

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191979** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.11.01

(51) Int. Cl. *A61K 35/12* (2015.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.01.16

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ЛИНИЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ
АНТИГЕНОВ**

(31) **62/793,210; 62/852,573**

(32) **2019.01.16; 2019.05.24**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/013887**

(87) **WO 2020/150478 2020.07.23**

(71) Заявитель:
**ЗЕ ТРАСТИС ОФ КОЛАМБИЯ
ЮНИВЕРСИТИ ИН ЗЕ СИТИ ОФ
НЬЮ-ЙОРК (US)**

(72) Изобретатель:

**Мукхерджи Сиддхартха, Борот
Флоренс, Али Абдулла Махмуд (US)**

(74) Представитель:

**Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.,
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)**

(57) В изобретении раскрыты способы введения агента, нацеливающегося на линиеспецифический антиген клеточной поверхности, например CD33, и популяция гемопоэтических клеток, которые дефектны по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности, например CD33, для иммунотерапии гематологических злокачественных новообразований. Предложены также клетки, содержащие мутации в CD33, как и нРНК, нацеливающиеся на CD33.

A1

202191979

202191979

A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ЛИНИЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ

5 Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/793 210, поданной 16 января 2019 г., и по предварительной заявке на патент США № 62/852 573, поданной 24 мая 2019 г., полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

10 Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронной виде в формате ASCII и, тем самым, в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 16 января 2020 г., называется 01001-004965-WO1_SL.txt и имеет размер 83 килобайта.

15 УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Несмотря на десятилетия попыток, получить лечебную иммунологическую терапию против рака очень сложно, поскольку фундаментальной основой является способность распознавания антигена либо антителами, либо Т-клетками (посредством Т-клеточного рецептора) (Cousin-Frankel, *Science* (2013) 342:1432). Иммунотерапевтические средства на основе антител применяли исключительно против рака в тех случаях, когда целевой антиген повышенно продуцируется в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками (*например*, Her-2 у амплифицирующего Her-2 рака молочной железы), или в случаях, когда опухолевые клетки экспрессируют антиген, который может распознаваться антителом или конъюгатом антитела-токсина (*например*, ритуксимаб против CD20) (Baselga et al., *Annals Oncology* (2001) 12:S35). Поскольку клинические исследования с использованием иммунотерапевтических средств на основе антител показали улучшенную выживаемость пациентов в ограниченном количестве типов раковых заболеваний (обычно при комбинировании со стандартной химиотерапией), эти эффекты часто сопровождаются значительными проблемами с безопасностью и эффективностью (Cousin-Frankel Cancer, *Science* (2013) 342:1432).

С клинической точки зрения еще более сложными для достижения результатов были эффективные Т-клеточные терапии против раковых заболеваний (Schmitt et al., *Hum. Gene Ther.* (2009) 20(11):1240). Эффективная Т-клеточная терапия против рака базируется на Т-клетке с высокой аффинностью связывания, направленной против антигена на раковой клетке. Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-Т-клетки) широко

применяются для распознавания антигенов на клетках и с высокой аффинностью, и специфичностью, и без необходимости во вспомогательных молекулах распознавания, таких как антигены HLA к «презентирующему» пептиду. Т-клеточный рецептор CAR-T-клеток выполняет «обмен» антигенсвязывающих тяжелых и легких цепей, тем самым устраняя потребность во вспомогательных молекулах HLA. Рекомбинантный CAR-T-рецептор сливается с сигнализирующими доменами, приводя к активации Т-клеток при связывании CAR T-рецептора с целевым антигеном.

Клиническое применение CAR-T-клеток было ограничено нацеливанием узкого спектра клеточных поверхностных антигенов, дополнительно подкрепляя необходимость в усовершенствованных и новых подходах в лечении рака. В частности, новые подходы нужны для таких заболеваний, как острый миелоидный лейкоз (AML), при котором исходы для пожилых пациентов, которые неспособны получать интенсивную химиотерапию, существующий стандарт лечения, остаются очень плохими, с медианной выживаемостью всего лишь от 5 до 10 месяцев (Dohner et al., *NEJM* (2015) 373:1136).

