47 нокаутировали в первом раунде электропорации, а во втором раунде электропорации мишенями были CISH и TGFBR2. Эффективность нокаута была успешно подтверждена с помощью ПЦР и проточной цитометрии для обоих раундов

электропорации (фиг. 1)

[0257] Способ разрушения нескольких генов был подтвержден в дополнительных наборах генов, включающих TIGIT, CD96, CISH, аденозин (фиг. 2) и NKG2A, CD47, TGFBR2 и CISH (фиг. 3). Выявлено, что разрушение нескольких генов приводит к усилению функциональности против опухолевых клеток-мишеней. Проточный цитометрический анализ выработки IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  и CD107 проводили с различными НК-клетками (отредактированными по сравнению с только с Cas9), совместно стимулированными целевыми клеточными линиями в течение 5 часов в присутствии Брефелдина А. После стимуляции клеточными линиями-мишенями усилилась секреция IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  и CD107 (фиг. 3).

[0258] Эта повышенная функциональность подтверждена разрушением NKG2A, CD47, TGFBR2 и CISH в НК-клетках, которые показали повышенную противоопухолевую цитотоксичность (фиг. 4A), как было измерено анализом высвобождения <sup>51</sup>Cr по отношению к клеткам K562. Кроме того, после 30 минут обработки рекомбинантным TGF- $\beta$  (50нг/мл) активность pSMAD измеряли проточной цитометрией (фиг. 4B). Также наблюдали, что НК-клетки теряют экспрессию CD16 и CD62L при стимуляции цитокином или распознавании мишени (фиг.5), а нокаут ADAM17 в НК-клетках предотвращает отторжение CD16 и CD62L (фиг.6) и улучшает ADCC и цитотоксичность по отношению к мишеням K562 (фиг.7).

[0259] Дальнейшие исследования показали, что разрушение SHP1 в НК-клетках приводит к усилению противоопухолевой эффективности (фиг. 9 и 10). НК-клетки культивировали совместно с клетками K562/Raji в соотношении 1:1 в течение 4 часов. После инкубации клетки окрашивали аннексином V и анализировали живые и мертвые клетки. Клетки K562 чувствительны к уничтожению НК-клетками, а клетки Raji устойчивы к уничтожению НК-клетками. Кроме того, разрушение NKG2A в клетках НК-CAR привело к усилению противоопухолевой эффективности против мишеней Raji (фиг. 12).

[0260] Настоящий подход был дополнительно подтвержден дополнительными наборами генов - TIGIT, CD96, CISH, и ADENOSINE, а также NKG2A, CISH, TGFBR2 и ADENOSINE. Функцию НК-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии и наблюдали увеличение TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и CD107a в клетках после стимуляции целевой клеточной линией (фиг. 13-14).

[0261] Таким образом, настоящие способы можно использовать для одновременного нарушения экспрессии нескольких генов в иммунных клетках для увеличения их функциональности.

#### Пример 2 - Способы

[0262] Предварительное образование комплексов sgРНК-Cas9 и электропорация 1 или 2: sgРНК, перекрывающие близкие области, были разработаны и использованы для каждого гена. Реакции с 1 мкг cas9 (PNA Bio) и 500 мкг sgРНК (сумма всех sgРНК) проводили для каждого гена и инкубировали на льду в течение 20 минут. Через 20 минут

250000 НК-клеток ресуспендировали в Т-буфере\* (включен с набором для электропорации Neon от Invitrogen, общий объем, включая комплекс RNP и клетки, должен составлять 14 мкл) и подвергали электропорации при помощи наконечника для электропорации 10 мкл с использованием системы для трансфекции Neon. Условия электропорации: 1600 В, 10 мс и 3 импульса\* для НК-клеток. Клетки затем добавляли в культуральный планшет с АПК (1 НК: 2 АПК), средой SCGM (преимущественно без антибиотиков), 200 МЕ/мл IL2 и оставляли для восстановления в инкубаторе при 37°C.

[0263] Предварительное образование комплексов сРНК и электропорация: дуплекс сРНК и трасРНК смешивали с помощью пипетки и центрифуги. Смесь инкубировали при 95°C в течение 5 минут в термоциклере, а затем давали остыть до комнатной температуры на столе.

[0264] Таблица 3. Дуплекс сРНК и трасРНК.

	Объем	Концентрация		Объем	Концентрация
сРНК #1	2,2 мкл	100 мкМ	сРНК #2	2,2 мкл	100 мкМ
трасРНК	2,2 мкл	100 мкМ	трасРНК	2,2 мкл	100 мкМ
Буфер IDTE	5,6 мкл		Буфер IDTE	5,6 мкл	
общий объем	10 мкл	44 мкМ	общий объем	10 мкл	44 мкМ

Начальная концентрация сРНК и трасРНК составляет 100 мкМ. Конечная концентрация после смешивания их в эквимольной концентрации составляет 44 мкМ.

[0265] Таблица 4. Нуклеаза Cas9.

	Объем
Alt-R S.p. Cas9 Нуклеаза 3NLS (61 мкМ)	3 мкл
Т-буфер	7 мкл
общий объем	10 мкл
конечная концентрация	18 мкМ

[0266] Таблица 5. Комбинация сРНК:трасРНК и микса нуклеазы Cas9.

	Объем
Дуплекс сРНК #1:трасРНК (Этап 1)	2 мкл
Cas9 (Этап 2)	2 мкл
общий объем	4 мкл

[0267] Дуплекс сРНК: трасРНК объединяли со смесью нуклеазы Cas9 пипеткой и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем смесь объединяли с сРНК.

[0268] Таблица 6. сРНК #1 и сРНК #2.

	Объем
сРНК #1+трасРНК+cas9 (Этап 3)	2,25 мкл

срРНК #2+tracrPРНК+cas9 (Этап 3)	2,25 мкл
общий объем	4,5 мкл

[0269] Электропорацию проводили, сначала подготавливая культуральные планшеты с АПК (1 НК: 2 АРС), средой SCGM (предпочтительно без антибиотика), и 200 МЕ/мл IL-2. Приготовьте 250000 клеток на лунку, ресуспендированные в 7,5 мкл Т-буфера непосредственно перед использованием. Условия электропорации были 1600В, 10мс, и 3 импульса\*. Клетки затем добавляли в культуральный планшет и давали возможность восстановиться в инкубаторе при 37°C.

[0270] Нарращивание НК-клеток: Выделите НК клетки из пуповинной крови или периферической крови, используя набор для выделения НК-клеток от Miltenyi (130-092-657). Поместите НК-клетки с питающей клеткой в соотношении 1:2 (1 НК-клетка и 2-питающих клетки) в присутствии IL-2 (200 МЕ/мл) в среду SCGM. Смена среды через сутки с ИЛ-2. На сутки 4 повторно выделите НК-клетки, используя набор для выделения НК-клеток, чтобы удалить питающие клетки, или подождите до суток 7, пока не исчезнут все питающие клетки. Трансдуцируйте химерным антигенным рецептором или проведите электропорацию для Crispr-Cas9.

[0271] Все способы, раскрытые и заявленные в настоящем документе, могут быть сделаны и выполнены без излишнего экспериментирования в свете настоящего изобретения. Хотя композиции и способы по настоящему изобретению были описаны в отношении предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области очевидно, что варианты могут быть применимы к способам и к этапам или к последовательности этапов в способе, описываемом в настоящем документе, без отступления от концепции, сущности и объема изобретения. Более конкретно, очевидно, что определенные агенты, которые являются химически и физиологически связанными, могут заменить агенты, описываемые в настоящем документе, при этом будут достигнуты те же или аналогичные результаты. Все такие аналогичные замены и модификации, очевидные специалистам в данной области, считаются соответствующими сущности, объему и концепции изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

#### ССЫЛКИ

Нижеследующие ссылки постольку, поскольку они предоставляют примеры способов или других подробностей, дополняющих те, которые изложены в настоящем документе, специально включены в настоящий документ в качестве ссылок.

Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.

Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994.

Bennekov et al., *Mt. Sinai J. Med.* 71 (2): 86-93, 2004.

Bukowski et al., *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.

Camacho et al. *J Clin Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206), 2004.

Campbell, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 298: 23-57, 2006.

- Chothia et al., *EMBO J.* 7:3745, 1988.
- Christodoulides et al., *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.
- Cohen et al. *J Immunol.* 175:5799-5808, 2005.
- Davidson et al., *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.
- Davila et al. *PLoS ONE* 8(4): e61338, 2013.
- Doulatov et al., *Cell Stem Cell.* 10:120-36, 2012.
- Европейская патентная заявка EP2537416
- Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215), 2013.
- Frolet et al., *BMC Microbiol.* 10:190 (2010).
- Gaj et al., *Trends in Biotechnology* 31(7), 397-405, 2013.
- Hanibuchi et al., *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.
- Heemskerk et al. *Hum Gene Ther.* 19:496-510, 2008.
- Hellstrand et al., *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.
- Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.
- Hubert et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 14523-28, 1999.
- Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.
- Hurwitz et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071, 1998.
- Международная патентная публикация No. WO 00/37504
- Международная патентная публикация No. WO 01/14424
- Международная патентная публикация No. WO 2007/069666
- Международная патентная публикация No. WO 2007/069666
- Международная патентная публикация No. WO 98/42752
- Международная патентная публикация No. WO/2014055668
- Международная патентная публикация No. WO1995001994
- Международная патентная публикация No. WO1998042752
- Международная патентная публикация No. WO2000037504
- Международная патентная публикация No. WO200014257
- Международная патентная публикация No. WO2001014424
- Международная патентная публикация No. WO2006/121168
- Международная патентная публикация No. WO2007/103009
- Международная патентная публикация No. WO2009/101611
- Международная патентная публикация No. WO2009/114335
- Международная патентная публикация No. WO2010/027827
- Международная патентная публикация No. WO2011/066342
- Международная патентная публикация No. WO2012/129514
- Международная патентная публикация No. WO2013/071154
- Международная патентная публикация No. WO2013/123061
- Международная патентная публикация No. WO2013/166321
- Международная патентная публикация No. WO2013126726
- Международная патентная публикация No. WO2014/055668

- Международная патентная публикация No. WO2014031687  
Международная патентная публикация No. WO2015016718  
Международная патентная публикация No. WO99/40188  
Janeway et al, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3<sup>rd</sup> Ed.,  
Current Biology Publications, p. 433, 1997.  
Johnson et al. Blood 114:535-46, 2009.  
Jores et al., PNAS U.S.A. 87:9138, 1990.  
Kim et al., Nature Biotechnology 31, 251-258, 2013.  
Kirchmaier and Sugden, J. Virol., 72(6):4657-4666, 1998.  
Leal, M., Ann N Y Acad Sci 1321, 41-54, 2014.  
Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003.  
Li et al. Nat Biotechnol. 23:349-354, 2005.  
Li et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279, 1992.  
Linnemann, C. et al. Nat Med 21, 81-85, 2015.  
Lockey et al., Front. Biosci. 13:5916-27, 2008.  
Loewendorf et al., J. Intern. Med. 267(5):483-501, 2010.  
Ludwig et al. Nature Biotech., (2):185-187, 2006a.  
Ludwig et al. Nature Methods, 3(8):637-646, 2006b.  
Marschall et al., Future Microbiol. 4:731-42, 2009.  
Mokyr et al. Cancer Res 58:5301-5304, 1998.  
Notta et al., Science, 218-221, 2011.  
Pardoll, Nat Rev Cancer, 12(4): 252-64, 2012  
Parkhurst et al. Clin Cancer Res. 15: 169-180, 2009.  
Qin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(24):14411-14416, 1998.  
Rieder et al., J. Interferon Cytokine Res. (9):499-509, 2009.  
Rykman, et al., J. Virol. 80(2):710-22, 2006.  
Sadelain et al., Cancer Discov. 3(4): 388-398, 2013.  
Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor  
Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001.  
Shah et al., PLoS One, 8:e776781, 2013.  
Singh et al., Cancer Research, 68:2961-2971, 2008.  
Singh et al., Cancer Research, 71:3516-3527, 2011.  
Takahashi et al., Cell, 126(4):663-76, 2007.  
Terakura et al. Blood. 1:72- 82, 2012.  
Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 24(5): 633-39, 2012.  
патент США № 4870287  
патент США № 5739169  
патент США № 5760395  
патент США № 5801005  
патент США № 5824311

патент США № 5830880  
патент США № 5844905  
патент США № 5846945  
патент США № 5885796  
патент США № 5994136  
патент США № 6013516  
патент США № 6103470  
патент США № 6207156  
патент США № 6225042  
патент США № 6355479  
патент США № 6362001  
патент США № 6410319  
патент США № 6416998  
патент США № 6544518  
патент США № 6790662  
патент США № 7109304  
патент США № 7442548  
патент США № 7446190  
патент США № 7598364  
патент США № 7989425  
патент США № 8008449  
патент США № 8017114  
патент США № 8058065  
патент США № 8071369  
патент США № 8119129  
патент США № 8129187  
патент США № 8183038  
патент США № 8268620  
патент США № 8329867  
патент США № 8354509  
патент США № 8546140  
патент США № 8691574  
патент США № 8735553  
патент США № 8741648  
патент США № 8900871  
патент США № 9175268  
патентная публикация США № 2010/0210014  
патентная публикация США № 12/478154  
патентная публикация США № 2002131960  
патентная публикация США № 2003/0211603



патентная публикация США № 2005/0260186  
патентная публикация США № 2006/0104968  
патентная публикация США № 2009/0004142  
патентная публикация США № 2009/0017000  
патентная публикация США № 2009/0246875  
патентная публикация США № 2011/0104125  
патентная публикация США № 2011/0301073  
патентная публикация США № 20110008369  
патентная публикация США № 2012/0276636  
патентная публикация США № 2013/0315884  
патентная публикация США № 20130149337  
патентная публикация США № 2013287748  
патентная публикация США № 2014/0120622  
патентная публикация США № 2014022021  
патентная публикация США № 20140294898  
Varela-Rohena et al. *Nat Med.* 14: 1390-1395, 2008.  
Wang et al. *J Immunother.* 35(9):689-701, 2012.  
Wu et al., *Adv. Cancer Res.*, 90: 127-56, 2003.  
Wu et al., *Cancer*, 18(2): 160-75, 2012.  
Yamanaka et al., *Cell*, 131(5):861-72, 2007.  
Yu et al., *Science*, 318:1917-1920, 2007.  
Zysk et al., *Infect. Immun.* 68(6):3740-43, 2000.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ *in vitro* для разрушения, по меньшей мере, двух генов в иммунной клетке, где, по меньшей мере, два гена выбраны из группы, состоящей из NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5 и CD7.

2. Способ по п. 1, где разрушение включает введение направляющей РНК (гРНК) для каждого гена в указанную иммунную клетку.

3. Способ по п. 1 или 2, где, по меньшей мере, два гена выбраны из группы, состоящей из (a) NKG2A и CISH, (b) NKG2A и TGFBR2, (c) CISH и TGFBR2, (d) TIGIT и FOXO1, (e) TIGIT и TGFBR2, (f) CD96 и FOXO1, (g) CD96 и TGFBR2, (h) FOXO1 и TGFBR2, (i) CD96 и TIGIT, (j) CISH и TIGIT, (k) TIM3 и CISH, (l) TIM3 и TGFBR2, (m) FOXO1 и TGFBR2, (n) TIM3 и TIGIT, (o) SIGLEC7 и CISH, (p) SIGLEC7 и TGFBR2, (q) CD47 и CISH, (r) CD47 и TGFBR2, (s) SIRPA и CISH, (t) SIRPA и TGFBR2, (u) CD47 и TIGIT, (v) CD47 и SIRPA, (w) A2AR и CISH, (x) A2AR и TGFBR2, (y) ADAM17 и CISH, (z) TGFBR2 и ADAM17, (a1) A2AR и TIGIT, (b1) SHP1 и CISH, (c1) CISH и TGFBR2, (d1) SHP1 и TGFBR2, (e1) SHP1 и TIGIT, и (f1) SHP1 и TIM3.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где, по меньшей мере, 3 гена разрушены.

5. Способ по п. 4, где, по меньшей мере, 3 гена выбраны из группы, состоящей из (1) NKG2A, CISH и TGFBR2, (2) TIGIT, FOXO1 и TGFBR2, (3) TGFBR2, CD96 и TIGIT, (4) TGFBR2, CISH и TIGIT, (5) TIM3, CISH и TGFBR2, (6) CD96, FOXO1 и TGFBR2, (7) TGFBR2, TIM3 и TIGIT, (8) SIGLEC7, CISH и TGFBR2, (9) CD47, CISH и TGFBR2, (10) SIRPA, CISH и TGFBR2, (11) TGFBR2, CD47 и TIGIT, (12) TGFBR2, CD47 и SIRPA, (13) A2AR, CISH и TGFBR2, (14) TGFBR2, CISH и ADAM17, (15) TGFBR2, TIM3 и TIGIT, (16) TGFBR2, A2AR и TIGIT, (17) SHP1, CISH и TGFBR2, (18) TGFBR2, CISH и SHP1, (19) TGFBR2, SHP1 и TIGIT, и (20) TGFBR2, SHP1 и TIM3.

6. Способ по п. 2, дополнительно включающий введение РНК-направляемой эндонуклеазы.

7. Способ по п. 6, где РНК-направляемая эндонуклеаза представляет собой Cas9.

8. Способ по п. 6, где введение РНК-направляемой эндонуклеазы включает введение нуклеиновой кислоты, кодирующей РНК-направляемую эндонуклеазу в иммунную клетку.

9. Способ по п. 8, где нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где три, четыре, пять, или шесть генов разрушены.

11. Способ по п. 10, где гены содержат две из подгрупп (a)-(j1).

12. Способ по п. 10, где гены содержат одну подгруппу из (a)-(j1) и одну подгруппу из 1-23.

13. Способ по п. 10, где гены содержат две подгруппы из 1-23.

14. Способ по п. 1, где разрушение является одновременным.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, НК-Т-клетку, В-клетку, или стволовую клетку.
16. Способ по п. 15, где иммунная клетка сконструирована для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) и/или Т-клеточного рецептора (TCR).
17. Способ по п. 15, где иммунная клетка сконструирована для экспрессии CAR.
18. Способ по п. 15, где иммунная клетка сконструирована для экспрессии TCR.
19. Способ по п. 15, где иммунная клетка сконструирована для экспрессии CAR и TCR.
20. Способ по п. 15, где иммунная клетка является вирус-специфической.
21. Способ по п. 15, где Т-клетка является вирус-специфической Т-клеткой.
22. Способ по п. 15, где Т-клетка является регуляторной Т-клеткой.
23. Способ по п. 15, где В-клетка является регуляторной В-клеткой.
24. Способ по п. 15, где стволовая клетка представляет собой мезенхимальную стволовую клетку (MSC) или индуцированную плюрипотентную стволовую (iPS) клетку.
25. Способ по п. 15, где Т-клетка представляет собой CD8<sup>+</sup> Т-клетку, CD4<sup>+</sup> Т-клетку, гамма-дельта Т-клетку, или их смесь.
26. Способ по любому из пп. 1-25, где иммунную клетку выделяют из периферической крови, пуповинной крови, костного мозга или их смеси.
27. Способ по любому из пп. 1-26, где иммунную клетку выделяют из пуповинной крови.
28. Способ по п. 27, где пуповинная кровь объединена из двух или более индивидуальных единиц пуповинной крови.
29. Способ по любому из пп. 2-28, где введение включает трансфекцию или трансдукцию.
30. Способ по любому из пп. 2-28, где введение включает электропорацию.
31. Способ по п. 30, где электропорацию проводят больше одного раза.
32. Способ по п. 31, где проводят два раунда электропорации.
33. Способ по п. 32, где первую группу CRISPR гРНК вводят во время первой электропорации и вторую группу CRISPR гРНК вводят во втором раунде электропорации.
34. Способ по п. 33, где первая группа и/или вторая группа CRISPR гРНК включает одну, две, три, или четыре CRISPR гРНК.
35. Способ по п. 32, где две CRISPR гРНК вводят во время первой электропорации и две CRISPR гРНК вводят во втором раунде электропорации.
36. Способ по любому из пп. 1-35, где способ включает разрушение NKG2A, CD47, TGFβR2 и CISH.
37. Способ по любому из пп. 1-35, где способ включает разрушение NKG2A, CISH, TGFβR2 и ADORA2.
38. Способ по любому из пп. 1-35, где способ включает разрушение NKG2A, TGFβR2 и CISH.
39. Способ по любому из пп. 1-35, где способ включает разрушение TIGIT, CD96,

CISH и ADORA2.

40. Способ по любому из пп. 1-35, где способ включает разрушение ADAM17, TGFβR2, NKG2A и SHP1.

41. Способ по любому из пп. 1-40, где разрушение приводит к улучшенной противоопухолевой цитотоксичности, пролиферации *in vivo*, персистенции *in vivo* и/или улучшенной функции иммунной клетки.

42. Способ по п. 41, где иммунная клетка имеет повышенную секрецию IFN-γ, CD107 и/или TNFα.

43. Способ по п. 41, где иммунная клетка имеет повышенную выработку перфорина и/или гранзима В.

44. Способ по любому из пп. 1-43, дополнительно включающий введение CAR или TCR указанной иммунной клетке.

45. Способ по п. 44, где введение включает введение нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный CAR или TCR, в указанную иммунную клетку.

46. Способ по п. 45, где нуклеиновая кислота находится в экспрессирующем векторе.

47. Способ по п. 46, где экспрессирующий вектор представляет собой ретровирусный вектор.

48. Способ по п. 47, где ретровирусный вектор представляет собой аденовирус-ассоциированный вектор.

49. Способ по п. 48, где аденовирус-ассоциированный вектор представляет собой AAV6.

50. Способ по п. 46, где вектор дополнительно содержит последовательность ингибиторного гена.

51. Способ по п. 50, где последовательность ингибиторного гена выбрана из группы, состоящей из NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5 и CD7.

52. Способ по п. 50, где вектор дополнительно содержит направляющую РНК для указанного ингибиторного гена.

53. Способ по п. 52, где CAR фланкирован гомологичными плечами для указанного ингибиторного гена.

54. Способ по п. 53, где введение вектора, содержащего последовательность CAR, приводит к вставке CAR в локус ингибиторного гена в указанной иммунной клетке.

55. Способ по п. 54, где CAR вставляют в экзон указанного ингибиторного гена.

56. Способ по п. 54, где CAR находится под контролем эндогенного промотора ингибиторного гена.

57. Способ по п. 54, где введение вектора дополнительно нарушает экспрессию указанного ингибиторного гена.

58. Иммунная клетка с нарушенной экспрессией, по меньшей мере, двух генов в

иммунной клетке, где, по меньшей мере, два гена выбраны из группы, состоящей из NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5 и CD7.

59. Клетка по п. 58, где клетку получают по любому из пп. 1-57.

60. Клетка по п. 58, где три, четыре, пять, или шесть гены разрушены.

61. Клетка по п. 58, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, НК-Т-клетку, В-клетку или стволовую клетку.

62. Клетка по п. 58, где иммунная клетка сконструирована для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) и/или Т-клеточного рецептора (TCR).

63. Клетка по п. 58, где иммунная клетка сконструирована для экспрессии CAR.

64. Клетка по п. 58, где иммунная клетка сконструирована для экспрессии TCR.

65. Клетка по п. 58, где иммунная клетка сконструирована для экспрессии CAR и TCR.

66. Клетка по п. 58, где иммунная клетка является вирус-специфической.

67. Клетка по п. 61, где Т-клетка является вирус-специфической Т-клеткой.

68. Клетка по п. 61, где Т-клетка является регуляторной Т-клеткой.

69. Клетка по п. 61, где В-клетка является регуляторной В-клеткой.

70. Клетка по п. 61, где стволовая клетка представляет собой мезенхимальную стволовую клетку (MSC) или индуцированную плюрипотентную стволовую (iPS) клетку.

71. Клетка по п. 61, где Т-клетка представляет собой CD8<sup>+</sup> Т-клетку, CD4<sup>+</sup> Т-клетку, гамма-дельта Т-клетку, или их смесь.

72. Клетка по п. 58, где иммунную клетку выделяют из периферической крови, пуповинной крови, костного мозга или их смеси.

73. Клетка по п. 58, где иммунную клетку выделяют из пуповинной крови.

74. Клетка по п. 73, где пуповинная кровь объединена из двух или более индивидуальных единиц пуповинной крови.

75. Клетка по п. 58, где у иммунной клетки разрушены NKG2A, CD47, TGFβR2 и CISH.

76. Клетка по п. 58, где у иммунной клетки разрушены NKG2A, CISH, TGFβR2 и ADORA2.

77. Клетка по п. 58, где у иммунной клетки разрушены NKG2A, TGFβR2 и CISH.

78. Клетка по п. 58, где у иммунной клетки разрушены TIGIT, CD96, CISH и ADORA2.

79. Клетка по п. 58, где у иммунной клетки разрушены ADAM17, TGFβR2, NKG2A и SHP1.

80. Клетка по п. 58, где иммунная клетка имеет улучшенную противоопухолевую цитотоксичность, пролиферацию *in vivo*, персистенцию *in vivo* и/или улучшенную функцию.

81. Клетка по п. 58, где иммунная клетка имеет повышенную секрецию IFN-γ,

CD107 и/или TNF $\alpha$ .

82. Клетка по п. 58, где иммунная клетка имеет повышенную выработку перфорина и/или гранзима В.

83. Клетка по п. 58, где клетка сконструирована для экспрессии CAR и/или TCR.

84. Клетка по п. 83, где CAR вставляют в локус эндогенного ингибиторного гена указанной клетки.

85. Клетка по п. 84, где локус ингибиторного гена выбран из группы, состоящей из NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5 и CD7.

86. Клетка по п. 84, где CAR находится под контролем эндогенного промотора указанного ингибиторного гена.

87. Клетка по п. 84, где CAR вставлен в локус ингибиторного гена путем генетического редактирования, опосредованного CRISPR.

88. Клетка по любому из пп. 83-87, где CAR включает антигенсвязывающий домен, выбранный из группы, состоящей из F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv и scFv.

89. Клетка по любому из пп. 83-88, где CAR нацелен на один или более опухолеассоциированных антигенов, выбранных из группы, состоящей из CD19, CD319 (CS1), ROR1, CD20, раково-эмбрионального антигена, альфафетопротейна, CA-125, MUC-1, антигена эпителиальной опухоли, меланома-ассоциированного антигена, мутированного p53, мутированного gas, HER2/Neu, ERBB2, фолат-связывающего белка, оболочечного гликопротеина gp120 ВИЧ-1, оболочечного гликопротеина gp41 ВИЧ-1, GD2, CD5, CD123, CD23, CD30, CD56, c-Met, мезотелина, GD3, HERV-K, IL-11R альфа, цепи каппа, цепи лямбда, CSPG4, ERBB2, WT-1, TRAIL/DR4, VEGFR2, CD33, CD47, CLL-1, U5snRNP200, CD200, BAFF-R, BCMA и CD99.

90. Клетка по любому из пп. 83-90, где CAR включает, по меньшей мере, один сигнальный домен, выбранный из группы, состоящей из CD3 $\xi$ , CD28, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ , ICOS/CD278, ILRB/CD122, IL-2RG/CD132, DAP12, CD70 и CD40.

91. Клетка по любому из пп. 58-90, где клетка сконструирована для экспрессии гетерологичного цитокина, выбранного из группы, состоящей из IL-7, IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21 и их сочетания.

92. Клетка по п. 83, где клетка дополнительно содержит суицидный ген.

93. Клетка по п. 92, где суицидный ген представляет собой мутантный ген мембраносвязанного фактора некроза опухоли (TNF)-альфа.

94. Экспрессирующий вектор, кодирующий CAR, последовательность ингибиторного гена и гРНК.

95. Вектор по п. 94, где последовательность ингибиторного гена происходит из ингибиторного гена, выбранного из группы, состоящей из NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80,

CD86, IL10R, CD5 и CD7.

96. Вектор по п. 94, где гРНК является специфичной для указанного ингибиторного гена.

97. Вектор по п. 94, где вектор представляет собой ретровирусный вектор.

98. Вектор по п. 94, где ретровирусный вектор представляет собой AAV вектор.

99. Вектор по п. 94, где CAR фланкирован гомологичными плечами для ингибиторного гена.

100. Клетка-хозяин, сконструированная для экспрессии вектора по любому из пп. 94-99.

101. Клетка по п. 100, где клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, В-клетку или стволовую клетку.

102. Клетка по п. 100, где клетка представляет собой клетку по любому из пп. 58-83.

103. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию иммунных клеток по любому из пп. 58-93.

104. Композиция, содержащая популяцию клеток по любому из пп. 58-93 для лечения нарушения, связанного с иммунной системой, инфекционного заболевания или злокачественной опухоли.

105. Способ лечения заболевания или нарушения у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества иммунных клеток по любому из пп. 58-93.

106. Способ по п. 105, где заболевание или нарушение представляет собой инфекционное заболевание, злокачественную опухоль или нарушение, связанное с иммунной системой.

107. Способ по п. 106, где нарушение, связанное с иммунной системой, представляет собой аутоиммунное нарушение, реакцию «трансплантат против хозяина», отторжение аллотрансплантата, или воспалительное состояние.

108. Способ по п. 106, где нарушение, связанное с иммунной системой, представляет собой воспалительное состояние, и иммунные клетки по существу не экспрессируют глюкокортикоидный рецептор.

109. Способ по любому из пп. 105-108, где иммунные клетки являются аутологичными по отношению к индивидууму.

110. Способ по любому из пп. 105-108, где иммунные клетки являются аллогенными по отношению к индивидууму.

111. Способ по п. 106, где нарушение, связанное с иммунной системой, представляет собой злокачественную опухоль.

112. Способ по п. 111, где злокачественная опухоль представляет собой солидную злокачественную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

113. Способ по любому из пп. 105-112, дополнительно включающий введение индивидууму, по меньшей мере, второго терапевтического средства.

114. Способ по п. 113, где, по меньшей мере, второе терапевтическое средство включает химиотерапию, иммунотерапию, хирургическое вмешательство, лучевую терапию или биотерапию.

115. Способ по п. 113 или 114, где иммунные клетки и/или, по меньшей мере, второе терапевтическое средство вводят внутривенно, интраперитонеально, интратрахеально, внутрь опухоли, внутримышечно, эндоскопически, внутрь очага поражения, чрезкожно, подкожно, регионарно или путем прямой инъекции или перфузии.

116. Способ конструирования иммунной клетки для экспрессии CAR, указанный способ, включающий использование CRISPR гРНК для вставки CAR в локус ингибиторного гена указанной иммунной клетки.

117. Способ по п. 116, где CAR кодируется экспрессирующим вектором.

118. Способ по п. 117, где экспрессирующий вектор представляет собой ретровирусный вектор.

119. Способ по п. 118, где ретровирусный вектор представляет собой аденовирус-ассоциированный вектор.

120. Способ по п. 119, где аденовирус-ассоциированный вектор представляет собой AAV6.

121. Способ по п. 117, где вектор дополнительно содержит последовательность ингибиторного гена.

122. Способ по п. 121, где последовательность ингибиторного гена происходит из ингибиторного гена, выбранного из группы, состоящей из NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5 и CD7.

123. Способ по любому из пп. 116-122, где CRISPR гРНК предназначена для указанного ингибиторного гена.

124. Способ по любому из пп. 116-123, где CAR фланкирован гомологичными плечами для ингибиторного гена.

125. Способ по любому из пп. 116-124, где CAR вставляют в экзон указанного ингибиторного гена.

126. Способ по любому из пп. 116-125, где CAR находится под контролем эндогенного промотора ингибиторного гена.

127. Способ по любому из пп. 116-126, где CAR нарушает экспрессию указанного ингибиторного гена.

128. Способ по любому из пп. 116-127, где CAR нацелен на один или более опухолеассоциированных антигенов, выбранных из группы, состоящей из CD19, CD319 (CS1), ROR1, CD20, раково-эмбрионального антигена, альфафетопротеина, CA-125, MUC-1, антигена эпителиальной опухоли, меланома-ассоциированного антигена, мутированного p53, мутированного gas, HER2/Neu, ERBB2, фолат-связывающего белка, оболочечного гликопротеина gp120 ВИЧ-1, оболочечного гликопротеина gp41 ВИЧ-1,



GD2, CD5, CD123, CD23, CD30, CD56, c-Met, мезотелина, GD3, HERV-K, IL-11R альфа, цепи каппа, цепи лямбда, CSPG4, ERBB2, WT-1, TRAIL/DR4, VEGFR2, CD33, CD47, CLL-1, U5snRNP200, CD200, BAFF-R, BCMA и CD99.

129. Способ по любому из пп. 116-128, где CAR включает, по меньшей мере, один сигнальный домен, выбранный из группы, состоящей из CD3 $\xi$ , CD28, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ , ICOS/CD278, ILRB/CD122, IL-2RG/CD132, DAP12, CD70, CD40, и их сочетания.

130. Способ по любому из пп. 116-129, где клетка сконструирована для экспрессии, по меньшей мере, одного гетерологичного цитокина, выбранного из группы, состоящей из IL-7, IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21 и их сочетания.

131. Способ по любому из пп. 116-130, где клетка дополнительно содержит суицидный ген.

132. Способ по п. 131, где суицидный ген представляет собой мутантный ген мембраносвязанного фактора некроза опухоли (TNF)-альфа.

133. Иммунная клетка с CAR, вставленным в ингибиторный ген указанной иммунной клетки.

134. Иммунная клетка по п. 133, где клетка получена способом по любому из пп. 116-132.

135. Композиция, содержащая популяцию иммунных клеток по п. 133 или 134.

136. Композиция по п. 135, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, В-клетку или НК-клетку.

137. Композиция, содержащая популяцию клеток по любому из пп. 133-136 для лечения нарушения, связанного с иммунной системой, инфекционного заболевания или злокачественной опухоли.

138. Способ лечения заболевания или нарушения у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества клеток по любому из пп. 58-93, 100 или 133-134.

139. Способ по п. 138, где заболевание или нарушение представляет собой инфекционное заболевание, злокачественную опухоль или нарушение, связанное с иммунной системой.

140. Способ по п. 139, где нарушение, связанное с иммунной системой, представляет собой аутоиммунное нарушение, реакцию «трансплантат против хозяина», отторжение аллотрансплантата, или воспалительное состояние.

141. Способ по п. 139, где нарушение, связанное с иммунной системой, представляет собой воспалительное состояние, и иммунные клетки по существу не экспрессируют глюкокортикоидный рецептор.

142. Способ по любому из пп. 138-141, где клетки являются аутологичными по отношению к индивидууму.

143. Способ по любому из пп. 138-141, где клетки являются аллогенными.

144. Способ по п. 138, где нарушение, связанное с иммунной системой,

представляет собой злокачественную опухоль.

145. Способ по п. 144, где злокачественная опухоль представляет собой солидную злокачественную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

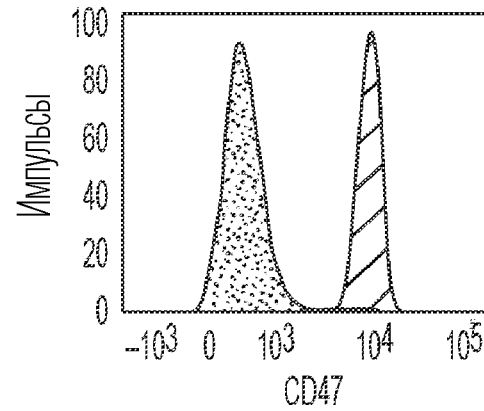
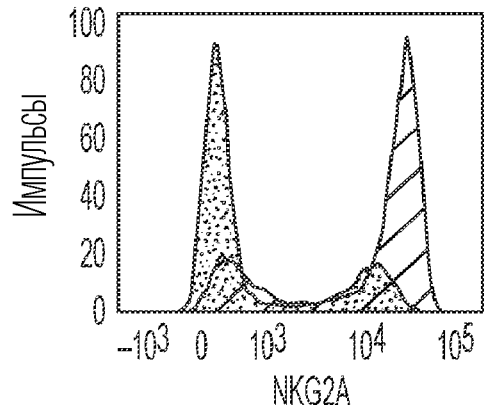
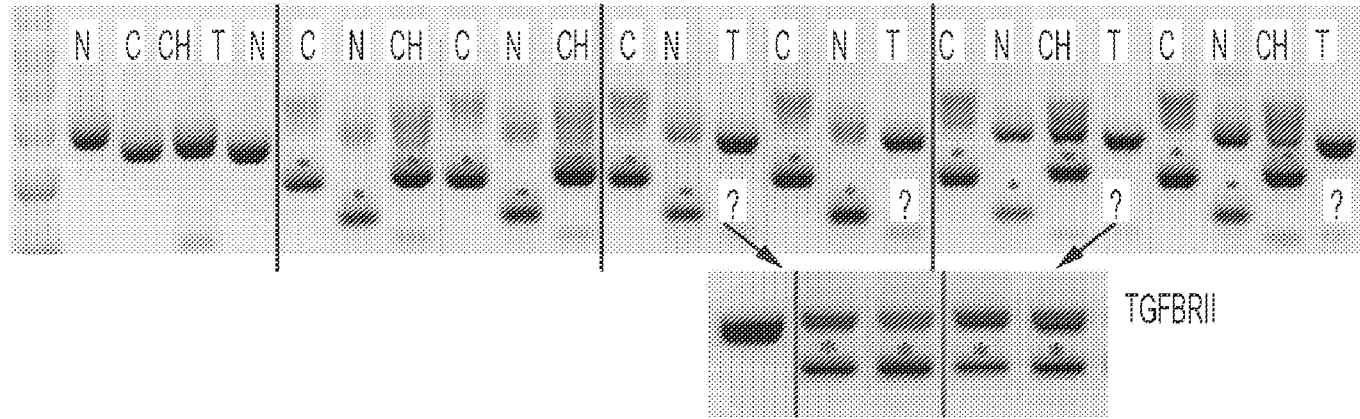
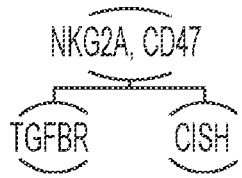
146. Способ по любому из пп. 138-145, дополнительно включающий введение индивидууму, по меньшей мере, второго терапевтического средства.

147. Способ по п. 146, где, по меньшей мере, второй терапевтический средство включает химиотерапию, иммунотерапию, хирургическое вмешательство, лучевую терапию или биотерапию.

148. Способ по п. 146 или 147, , где иммунные клетки и/или, по меньшей мере, второе терапевтическое средство вводят внутривенно, интраперитонеально, интратрахеально, внутрь опухоли, внутримышечно, эндоскопически, внутрь очага поражения, чрезкожно, подкожно, регионарно или путем прямой инъекции или перфузии.

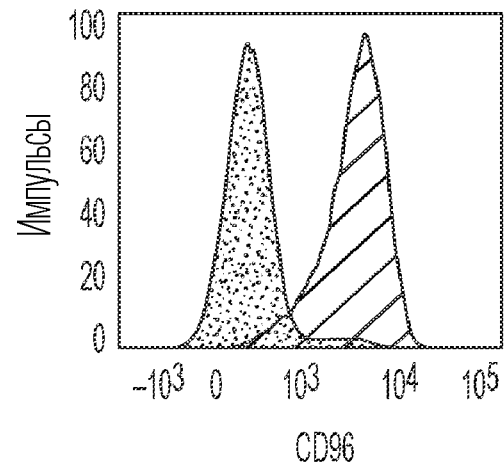
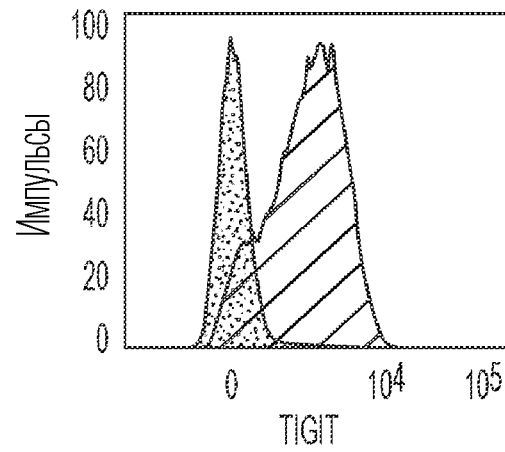
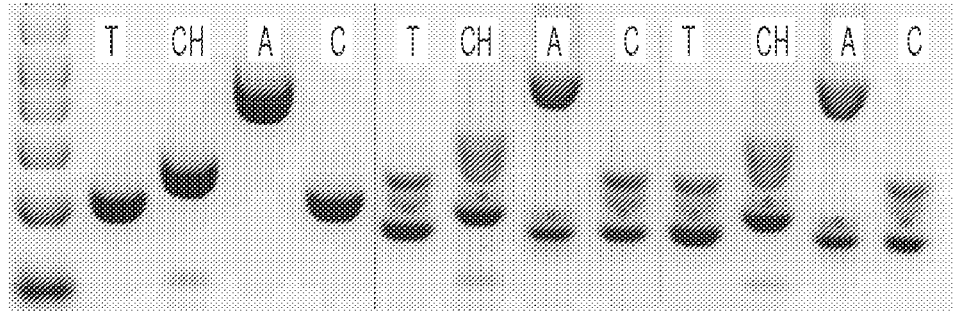
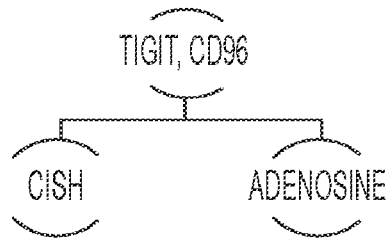
По доверенности