В данном документе описаны новые подходы для противораковой иммунотерапии, которая нацелена на определенные классы линиеспецифических антигенов клеточной поверхности на опухолевых клетках. Затем лечение CAR-T-клетками комбинируют с замещением неопухолевых клеток путем инфузии или реинфузии модифицированной популяции клеток, которые дефектны по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности. Рецидив опухоли предотвращается или уменьшается путем сохранения контроля пациента *in vivo* с помощью CAR-T-клеток.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее описание основано, по меньшей мере частично, на открытие того факта, что агенты, содержащие антигенсвязывающий фрагмент, который связывает линиеспецифический антиген клеточной поверхности (*например*, иммунные клетки экспрессирующие химерный рецептор, который нацеливает CD33) избирательно вызывают клеточную гибель клеток, экспрессирующих линиеспецифический антиген клеточной поверхности, тогда как клетки, дефектные по этому антигену (*например*, генетически сконструированные гемопоэтические клетки) избегают клеточной гибели, вызванной этим агентом. На основе таких данных, следует ожидать, что иммунотерапевтические средства, включающие комбинацию агента, нацеливающего линиеспецифический антиген клеточной поверхности, например CAR-T-клетки нацеливающие CD33, и гемопоэтические клетки, дефектные по линиеспецифическим

антигенам клеточной поверхности (*например*, CD33) будут обеспечивать эффективный способ лечения гемопоэтических злокачественных новообразований.

В некоторых аспектах в данном раскрытии предлагается генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация представляет собой сайт, описанный в данном документе. В некоторых аспектах в настоящем раскрытии предлагается генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация представляет собой сайт, нацеливаемый нРНК, который содержит нуклеотидную последовательность AUCCCUGGCACUCUAGAACC (SEQ ID NO: 67), GGCCGGGUUCUAGAGUGCCA (SEQ ID NO: 68), или CCUCACUAGACUUGACCCAC (SEQ ID NO: 70), и при этом генетически сконструированная гемопоэтическая клетка и/или клетка-предшественник, имеют пониженный уровень экспрессии CD33 по сравнению с аналогом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник экспрессирует менее 10% CD33, экспрессируемого аналогом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник не экспрессирует CD33. В некоторых вариантах осуществления изобретения генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник является CD34⁺. В некоторых вариантах осуществления изобретения генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник походит из клеток костного мозга или мононуклеаров периферической крови субъекта (*например*, пациента-человека с гемопоэтическим злокачественным новообразованием или здорового донора).

В данном раскрытии, в некоторых вариантах осуществления изобретения, также предлагается клеточная популяция, содержащая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток и/или клеток-предшественников, описанных в данном документе.

В дополнительном аспекте в настоящем раскрытии предлагается способ получения генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки и/или клетки-предшественника, включающий (i) предоставление гемопоэтической стволовой клетки и/или клетки-предшественника, и (ii) внедрение в клетку (а) направляющей РНК (нРНК), которая содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%

идентична SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 и/или SEQ ID NO: 70, и (b) эндонуклеазы Cas9, тем самым получая генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку и/или клетку-предшественника с пониженным уровнем экспрессии CD33. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК и эндонуклеаза Cas9 кодируются на одном векторе, который внедряют в клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК и эндонуклеаза Cas9 внедряют в клетку в виде предварительно созданного рибонуклеопротеинового комплекса. В некоторых вариантах осуществления изобретения рибонуклеопротеиновый комплекс внедряют в клетку посредством электропорации.

В настоящем раскрытии также предлагается, в некоторых аспектах, применение нРНК, описанной в данном документе, для понижения экспрессии CD33 в образце гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники с использованием системы CRISPR/Cas9.

В настоящем раскрытии также предлагается, в некоторых аспектах, применение системы CRISPR/Cas9 для понижения экспрессии CD33 в образце гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников, причем нРНК системы CRISPR/Cas9 представляет собой нРНК, описанную в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК представляет собой одномолекулярную направляющую РНК (онРНК). В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является модифицированной онРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения стволовая клетка и/или клетка-предшественник является CD34⁺. В некоторых вариантах осуществления изобретения гемопоэтическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник походит из клеток костного мозга или мононуклеаров периферической крови (МНПК) субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект имеет гемопоэтическое нарушение. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект является здоровым HLA-типированным донором.

В данном раскрытии, в некоторых вариантах осуществления изобретения, предлагается генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник, которые получают описанным в данном документе способом.