NKG2A(N), CD47 (C), TGFBRII(T), CISH (CH) Мультиплексный нокаут

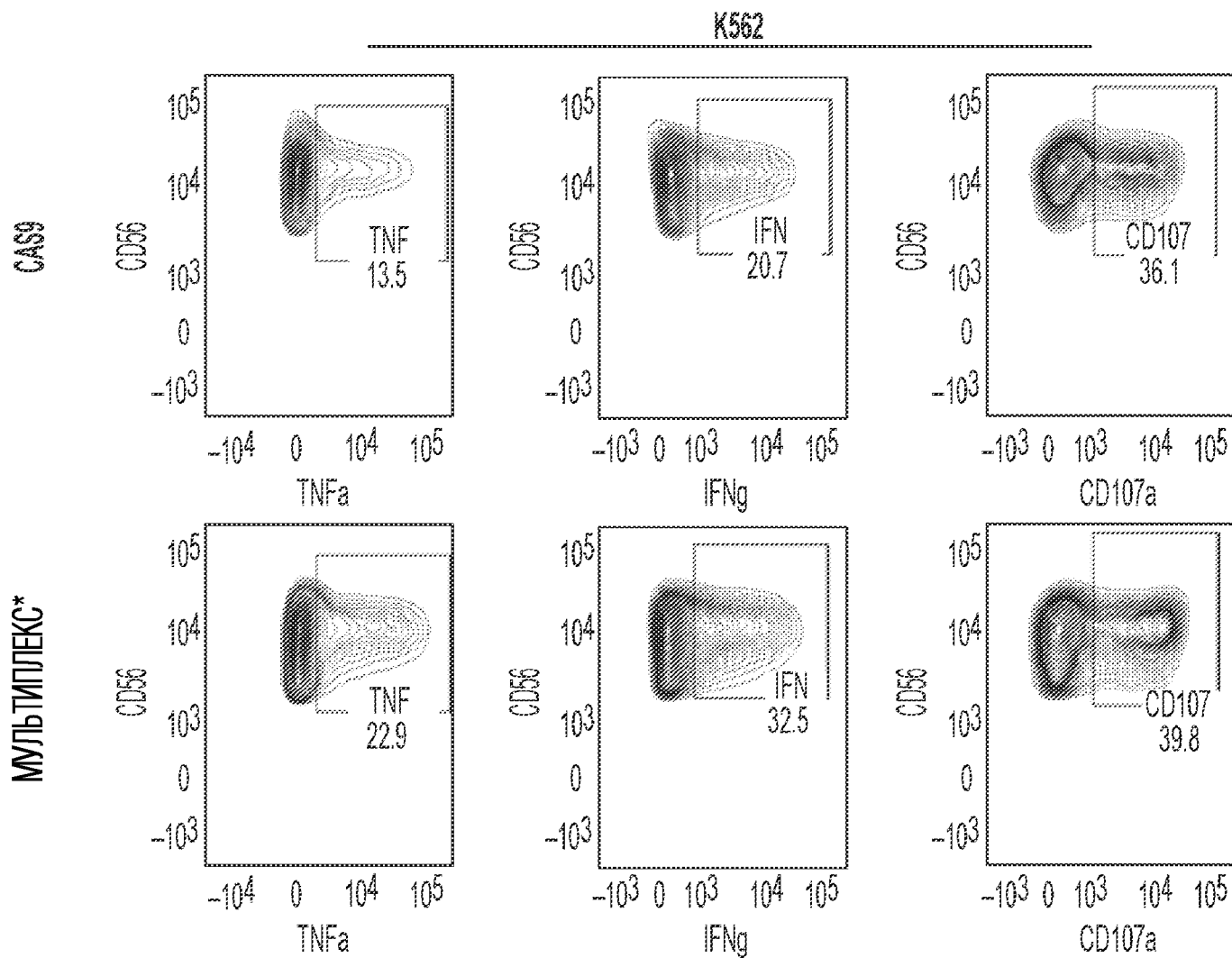


ФИГ. 1

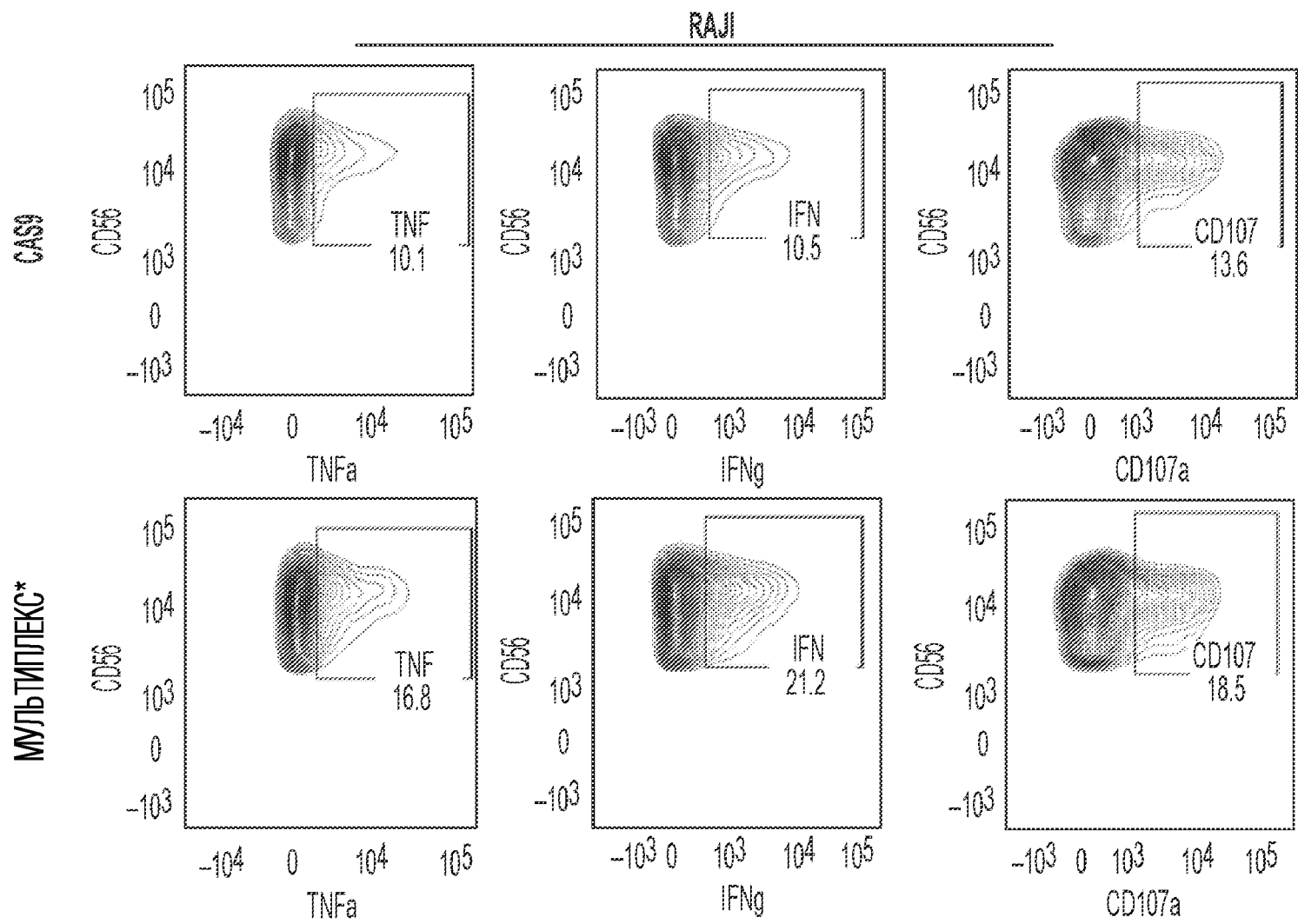
TIGIT (T), CD96 (C), CISH (CH), ADENOSINE (A) Мультиплексный нокаут



ФИГ. 2



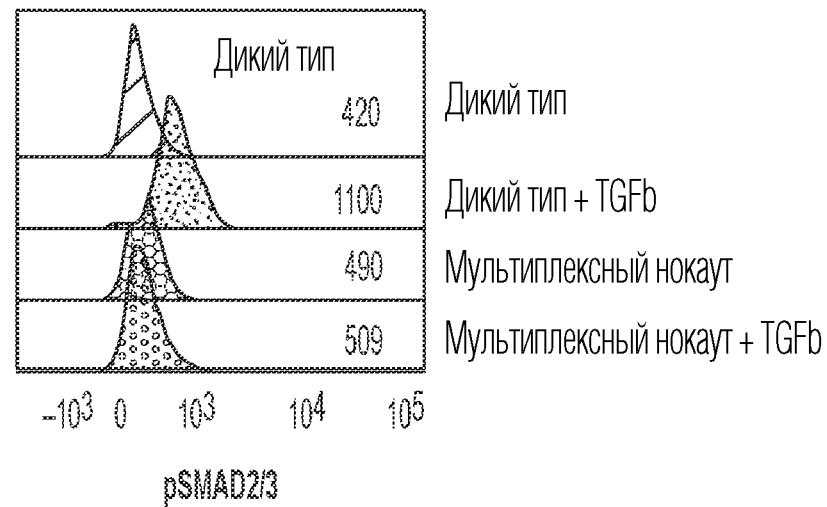
ФИГ. 3



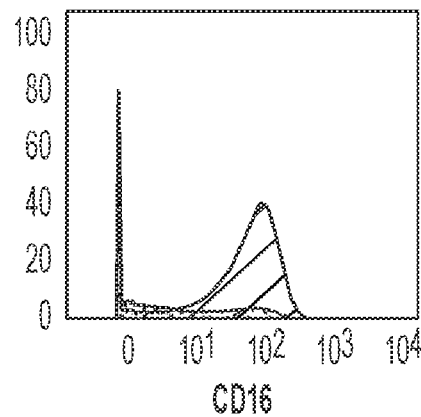
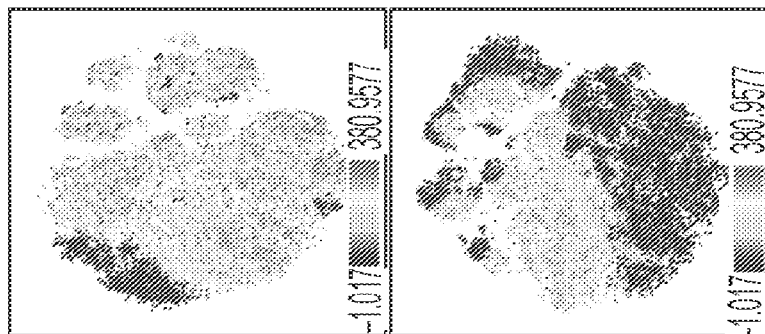
**ФИГ. 3**  
ПРОДОЛЖЕНИЕ



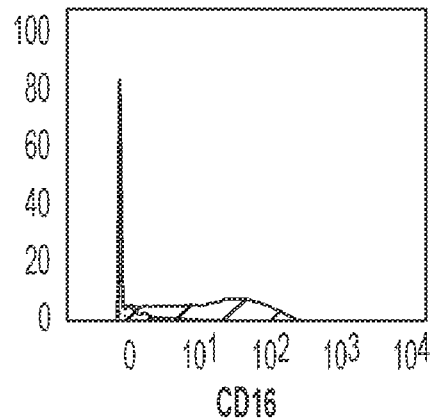
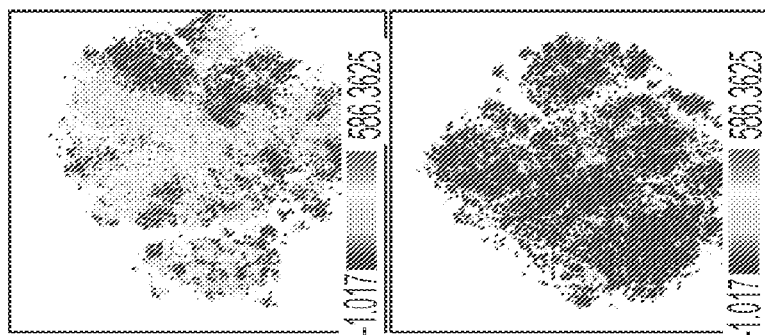
ФИГ. 4А



ФИГ. 4В



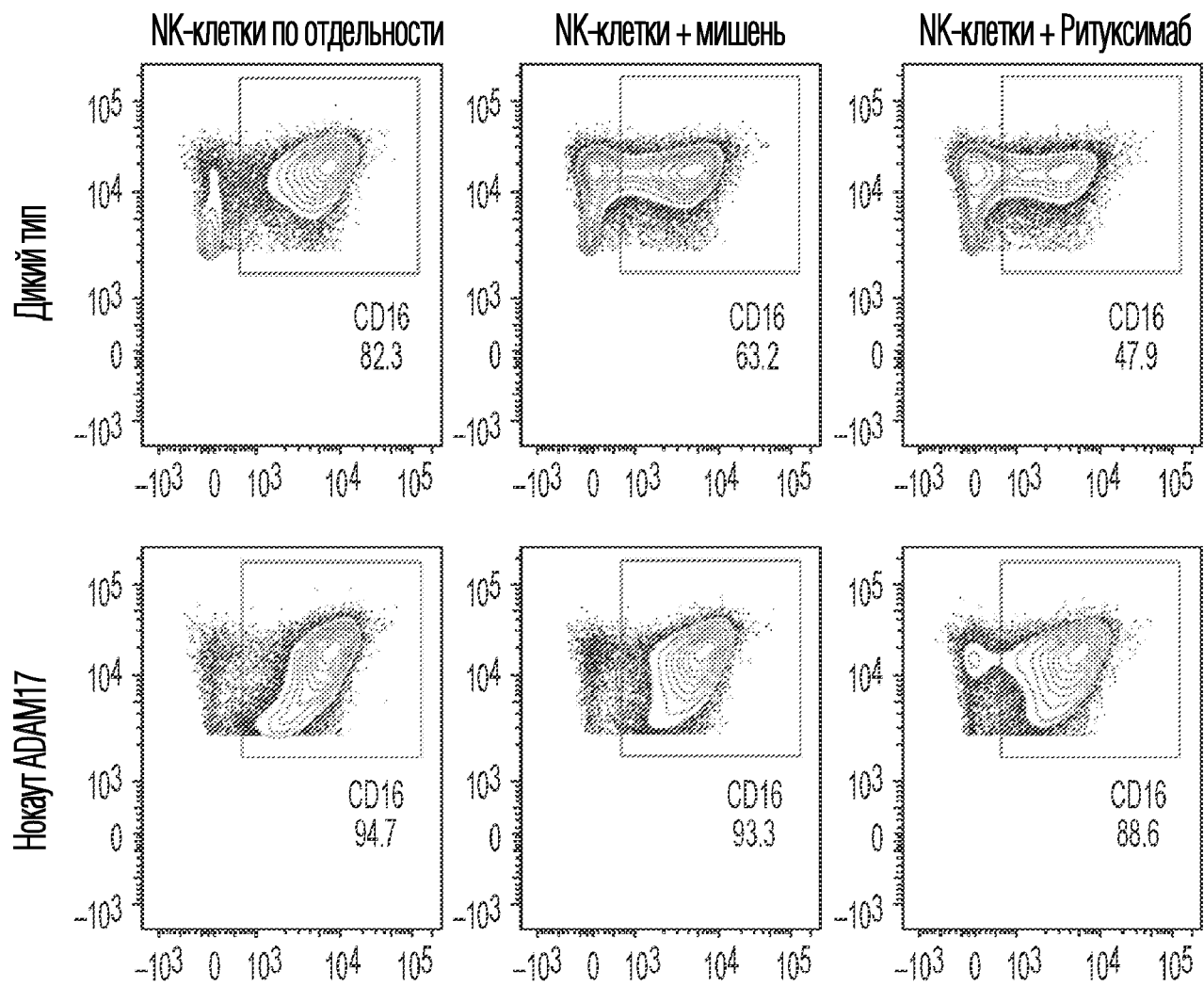
□ NK-клетки по отдельности  
 ■ NK-клетки с CCRF-CEM



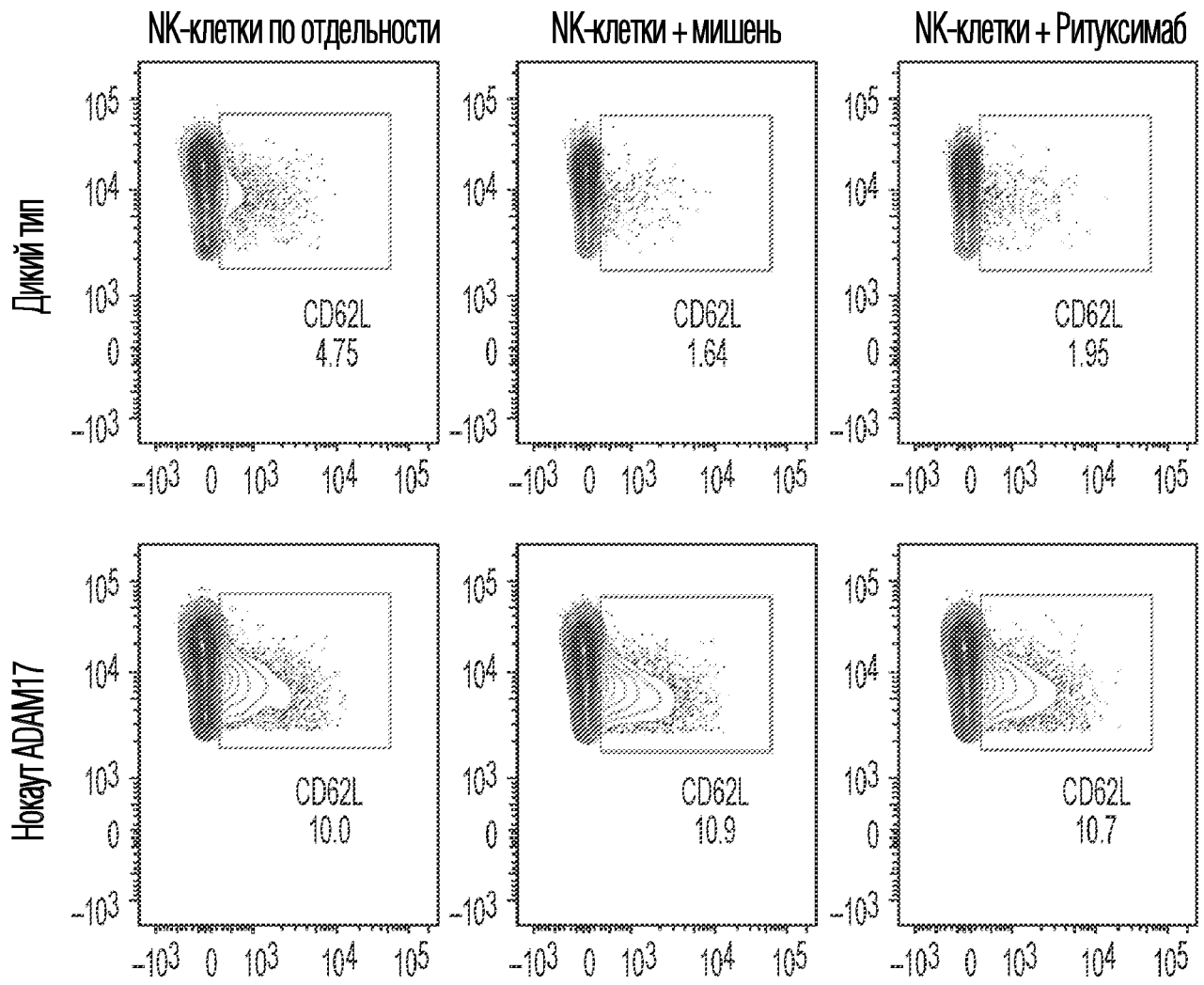
□ NK-клетки по отдельности  
 ■ NK-клетки с клетками Raji

ФИГ. 5

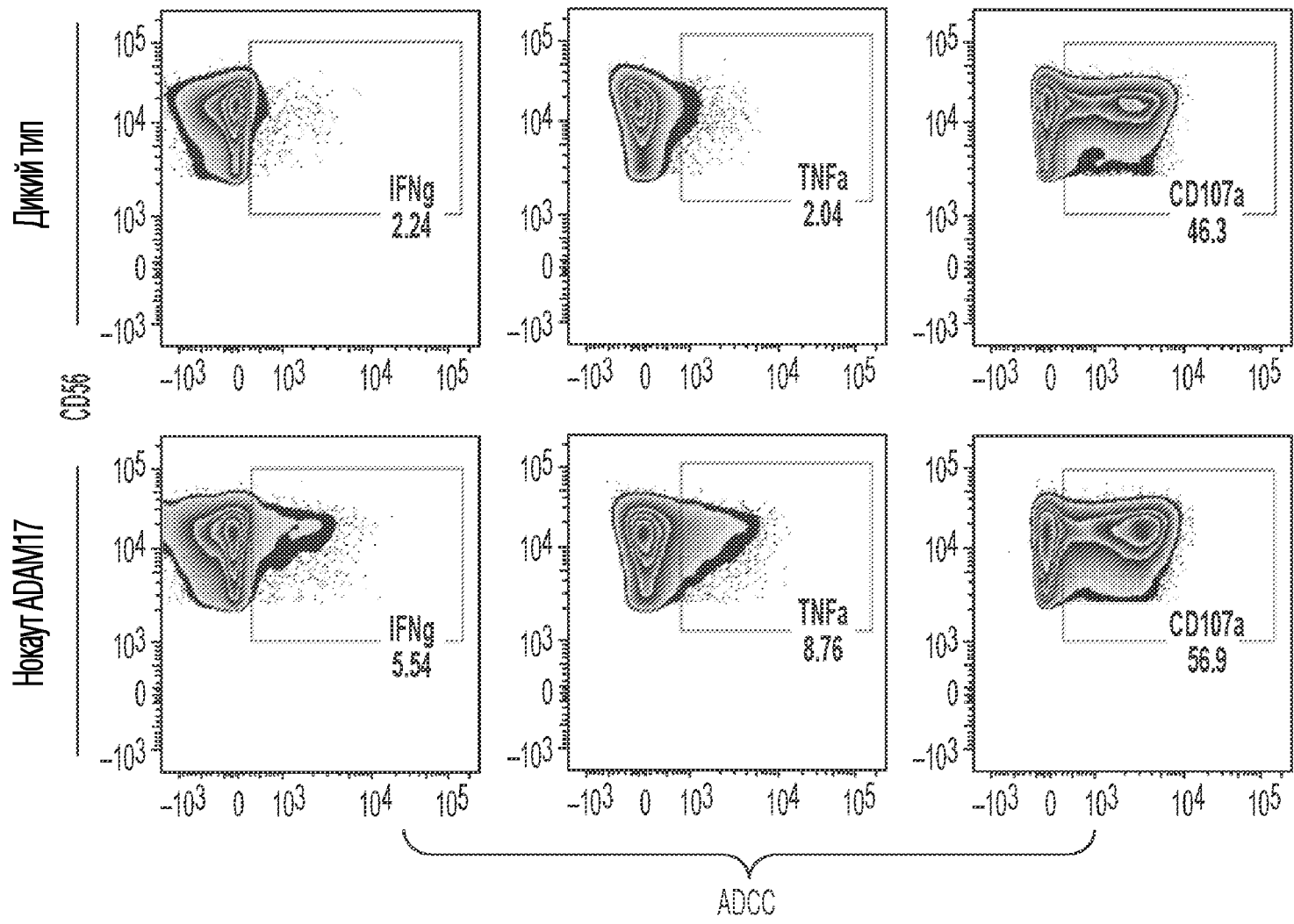




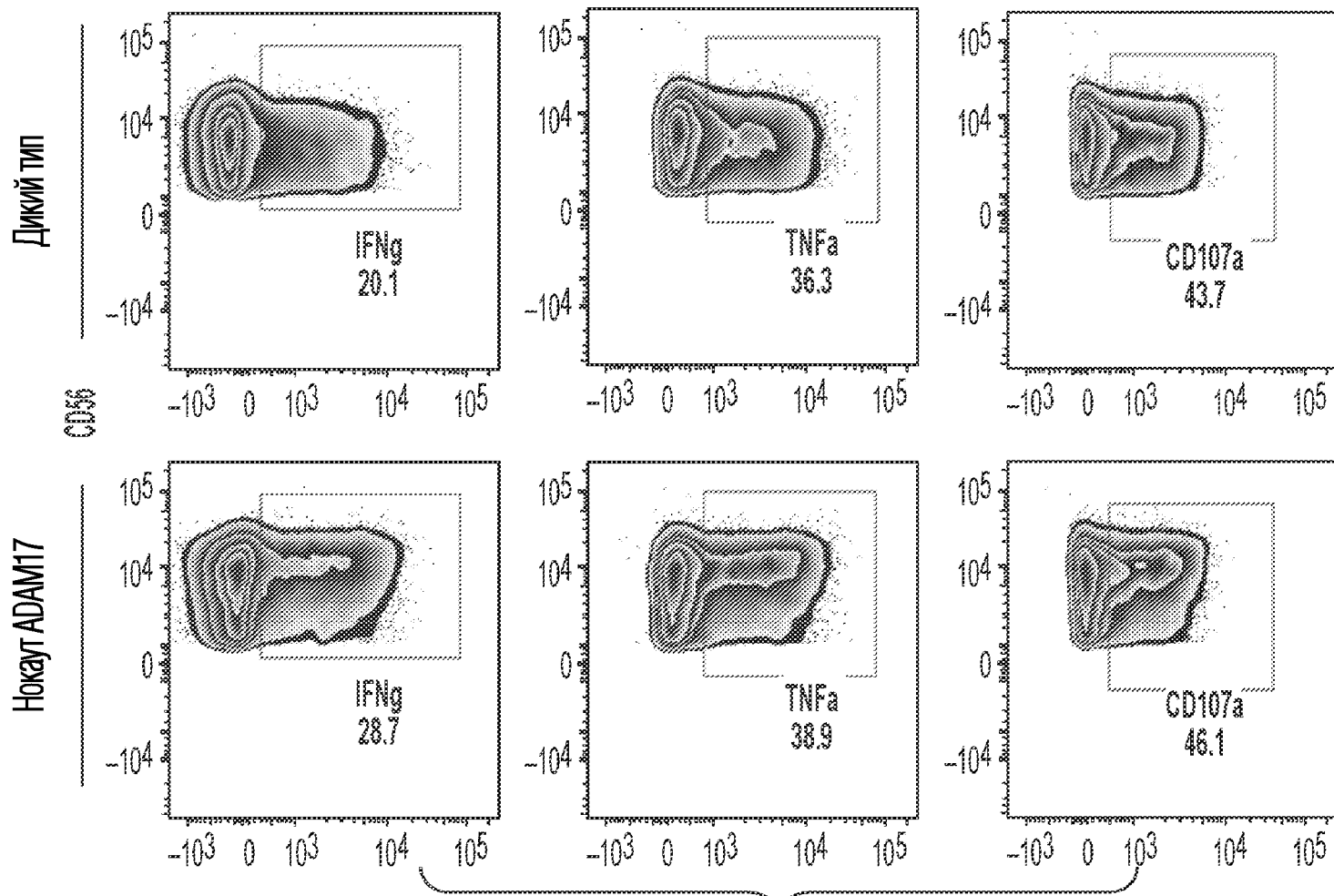
ФИГ. 6



ФИГ. 6  
ПРОДОЛЖЕНИЕ

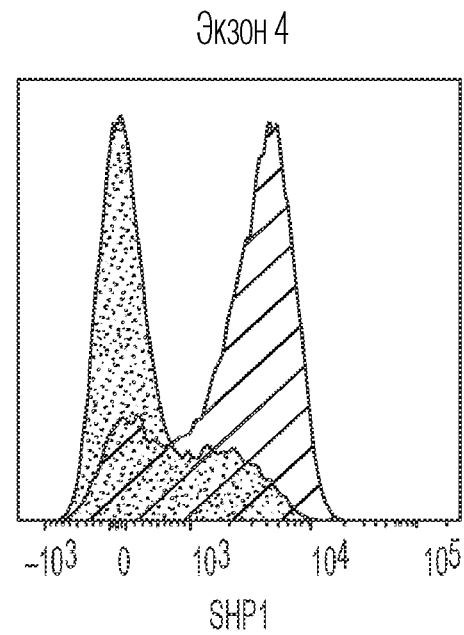
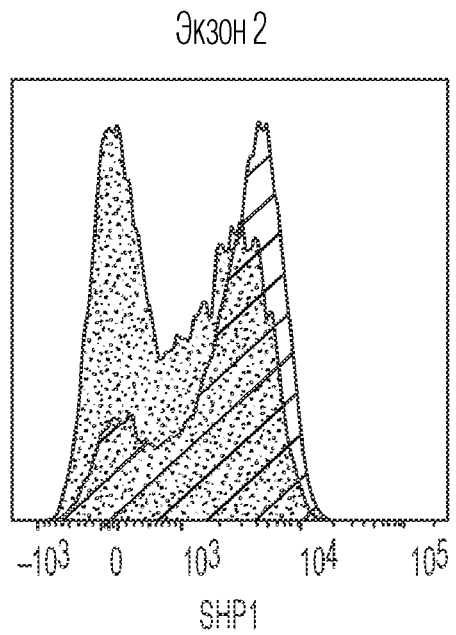


ФИГ. 7



K562

**ФИГ. 7**  
ПРОДОЛЖЕНИЕ



 До нокаута  
 После нокаута

Целевая последовательность

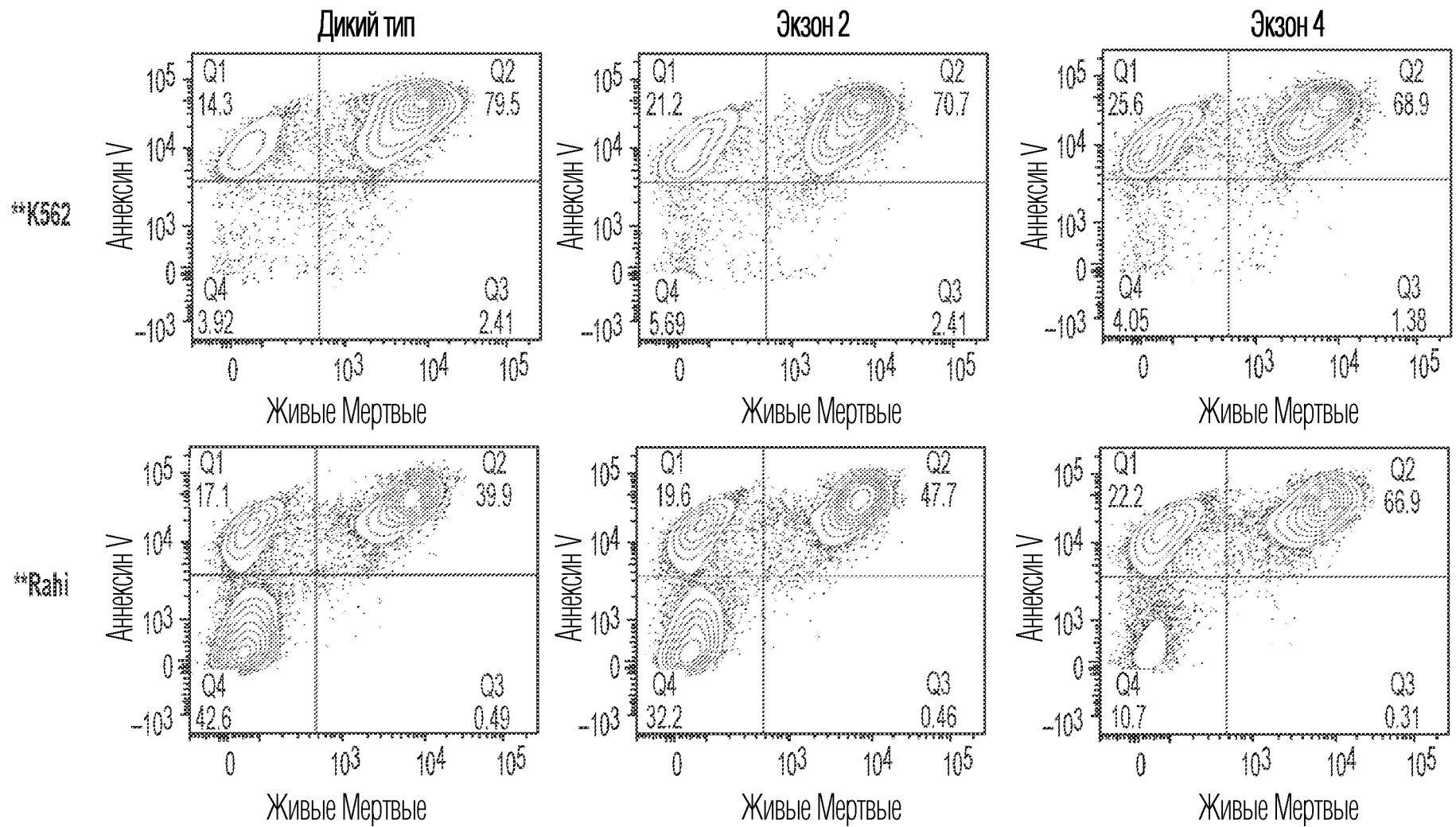
Экзон 2

GTCACCCTGGTTCTTGCGAC

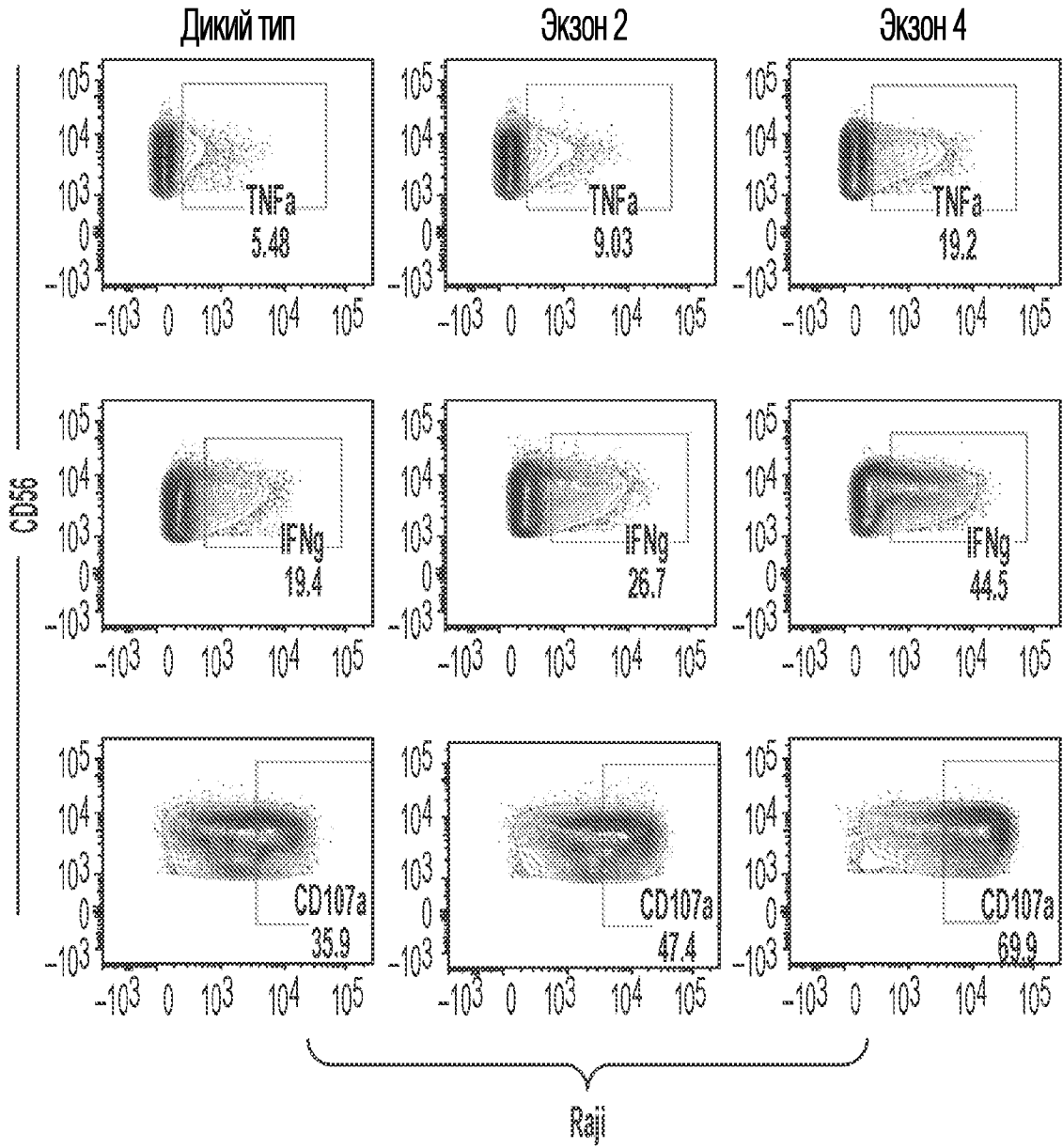
Экзон 4

TCACGCACAAGAAACGTCCA

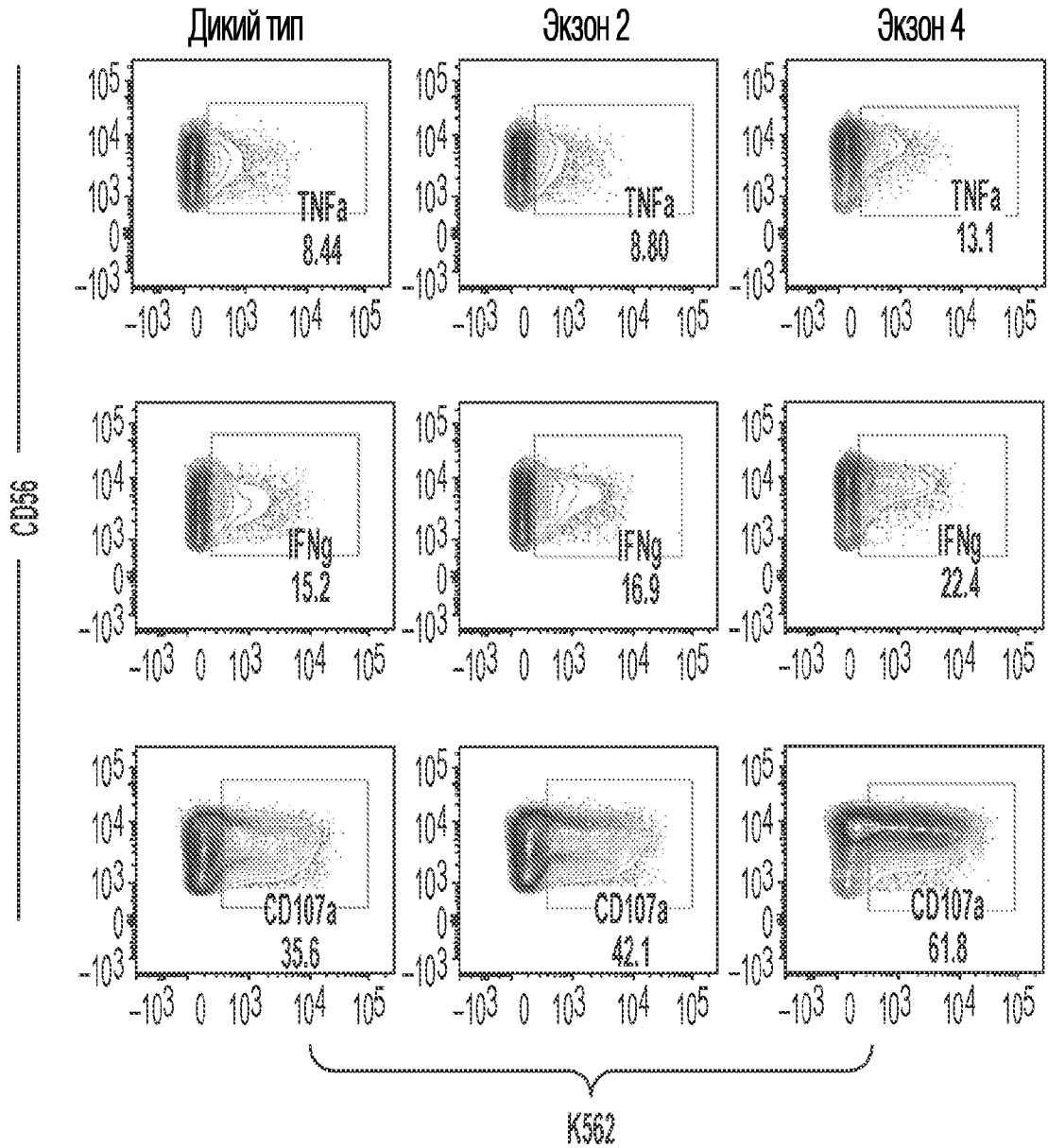
ФИГ. 8



ФИГ. 9

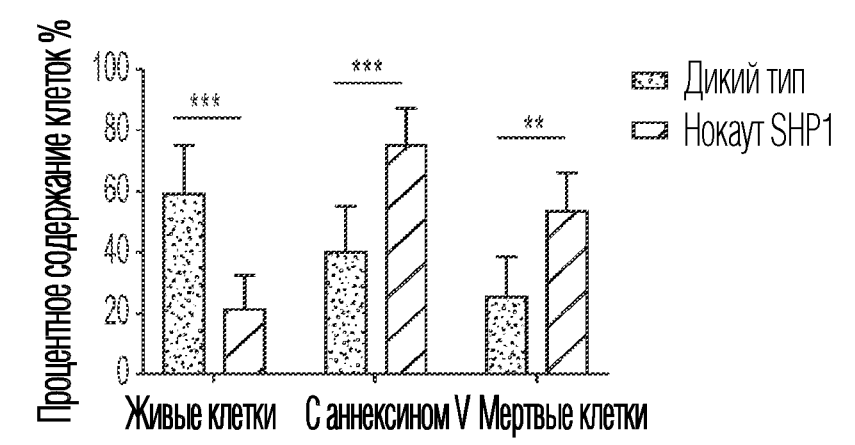
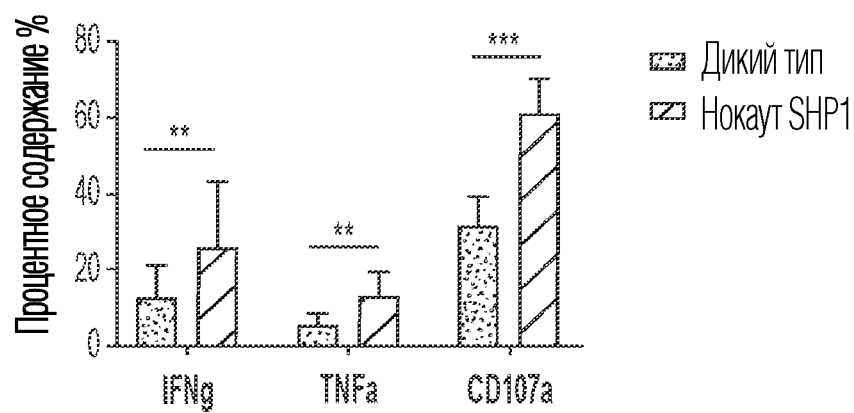
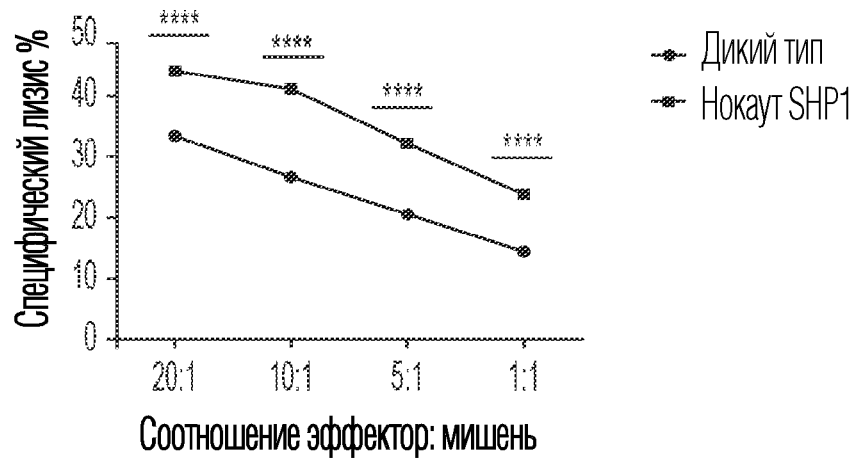