В другом аспекте в настоящем раскрытии предлагается способ лечения гемопоэтического нарушения, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки и/или клетки-предшественника или клеточной популяции, описанных в данном

документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения гемопоэтическое нарушение представляет собой гемопоэтическое злокачественное новообразование.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно включает введение субъекту эффективного количества агента, который нацеливает CD33, причем агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33. В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, который нацеливает CD33, представляет собой иммунную клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33.

В некоторых аспектах в настоящем раскрытии предлагается генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, описанные в данном документе, или клеточная популяция, описанная в данном документе, для применения в лечении гемопоэтического нарушения, причем лечение включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника или клеточной популяции, и дополнительно включает введение субъекту эффективного количества агента, который нацеливает CD33, причем агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33.

В некоторых аспектах изобретения в настоящем раскрытии предлагается агент, который нацеливает CD33, причем агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33, для применения в лечении гемопоэтического нарушения, причем лечение включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества агента, нацеливающего CD33, и дополнительно включает введение субъекту эффективного количества генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, описанных в данном документе, или клеточной популяции, описанной в данном документе.

Комбинация генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, описанных в данном документе, или клеточной популяции, описанной в данном документе, и агента, который нацеливает CD33, причем агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33, для применения в лечении гемопоэтического нарушения, при этом лечение включает введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника или клеточной популяции, и агента, который связывает CD33.

В некоторых вариантах осуществления изобретения генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественник или

клеточную популяцию вводят параллельно с агентом, который нацеливает CD33. В некоторых вариантах осуществления изобретения генетически сконструированную гемопозитическую стволовую клетку или клетку-предшественник или клеточную популяцию вводят перед агентом, который нацеливает CD33. В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, который нацеливает CD33, вводят перед генетически сконструированной гемопозитической стволовой клеткой или клеткой-предшественником или клеточной популяцией.

В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунные клетки, генетически сконструированная гемопозитическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник, или и та и другая, являются аллогенными. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунные клетки, генетически сконструированная гемопозитическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник, или и та и другая, являются аутологичными. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент в химерном рецепторе представляет собой одноцепочечный фрагмент (scFv) антитела, который специфически связывает CD33 человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой пациента-человека с лимфомой Ходжкина, неходжкинской лимфомой, лейкозом или множественной миеломой. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой пациента-человека с лейкозом, который представляет собой острый миелоидный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфобластный лейкоз.

В данном раскрытии, в другом аспекте, предлагается направляющая рибонуклеиновая кислота (нРНК), содержащая спейсерную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 или SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК представляет собой одномолекулярную нРНК (онРНК). В некоторых вариантах осуществления нРНК является модифицированной. В конкретных примерах спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68 или SEQ ID NO:70.

Особенности композиций и способов в данном документе также описаны в следующих нумерованных вариантах осуществления.

1. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность, выбранную из:

5 ATCCCTGGCACTCTAGAACC (SEQ ID NO: 50),
ATCCCTGGCACTCTAGAACCCGG (SEQ ID NO: 49),
GGCCGGGTTCTAGAGTGCCA (SEQ ID NO: 51),
GGCCGGGTTCTAGAGTGCCAGGG (SEQ ID NO: 29),
CCTCACTAGACTTGACCCAC (SEQ ID NO: 58); или
10 CCTCACTAGACTTGACCCACAGG (SEQ ID NO: 48).

2. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность

15 ATCCCTGGCACTCTAGAACC (SEQ ID NO: 50).

3. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность

20 ATCCCTGGCACTCTAGAACC (SEQ ID NO: 50), при этом генетическая мутация приводит к пониженному уровню экспрессии CD33 по сравнению с аналогичной клеткой дикого типа.

4. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность

25 ATCCCTGGCACTCTAGAACC (SEQ ID NO: 50), при этом генетическая мутация приводит к пониженному уровню экспрессии CD33, который составляет менее 20% уровня CD33 в аналогичной клетке дикого типа.