ФИГ. 10А

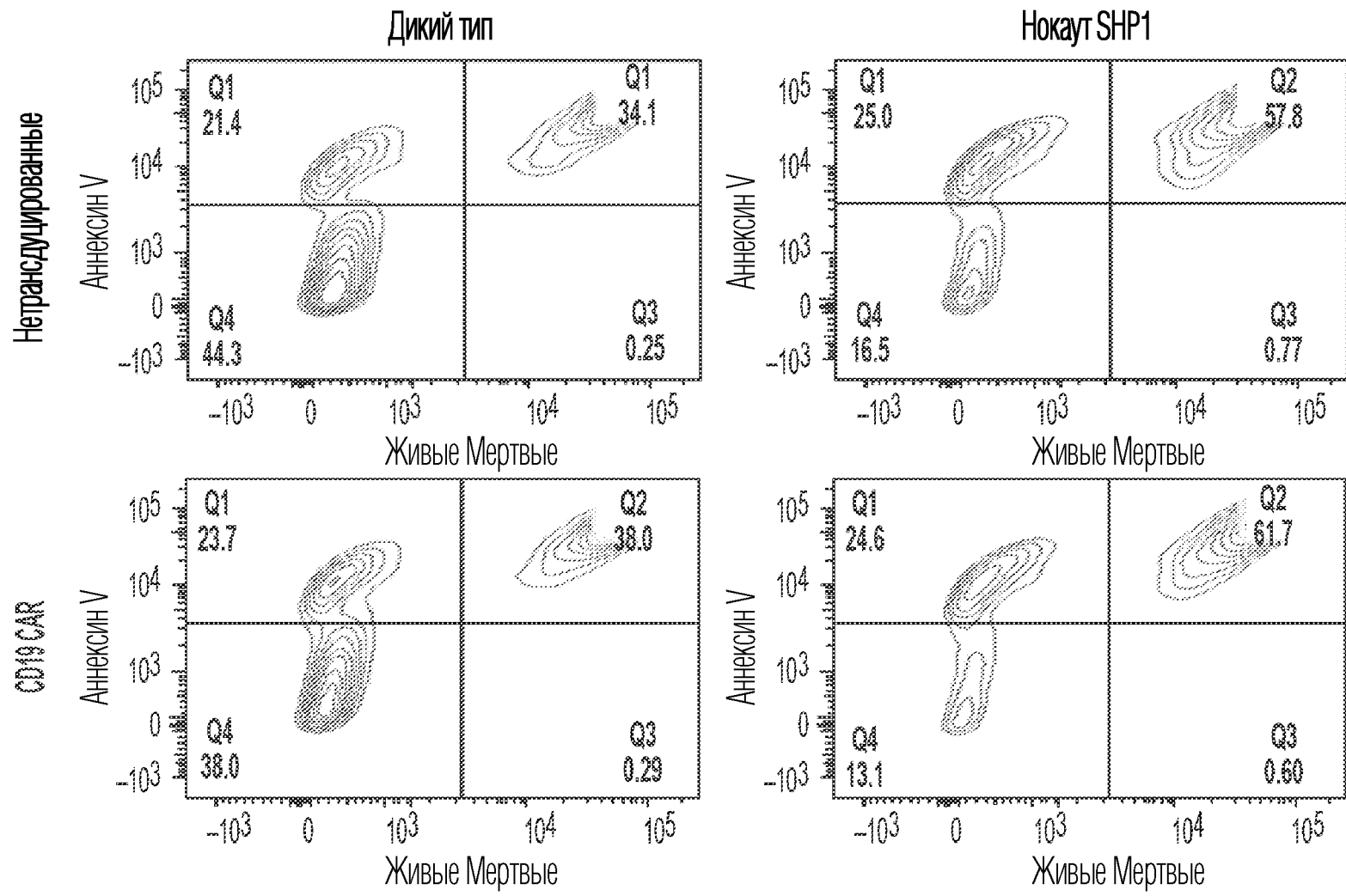


ФИГ. 10А  
ПРОДОЛЖЕНИЕ

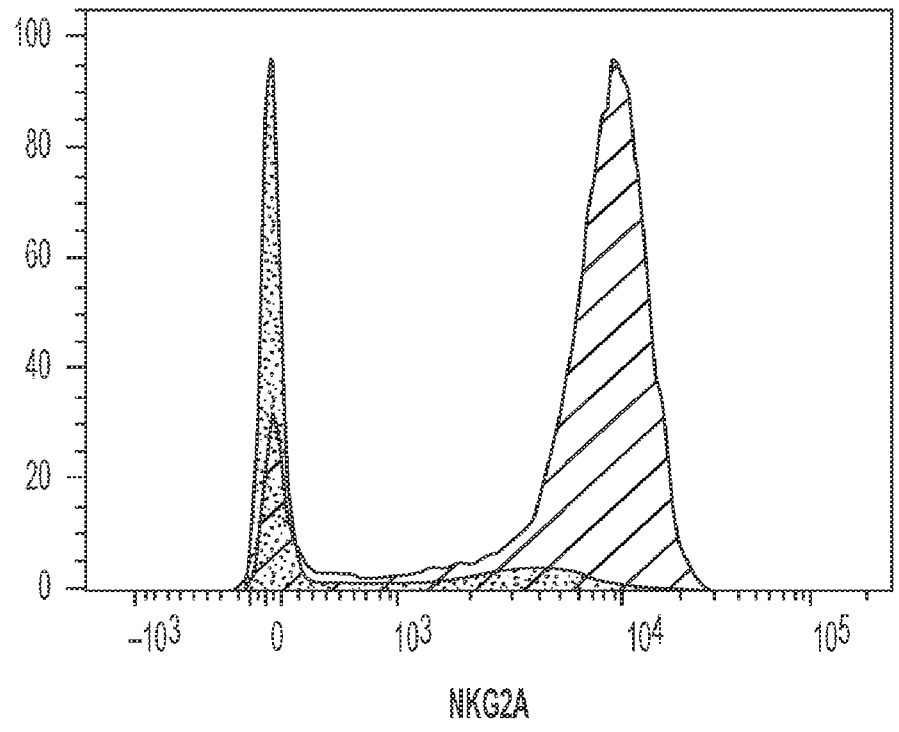




ФИГ. 10В

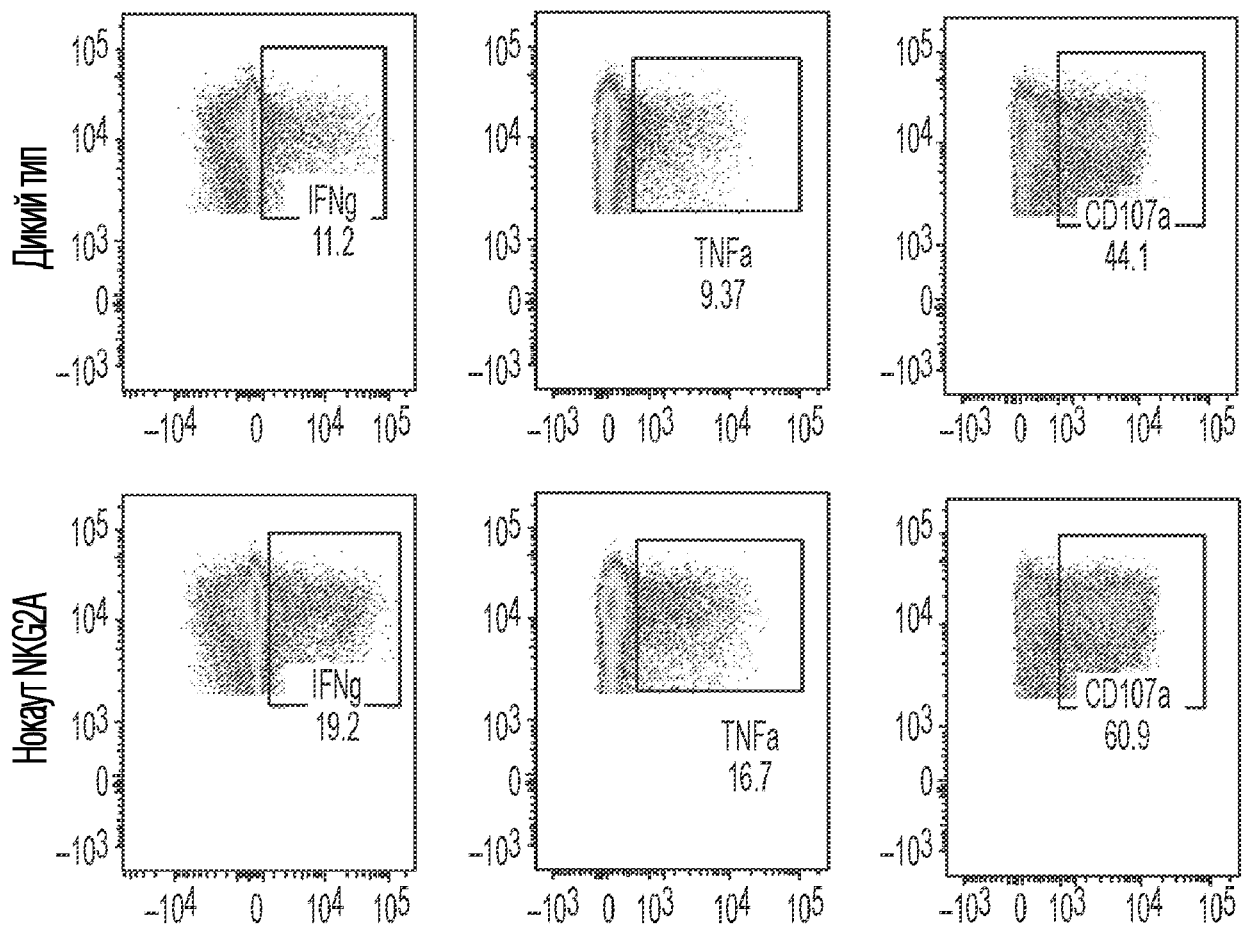


ФИГ. 11

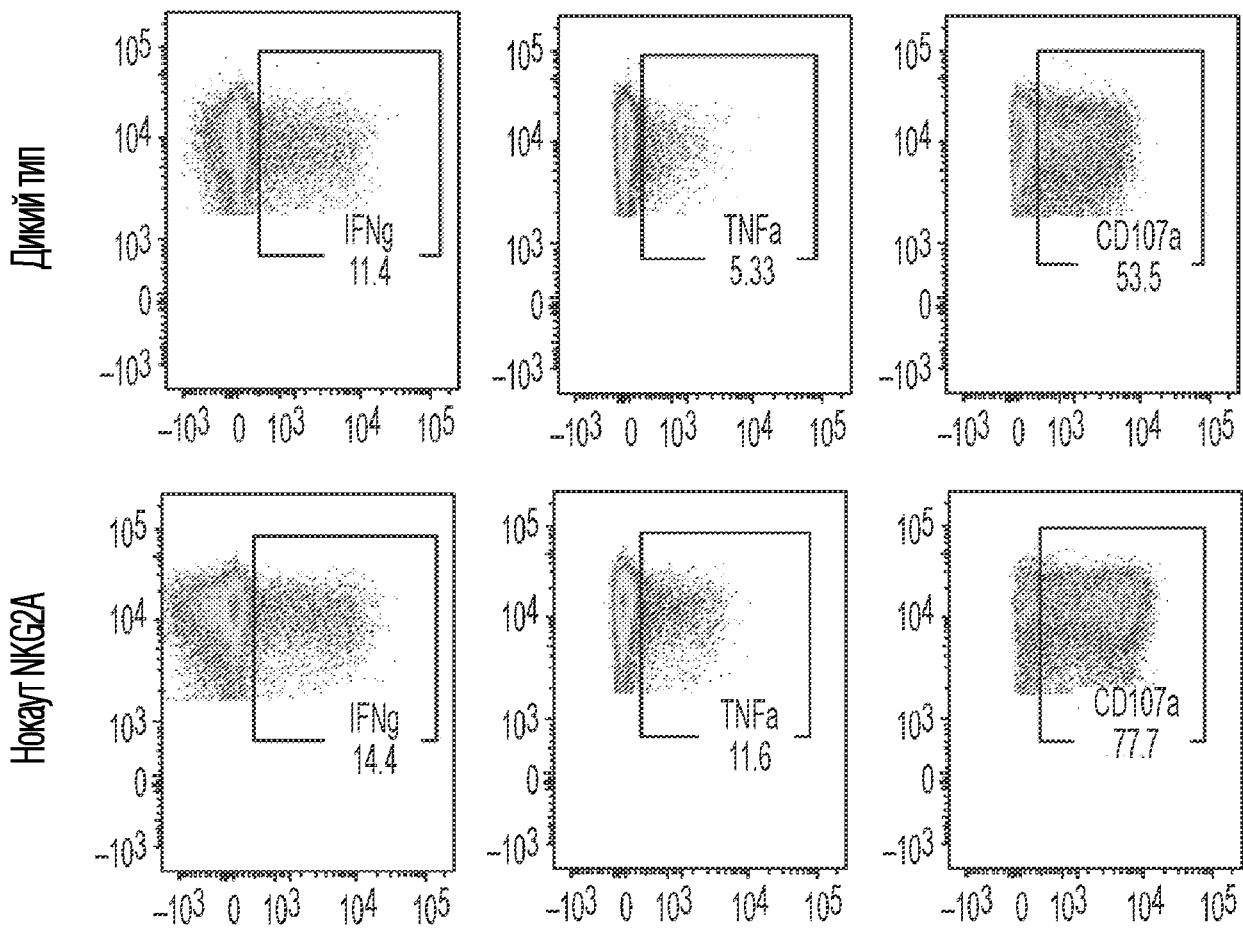


До нокаута  
После нокаута

ФИГ. 12А

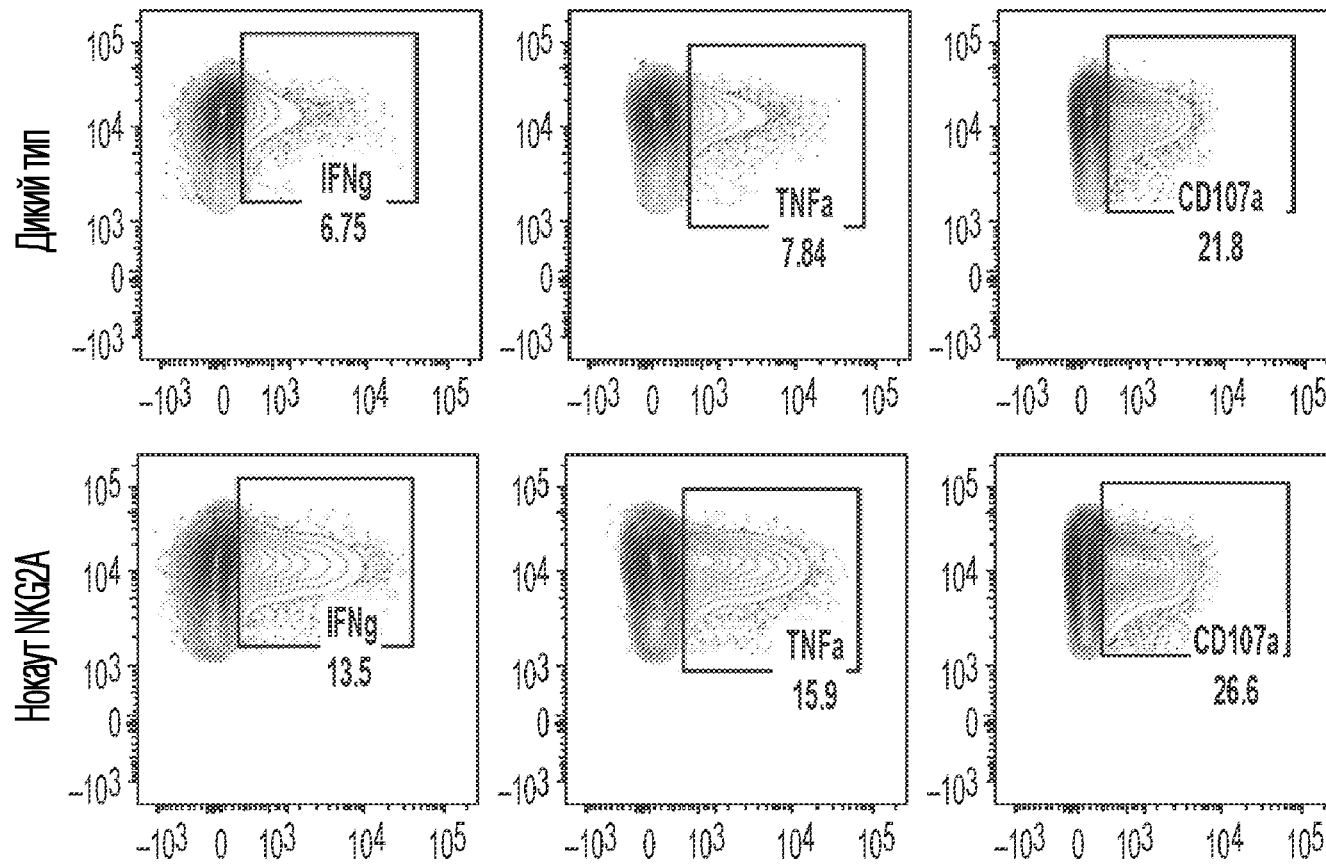


Донор 1  
**ФИГ. 12В**



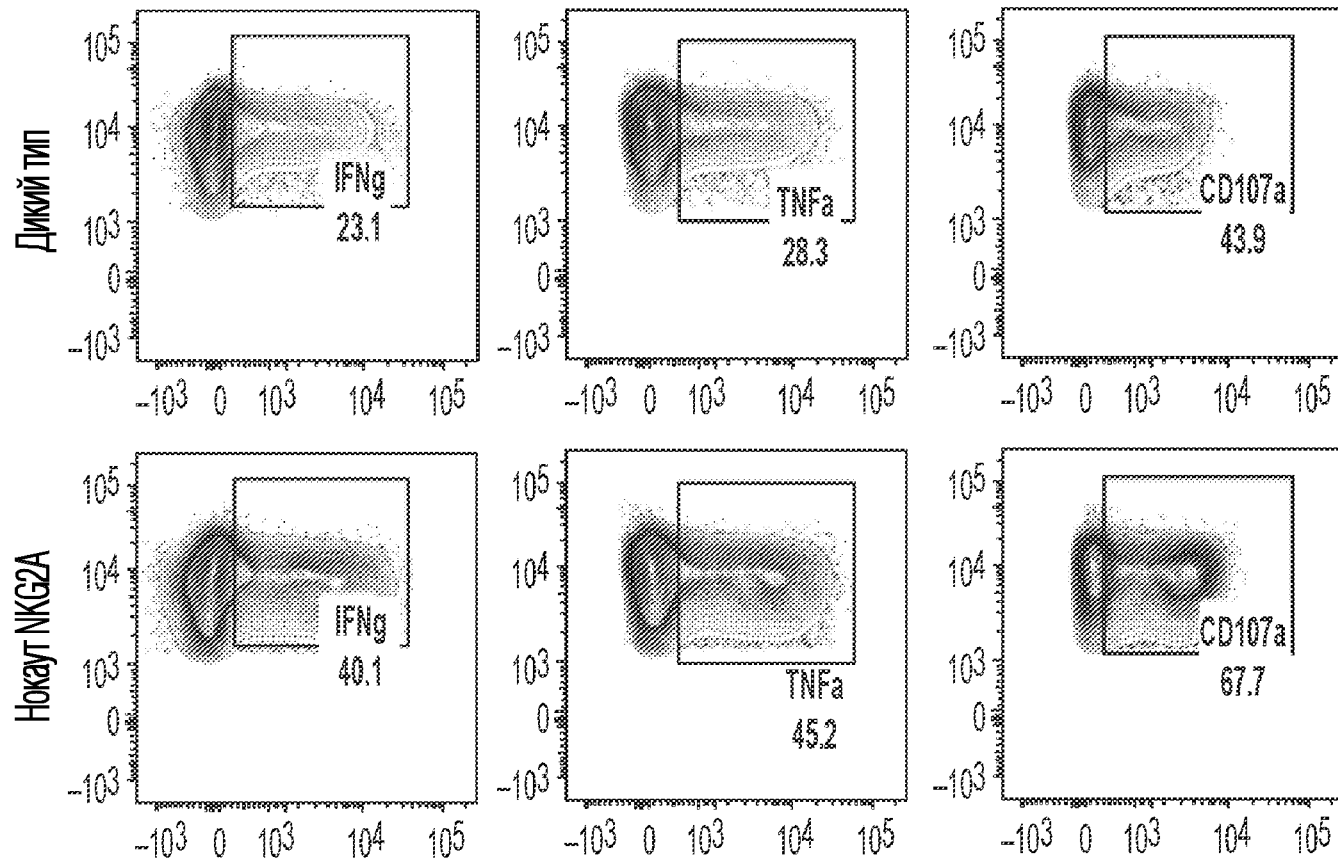
Донор 2  
**ФИГ. 12В**  
 ПРОДОЛЖЕНИЕ

НК-клетки, трансдуцированные IL-15



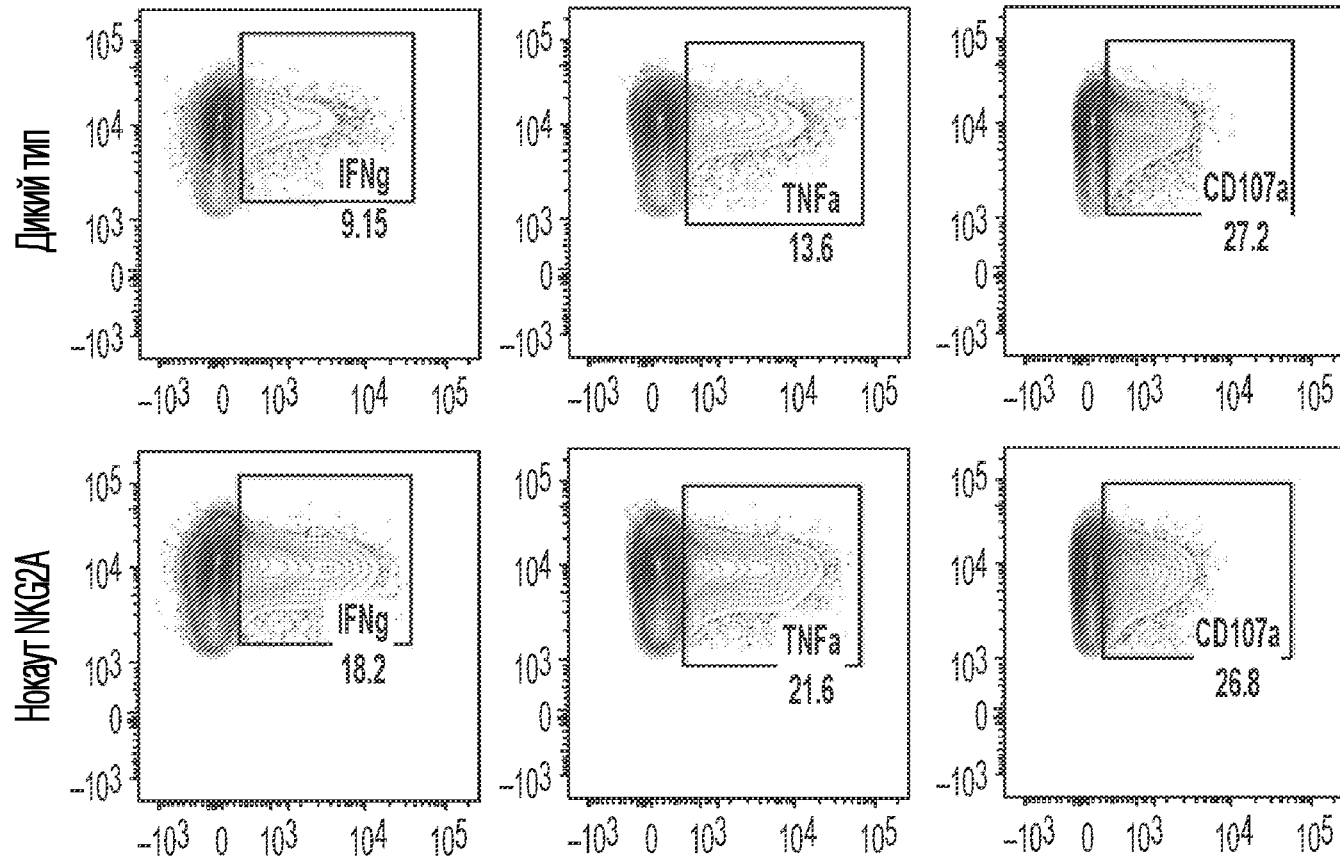
ФИГ. 12С  
ПРОДОЛЖЕНИЕ

НК-CAR-клетки с CD19



ФИГ. 12С  
ПРОДОЛЖЕНИЕ

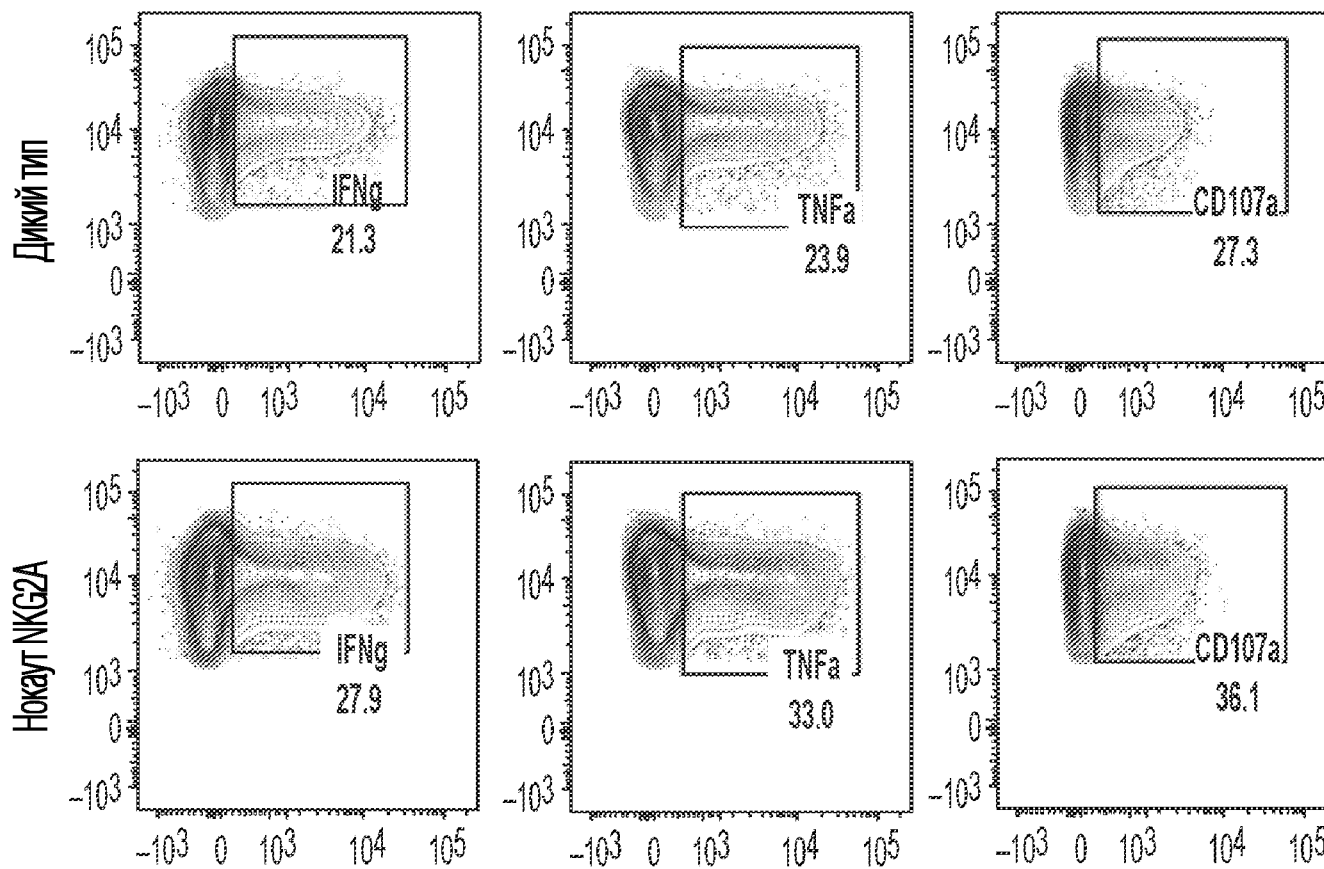
НК-СAR-клетки с CD19



ФИГ. 12С  
ПРОДОЛЖЕНИЕ

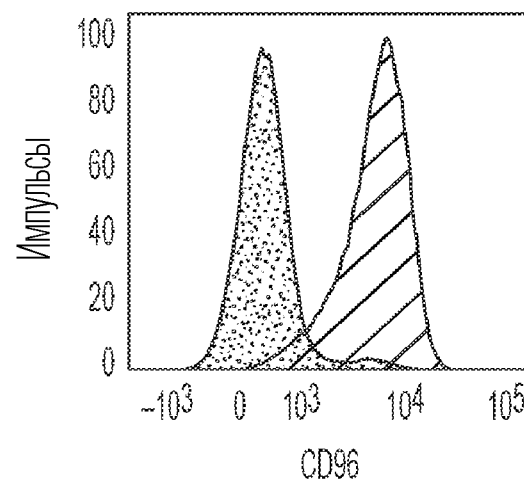
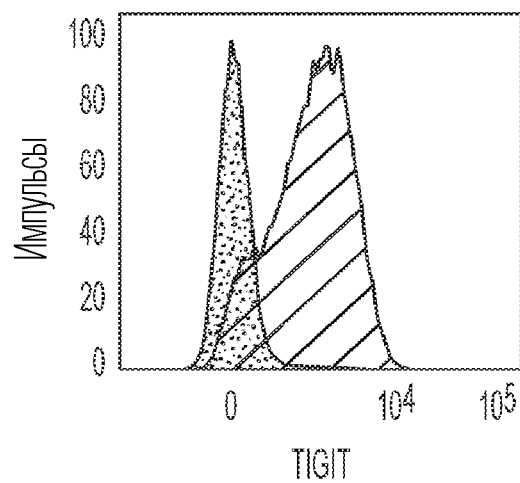
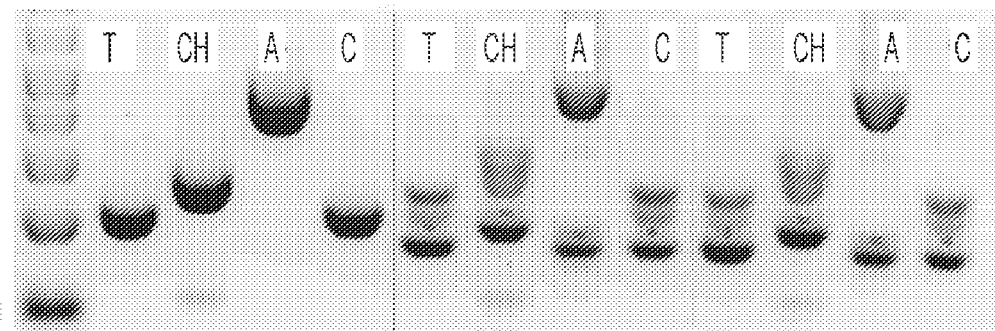
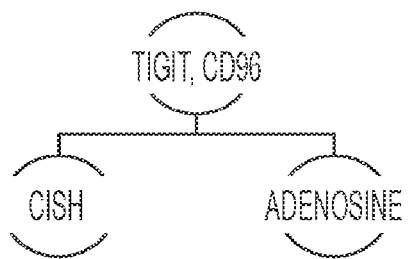


НК-СAR-клетки с CD19



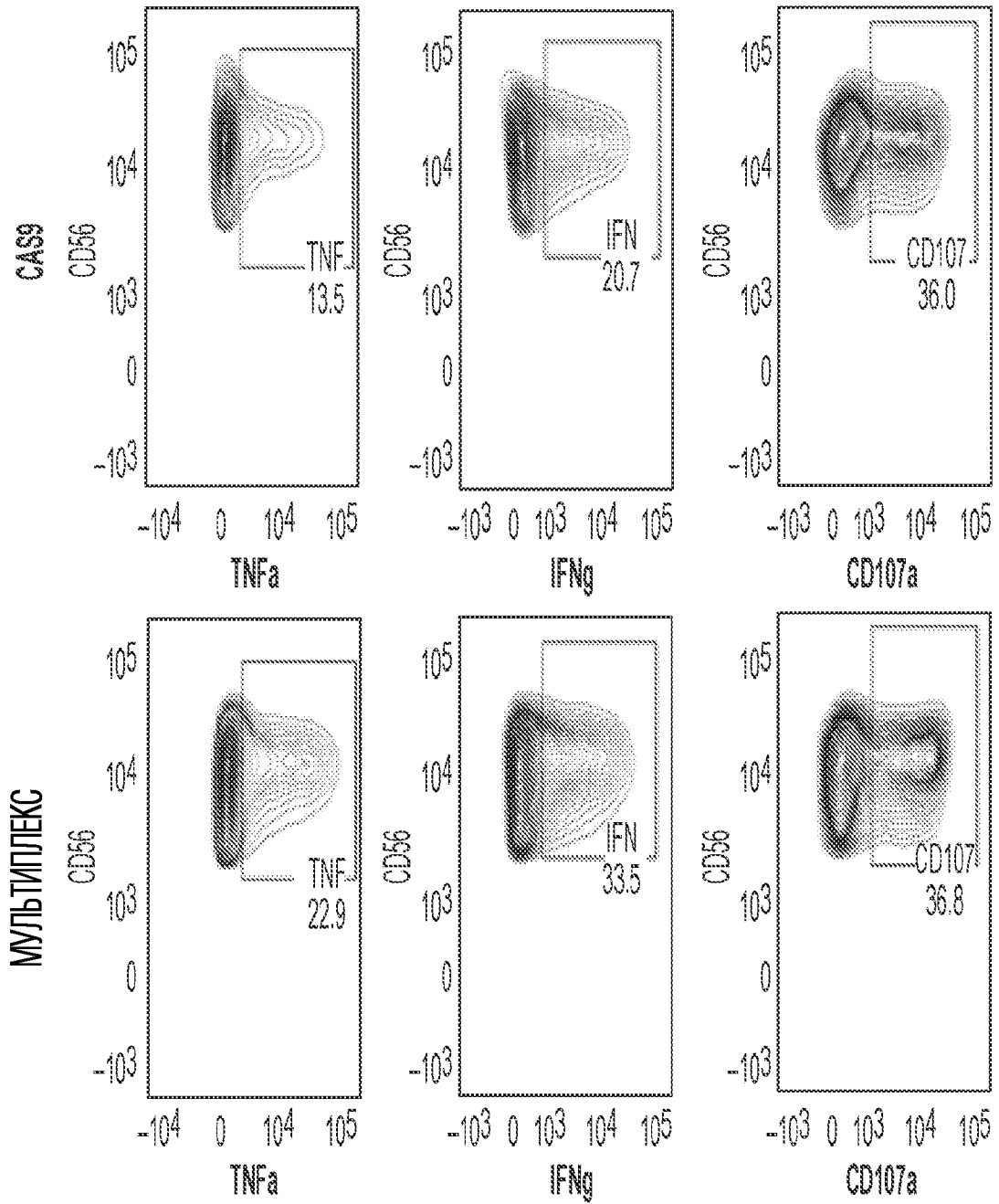
ФИГ. 12С

ПРОДОЛЖЕНИЕ

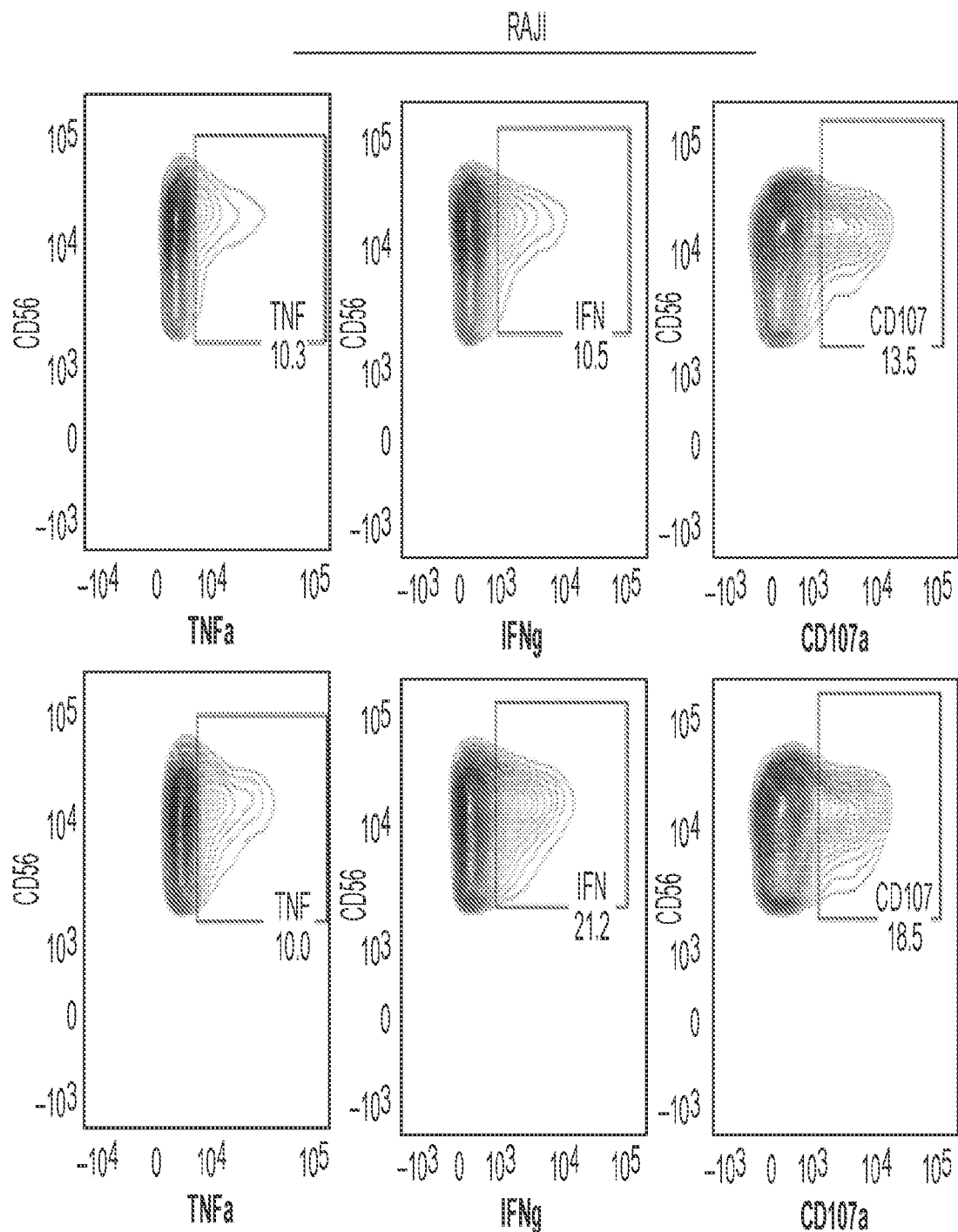


ФИГ. 13

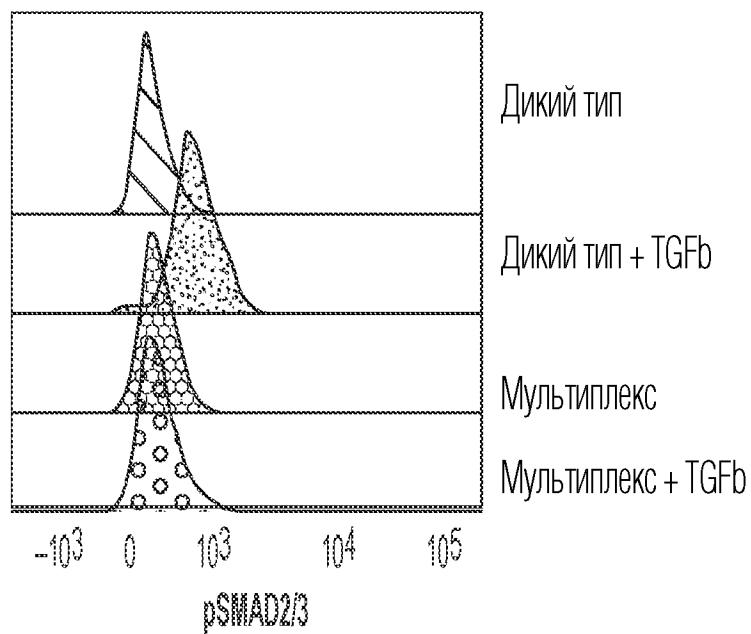
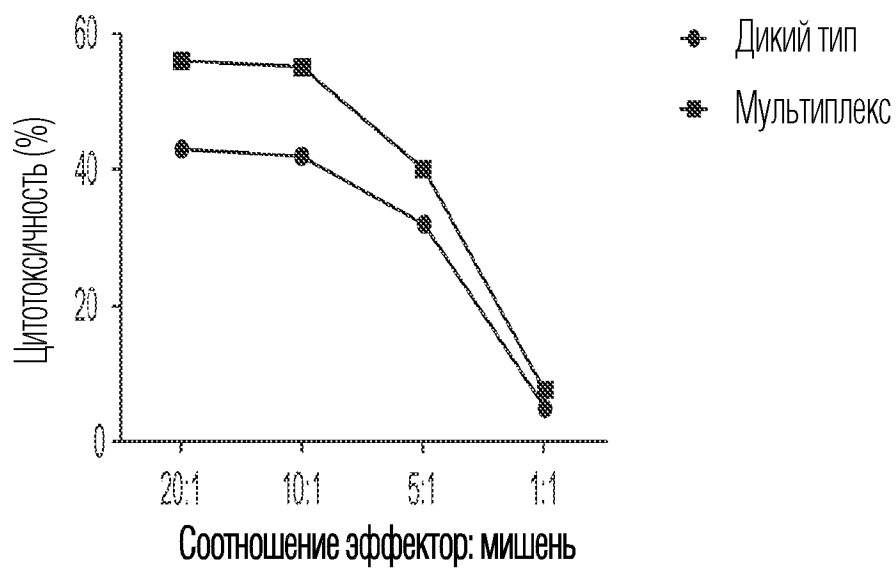
K562