30

5. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность

35 ATCCCTGGCACTCTAGAACCCGG (SEQ ID NO: 49).

6. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность CCTCACTAGACTTGACCCAC (SEQ ID NO: 58).
- 5
7. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность CCTCACTAGACTTGACCCAC (SEQ ID NO: 58), при этом генетическая мутация
- 10 приводит к пониженному уровню экспрессии CD33 по сравнению с аналогичной клеткой дикого типа.
8. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена
- 15 CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность CCTCACTAGACTTGACCCAC (SEQ ID NO: 58), при этом генетическая мутация приводит к пониженному уровню экспрессии CD33, который составляет менее 20% уровня CD33 в аналогичной клетке дикого типа.
- 20 9. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность CCTCACTAGACTTGACCCACAGG (SEQ ID NO: 48).
- 25 10. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация представляет собой сайт, нацеливаемый нРНК, который содержит нуклеотидную последовательность AUCCCUGGCACUCUAGAACC (SEQ ID NO: 67) или CCUCACUAGACUUGACCCAC (SEQ ID NO: 70), и при этом
- 30 генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник имеет пониженный уровень экспрессии CD33 по сравнению с аналогом дикого типа.
- 35 11. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена

CD33, причем генетическая мутация представляет собой сайт, нацеливаемый нРНК, который содержит нуклеотидную последовательность CCUCACUAGACUUGACCCAC (SEQ ID NO: 70).

5 12. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация представляет собой сайт, нацеливаемый нРНК, который содержит нуклеотидную последовательность AUCCUGGCACUCUAGAACC (SEQ ID NO: 67).

10

13. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из предшествующих вариантов осуществления, которая не содержит мутацию в любом предполагаемом нецелевом сайте, например в любом сайте, из перечисленных на Фиг. 30, например в любой из SEQ ID NO: 99-112.

15

14. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из предшествующих вариантов осуществления, которая не содержит мутацию в любом предполагаемом нецелевом сайте, из перечисленных на Фиг. 29, например в любой из SEQ ID NO: 79-98.

20

15. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая мутация представляет собой замену (например, однонуклеотидным вариантом), вставку или делецию, или их комбинацию.

25

16. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по варианту осуществления 15, в которой делеция полностью находится в пределах SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 58.

30

17. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по варианту осуществления 15 или 16, в которой делеция составляет в длину 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, или 17 нуклеотидов.

18. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по варианту осуществления 15, в которой делеция выходит за пределы SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 58.
- 5 19. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая мутация приводит к сдвигу рамки.
- 10 20. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая мутация приводит к пониженному уровню экспрессии CD33 дикого типа по сравнению с аналогичной клеткой дикого типа (например, менее 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10% или 5% уровня аналогичной клетки дикого типа).
- 15 21. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник имеет пониженный уровень CD33 дикого типа по сравнению с аналогичной клеткой дикого типа (например, менее 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10% или 20 5% уровня аналогичной клетки дикого типа).
22. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая мутация приводит к пониженному уровню экспрессии CD33 по сравнению с 25 аналогичной клеткой дикого типа (например, менее 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10% или 5% уровня аналогичной клетки дикого типа).
- 30 23. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник имеет пониженный уровень CD33 по сравнению с аналогичной клеткой дикого типа (например, менее 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10% или 5% уровня аналогичной клетки дикого типа).

24. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая мутация приводит к сдвигу отсутствию экспрессии CD33.
- 5 25. В некоторых вариантах осуществления изобретения генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из предыдущих вариантов осуществления, которая экспрессирует менее 20% CD33, экспрессируемого аналогом дикого типа.
- 10 26. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем пониженный уровень экспрессии CD33 отмечается в клетке, дифференцированной из (например, терминально дифференцированной из) гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, и аналогичная клетка дикого типа является клеткой,
15 дифференцированной из (например, терминально дифференцированной из) гемопоэтической клетки дикого типа или клетки-предшественника.
27. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по варианту осуществления 26, причем клетка, дифференцированная из
20 гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, представляет собой миелобласт, монобласт, моноцит, макрофаг или естественную клетку-киллер.
28. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из предыдущих вариантов осуществления, которая не
25 экспрессирует CD33.
29. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из предыдущих вариантов осуществления, которая является CD34+.
30
30. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из предыдущих вариантов осуществления, которая получена из клеток костного мозга или мононуклеаров периферической крови субъекта.

31. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по варианту осуществления 30, причем субъект представляет собой пациента-человека с гемопоэтическим злокачественным новообразованием.
- 5 32. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по варианту осуществления 30, в которой субъект представляет собой здорового человека-донора (например, HLA-типированным донором).
- 10 33. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из предыдущих вариантов осуществления, которая получена способом, включающим приведение в контакт эндогенного гена CD33 с нуклеазой, выбранной из эндонуклеазы CRISPR, цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN), подобной активатору транскрипции эффекторной нуклеазы (TALEN) или мегануклеазы (например, путем приведения в контакт клетки с нуклеазой или нуклеиновой кислотой, кодирующей
- 15 такую нуклеазу).
34. Клеточная популяция, содержащая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников по любому из предыдущих вариантов осуществления (например, включающих гемопоэтические
- 20 стволовые клетки, гемопоэтические клетки-предшественники или их комбинацию).
35. Клеточная популяция, содержащая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников по любому из предыдущих вариантов осуществления, которая содержит генетическую мутацию в экзоне
- 25 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность ATCCCTGGCACTCTAGAACC (SEQ ID NO: 50).
36. Клеточная популяция, содержащая множество генетически сконструированных гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников по любому из
- 30 предыдущих вариантов осуществления, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность ATCCCTGGCACTCTAGAACC (SEQ ID NO: 50), при этом генетическая мутация приводит к пониженному уровню экспрессии CD33 по сравнению с аналогичной клеточной популяцией дикого типа.

37. Клеточная популяция, содержащая множество генетически сконструированных гемопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников по любому из предыдущих вариантов осуществления, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность ATCCCTGGCACTCTAGAACC (SEQ ID NO: 50), при этом генетическая мутация приводит к пониженному уровню экспрессии CD33, который составляет менее 20% уровня CD33 в аналогичной клеточной популяции дикого типа.
38. Клеточная популяция, содержащая множество генетически сконструированных гемопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников по любому из предыдущих вариантов осуществления, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность CCTCACTAGACTTGACCCAC (SEQ ID NO: 58).
39. Клеточная популяция, содержащая множество генетически сконструированных гемопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников по любому из предыдущих вариантов осуществления, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность CCTCACTAGACTTGACCCAC (SEQ ID NO: 58), при этом генетическая мутация приводит к пониженному уровню экспрессии CD33 по сравнению с аналогичной клеточной популяцией дикого типа.
40. Клеточная популяция, содержащая множество генетически сконструированных гемопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников по любому из предыдущих вариантов осуществления, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность CCTCACTAGACTTGACCCAC (SEQ ID NO: 58), при этом генетическая мутация приводит к пониженному уровню экспрессии CD33, который составляет менее 20% уровня CD33 в аналогичной клеточной популяции дикого типа.
41. Клеточная популяция по любому из вариантов осуществления 34-40, которая дополнительно содержит одну или более клеток, которые включают в себя один или более несконструированных генов CD33.

42. Клеточная популяция по любому из вариантов осуществления 34-41, которая дополнительно содержит одну или более клеток, которые гомозиготны по дикому типу по отношению к CD33.
- 5 43. Клеточная популяция по любому из вариантов осуществления 34-42, которая дополнительно содержит одну или более клеток, которые гетерозиготны по дикому типу по отношению к CD33.
- 10 44. Клеточная популяция по любому из вариантов осуществления 34-43, причем по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95% клеток в популяции включают в себя генетические мутации в двух копиях CD33.
- 15 45. Клеточная популяция по любому из вариантов осуществления 34-44, которая экспрессирует менее 20% CD33, экспрессируемого аналогичной клеточной популяцией дикого типа.
- 20 46. Клеточная популяция по любому из вариантов осуществления 34-45, причем пониженный уровень экспрессии CD33 отмечается в клетке, дифференцированной из (например, терминально дифференцированной из) гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, и аналогичная клетка дикого типа является клеткой, дифференцированной из (например, терминально дифференцированной из) гемопоэтической клетки дикого типа или клетки-предшественника.
- 25 47. Клеточная популяция по варианту осуществления 46, причем клетка, дифференцированная из гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, представляет собой миелобласт, монобласт, моноцит, макрофаг или естественную клетку-киллер.
- 30 48. Клеточная популяция по любому из вариантов осуществления 34-47, которая содержит гемопоэтические стволовые клетки и гемопоэтические клетки-предшественники.
- 35 49. Фармацевтическая композиция, содержащая генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественник по любому из вариантов осуществления 1-33.