ФИГ. 14



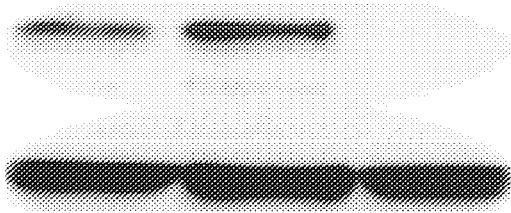
**ФИГ. 14**  
ПРОДОЛЖЕНИЕ



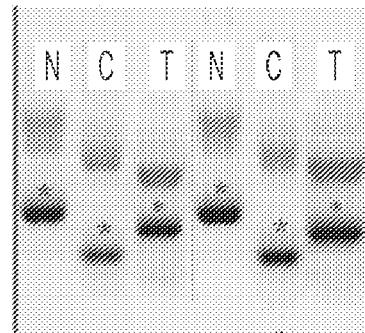
**ФИГ. 14**  
ПРОДОЛЖЕНИЕ



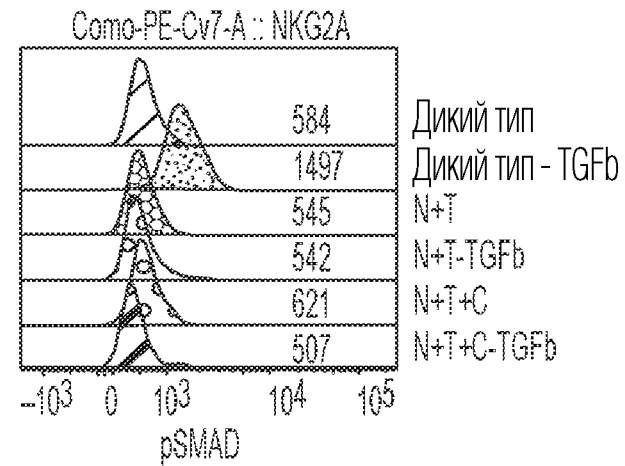
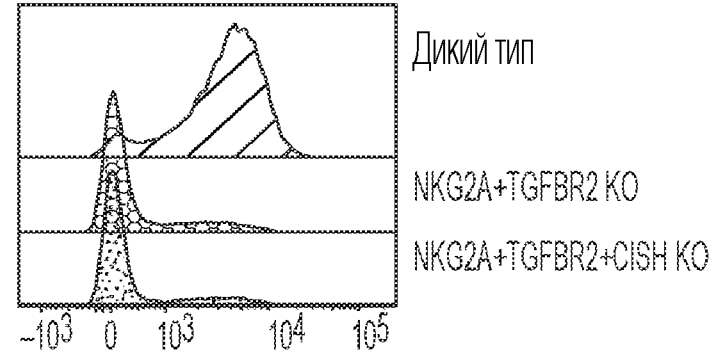
Эффективность нокаута CISH на основании белка на сутки 7



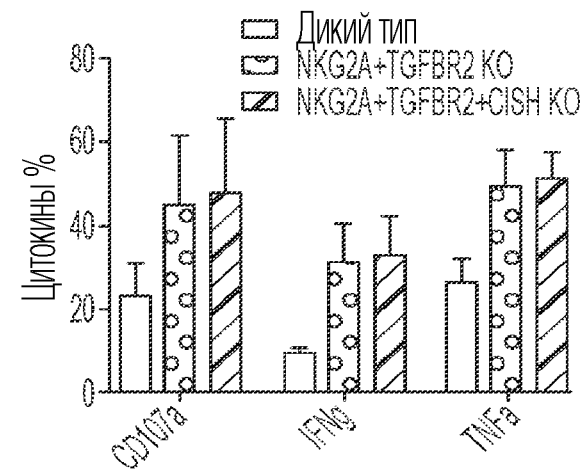
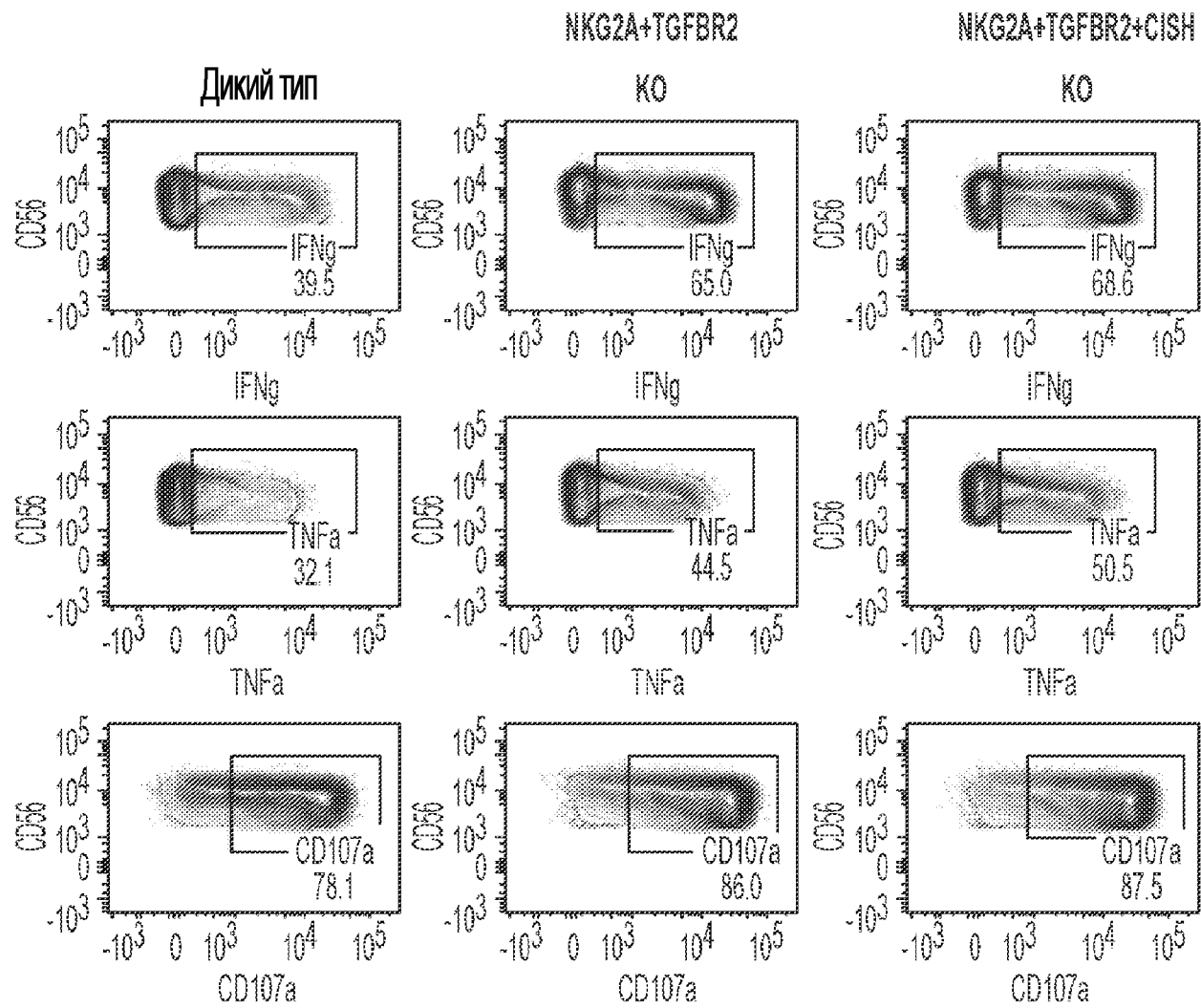
Эффективность нокаута на основании ПЦР на сутки 3



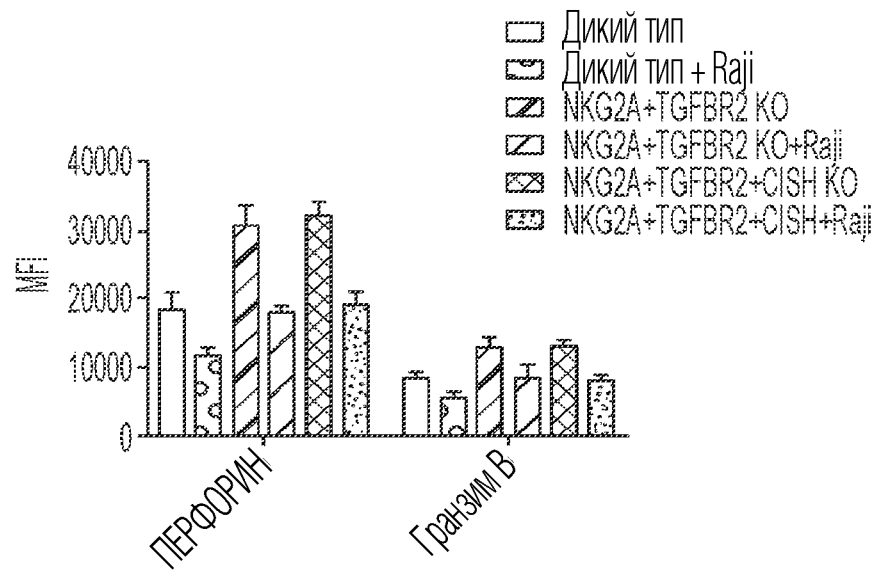
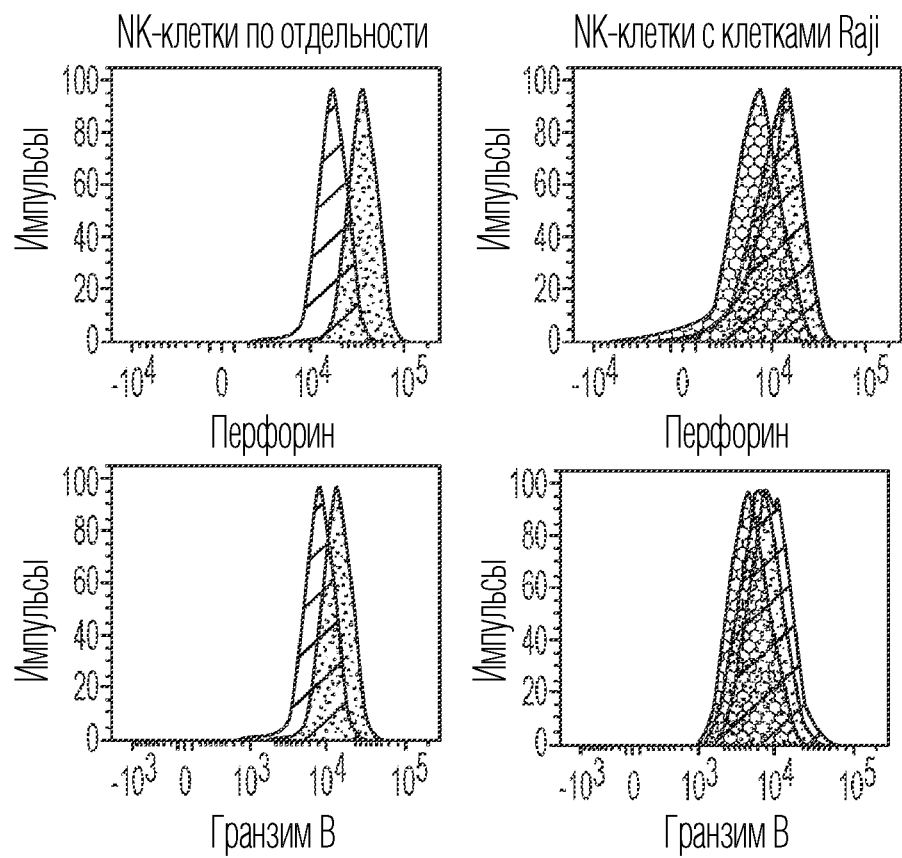
Эффективность нокаута NKG2A/TGFBR2 на основании FACS на сутки 7



ФИГ. 15

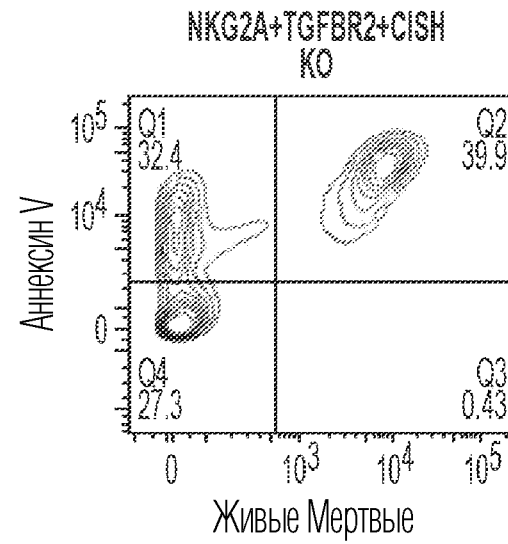
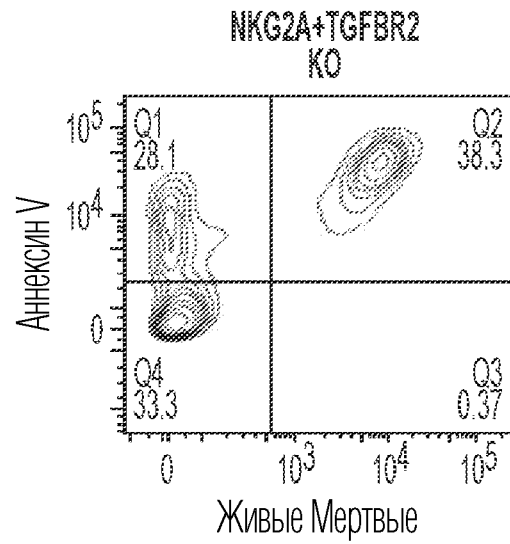
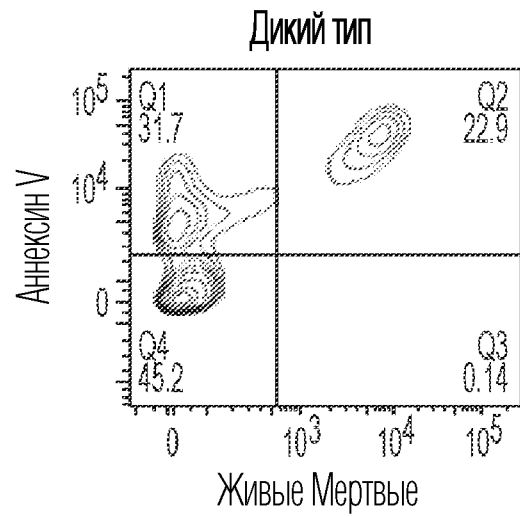
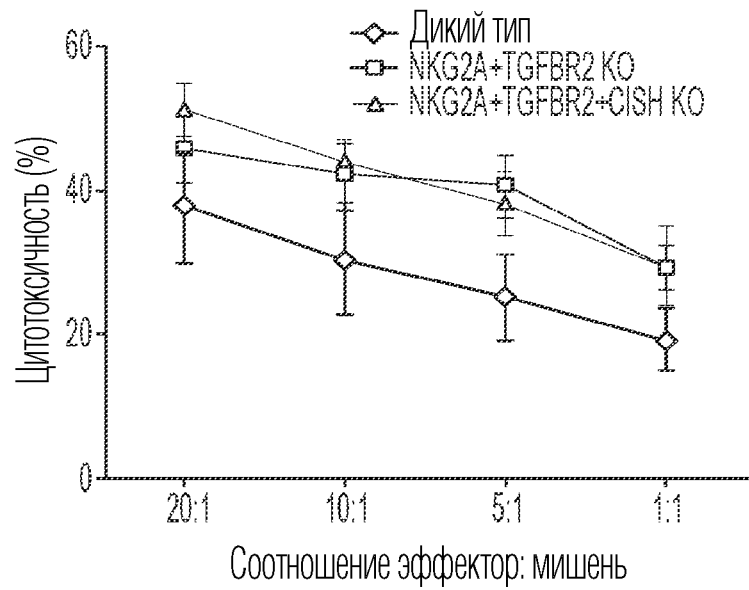


ФИГ. 16

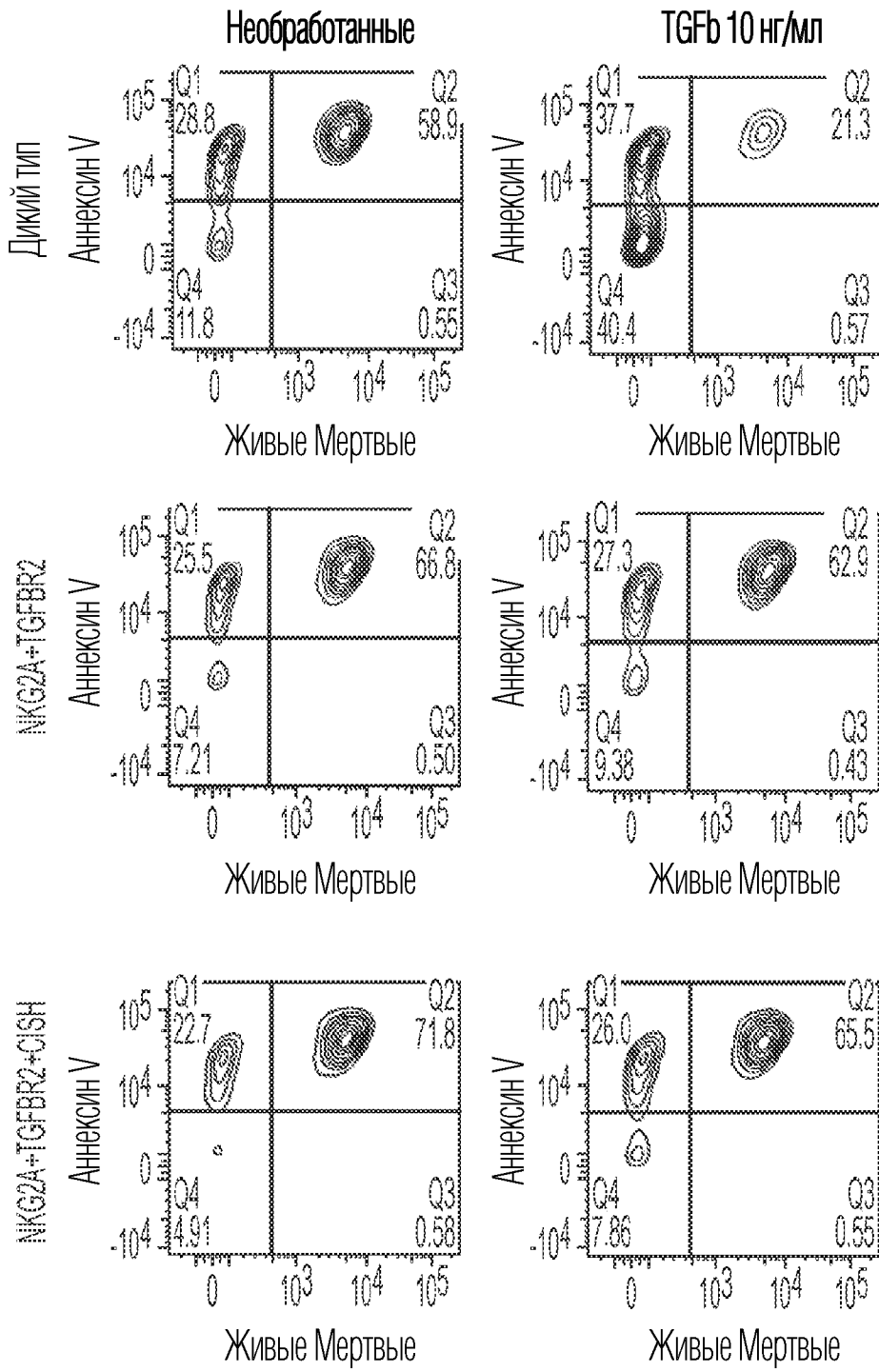


ФИГ. 16  
ПРОДОЛЖЕНИЕ

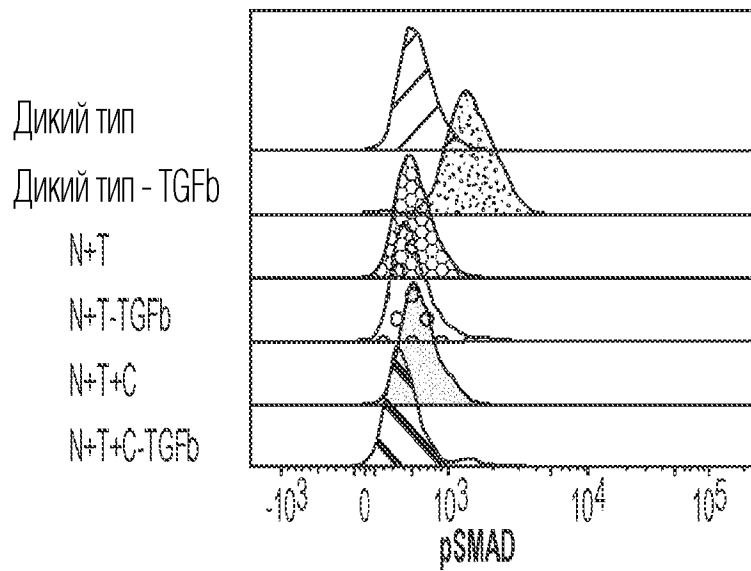
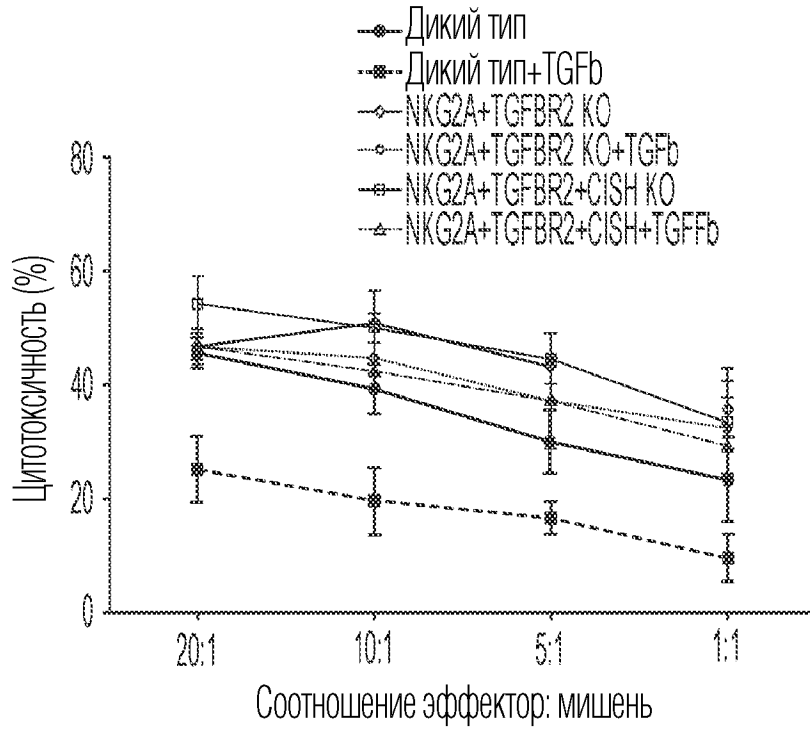




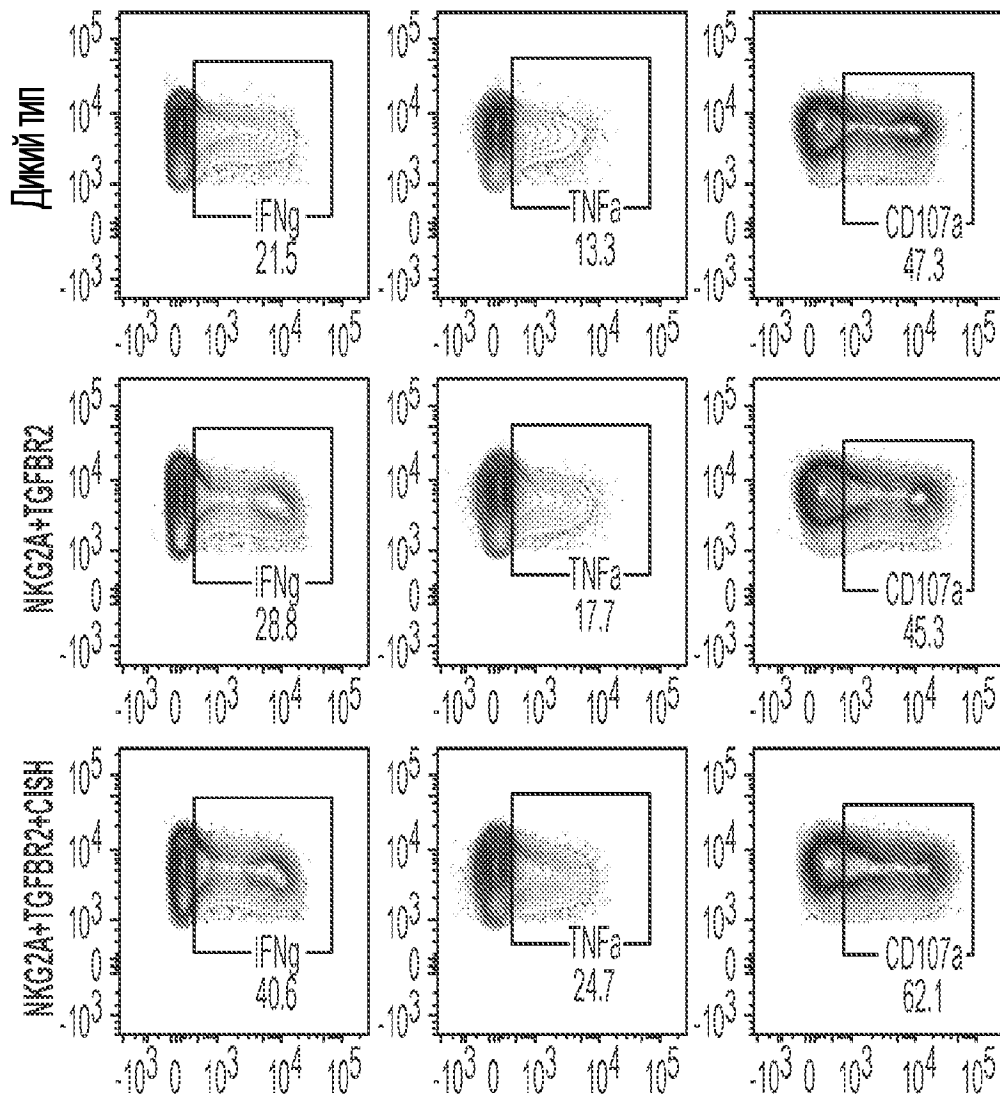
**ФИГ. 16**  
ПРОДОЛЖЕНИЕ



ФИГ. 17

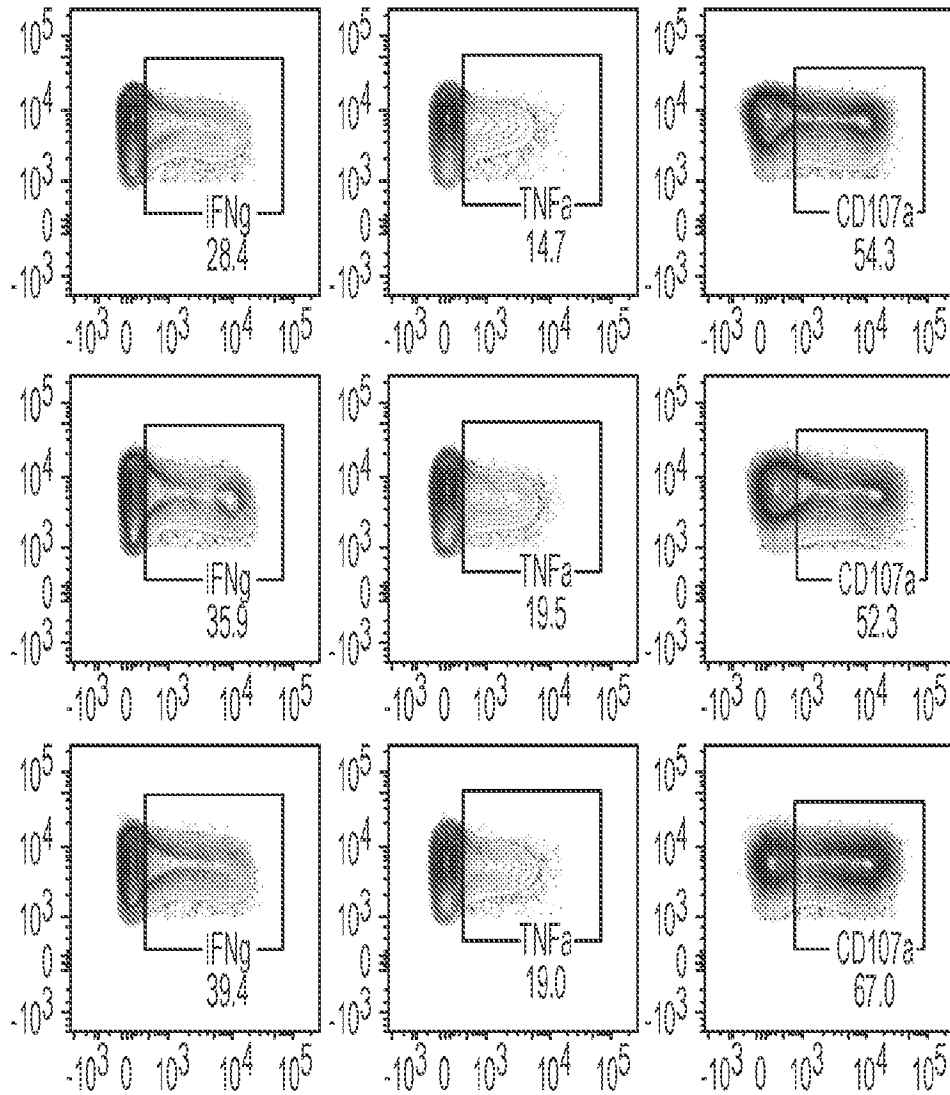


**ФИГ. 17**  
ПРОДОЛЖЕНИЕ



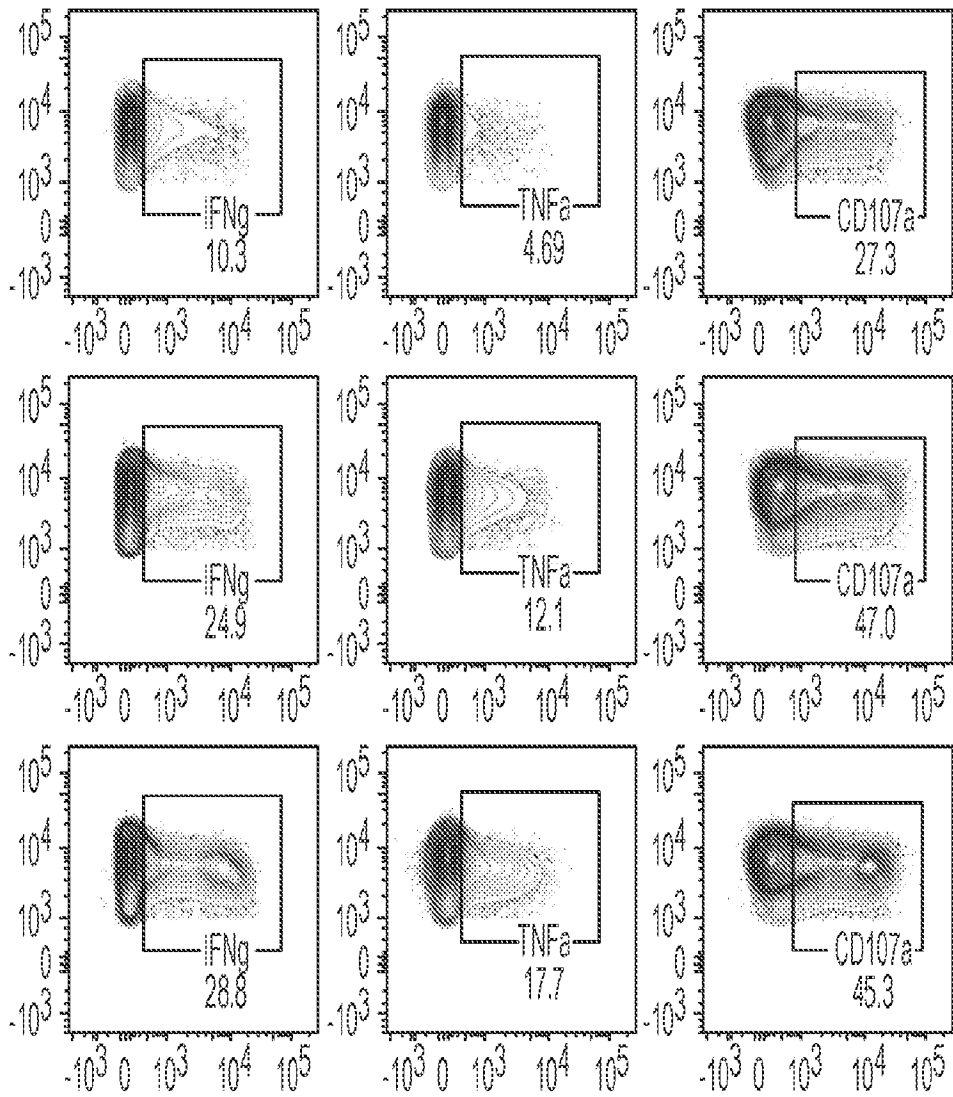
CAR NK-клетки с CD19/IL15  
и клетки Raji

ФИГ. 18



Мышечные CAR NK-клетки  
с CD19 и клетки Raji

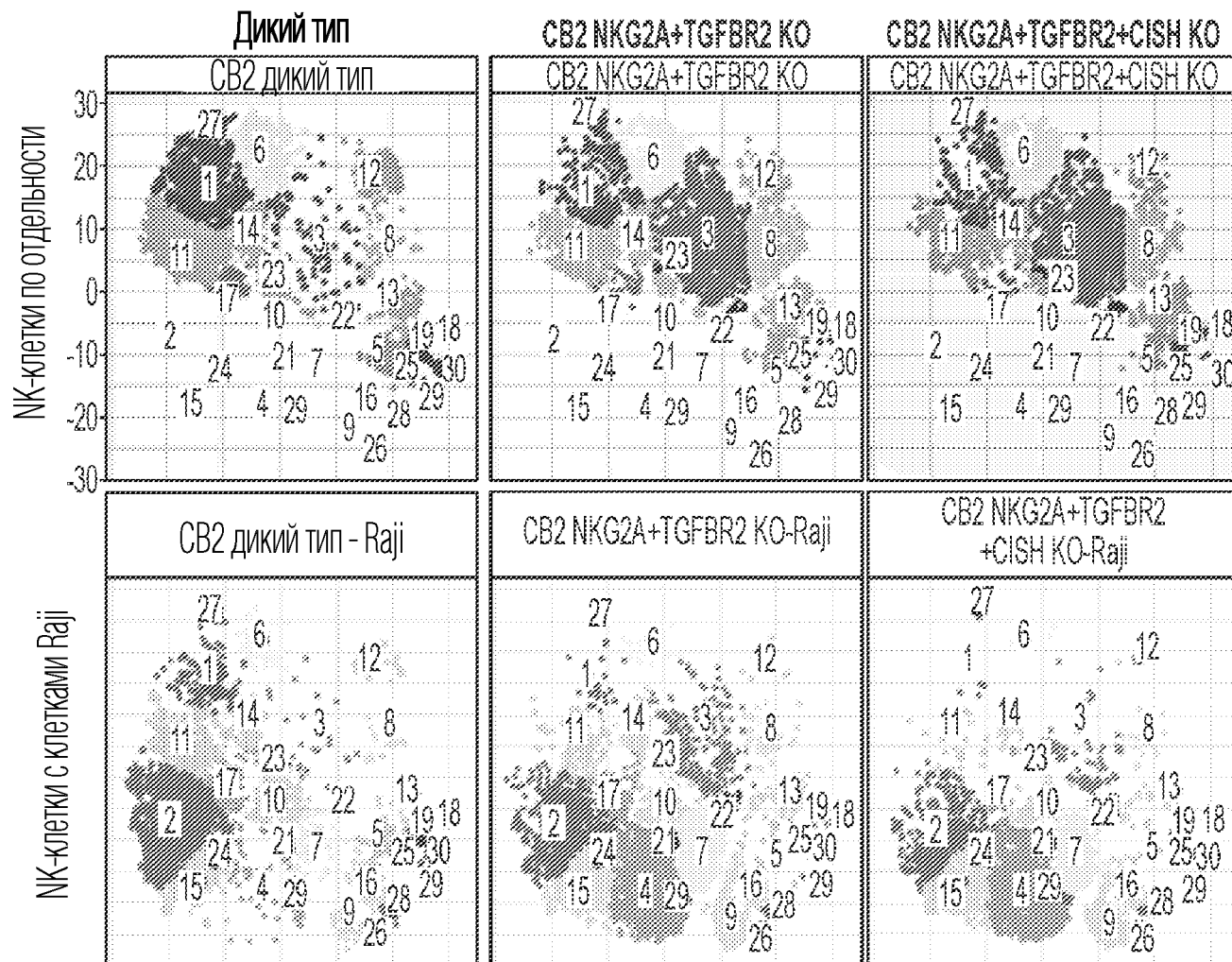
**ФИГ. 18**  
ПРОДОЛЖЕНИЕ



CAR NK-клетки с CD5  
и CCRF-CEM

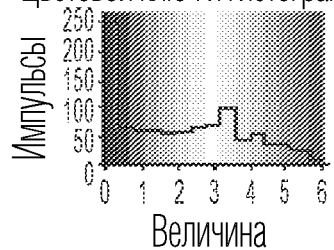
# ФИГ. 18

ПРОДОЛЖЕНИЕ

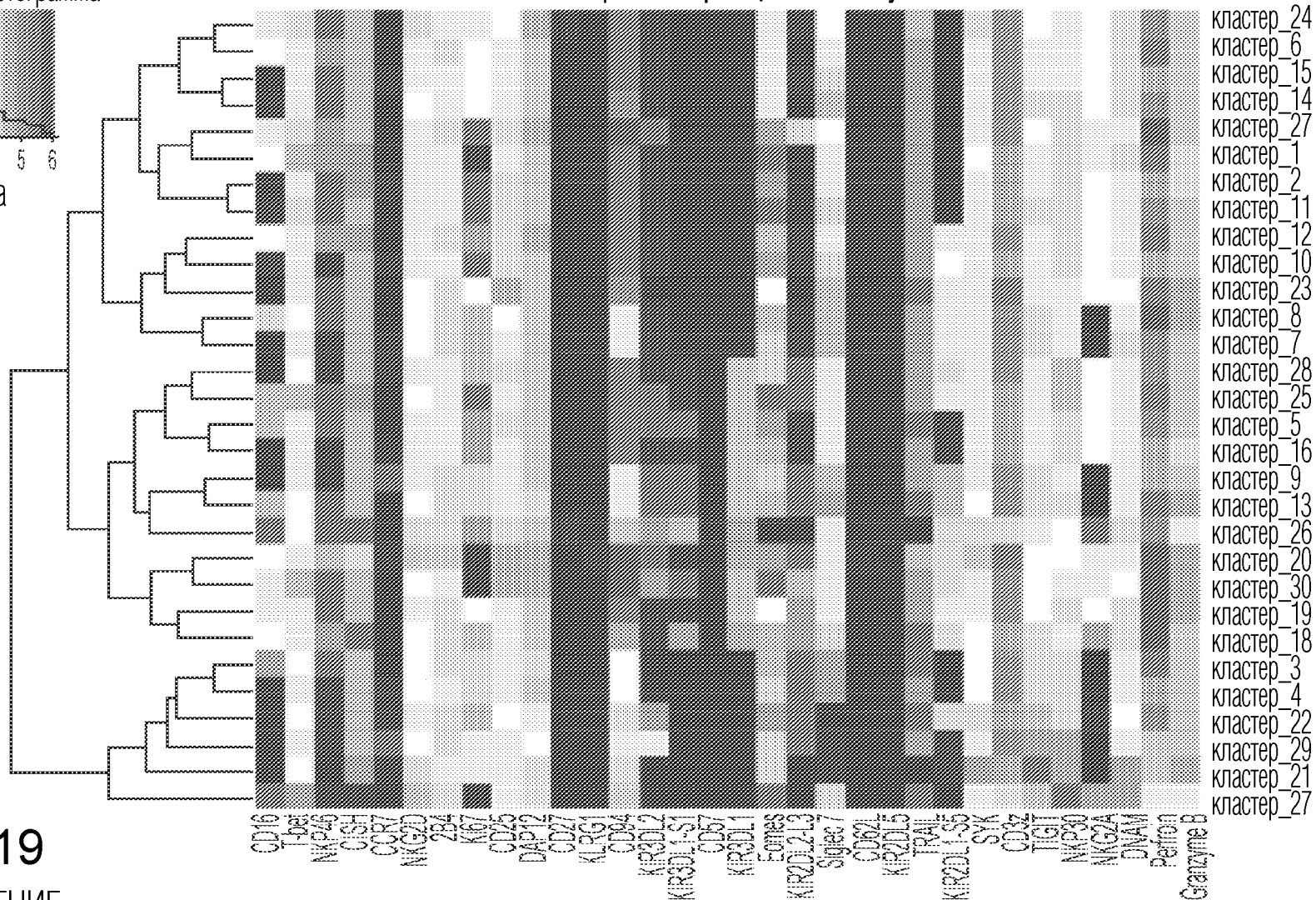


ФИГ. 19

Цветовой ключ и гистограмма



Тепловая карта кластеризации по способу X-mean



кластер\_24  
 кластер\_6  
 кластер\_15  
 кластер\_14  
 кластер\_27  
 кластер\_1  
 кластер\_2  
 кластер\_11  
 кластер\_12  
 кластер\_10  
 кластер\_23  
 кластер\_8  
 кластер\_7  
 кластер\_28  
 кластер\_25  
 кластер\_5  
 кластер\_16  
 кластер\_9  
 кластер\_13  
 кластер\_26  
 кластер\_20  
 кластер\_30  
 кластер\_19  
 кластер\_18  
 кластер\_3  
 кластер\_4  
 кластер\_22  
 кластер\_29  
 кластер\_21  
 кластер\_27

**ФИГ. 19**  
 ПРОДОЛЖЕНИЕ

\*кластер 3 и 8 – больше перфорина и гранзима B и нет экспрессии NKG2A