50. Фармацевтическая композиция, содержащая клеточную популяцию по любому из вариантов осуществления 34-48.
- 5 51. Способ получения генетически сконструированной гемопоэтической клетки или клетки-предшественника по любому из вариантов осуществления 1-33 или клеточной популяции по любому из вариантов осуществления 34-48, который включает:
- 10 (i) предоставление гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника (например, гемопоэтической стволовой клетки дикого типа или клетки-предшественника), и
- (ii) введение в клетку нуклеазы (например, эндонуклеазы), которая расщепляет определенный сайт,
- тем самым получая генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественник.
- 15 52. Способ по варианту осуществления 51, в котором (ii) включает внедрение в клетку нРНК, которая связывает определенный сайт, и эндонуклеазу, которая связывает данную нРНК.
- 20 53. Способ по варианту осуществления 51, в котором эндонуклеаза представляет собой ZFN, TALEN или мегануклеазу.
54. Направляющая рибонуклеиновая кислота (нРНК), содержащая последовательность любой из:
- 25 AUCCCUGGCACUCUAGAACC (SEQ ID NO: 67),
GGCCGGGUUCUAGAGUGCCA (SEQ ID NO: 68) или
CCUCACUAGACUUGACCCAC (SEQ ID NO: 70),
или обратную комплементарную ей, или последовательность с по меньшей мере 90% или 95% идентичностью к любой из предыдущих, или последовательность с не более 1, 2 или
- 30 3 мутациями относительно любой из предыдущих.
55. Направляющая рибонуклеиновая кислота (нРНК), содержащая спейсерную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:70.

56. нРНК по варианту осуществления 55, в которой спейсерная последовательность включает SEQ ID NO:70.
57. Направляющая рибонуклеиновая кислота (нРНК), содержащая спейсерную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:67.
58. нРНК по варианту осуществления 57, в которой спейсерная последовательность включает SEQ ID NO:67.
59. Направляющая рибонуклеиновая кислота (нРНК), содержащая по меньшей мере 18 (например, 19, 20, 21 или 22) последовательных нуклеотидов из любой последовательности из:
CCUCAUCCCUGGCACUCUAGAACCCGGC (SEQ ID NO: 71),
GAGUGGCCGGGUUCUAGAGUGCCAGGGA (SEQ ID NO: 72) или
UUCUCCUCACUAGACUUGACCCACAGGC (SEQ ID NO: 73),
или обратную комплементарную ей, или последовательность с по меньшей мере 90% или 95% идентичностью к любой из предыдущих, или последовательность с не более 1, 2 или 3 мутациями относительно любой из предыдущих.
60. нРНК по варианту осуществления 59, в которой по меньшей мере 18, 19, 20, 21 или 22 последовательных нуклеотида начинаются с положения 1 указанной последовательности.
61. нРНК по варианту осуществления 59, в которой по меньшей мере 18, 19, 20, 21 или 22 последовательных нуклеотида начинаются с положения 2 указанной последовательности.
62. нРНК по варианту осуществления 59, в которой по меньшей мере 18, 19, 20, 21 или 22 последовательных нуклеотида начинаются с положения 3 указанной последовательности.
63. нРНК по варианту осуществления 59, в которой по меньшей мере 18, 19, 20, 21 или 22 последовательных нуклеотида начинаются с положения 4 указанной последовательности.

64. нРНК по варианту осуществления 59, в которой по меньшей мере 18, 19, 20, 21 или 22 последовательных нуклеотида начинаются с положения 5 указанной последовательности.
- 5 65. нРНК по варианту осуществления 59, в которой по меньшей мере 18, 19, 20, 21 или 22 последовательных нуклеотида начинаются с положения 6 указанной последовательности.
66. нРНК по варианту осуществления 59, в которой по меньшей мере 18, 19, 20, 21 или 10 22 последовательных нуклеотида начинаются с положения 7 указанной последовательности.
67. нРНК по варианту осуществления 59, в которой по меньшей мере 18, 19, 20 или 21 15 последовательных нуклеотид начинается с положения 8 указанной последовательности.
68. нРНК по варианту осуществления 59, в которой по меньшей мере 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов начинаются с положения 9 указанной последовательности.
- 20 69. нРНК по любому из вариантов осуществления 54 или 59-68, в которой 2 мутации не являются смежными друг другу.
70. нРНК по любому из вариантов осуществления 54 или 59-68, в которой 3 мутации не являются смежными друг другу.
- 25 71. нРНК по любому из вариантов осуществления 54 или 59-70, в которой 1, 2 или 3 мутации являются заменами.
72. нРНК по любому из вариантов осуществления 54 или 59-70, в которой одна или 30 более мутаций представляет собой вставку или делецию.
73. нРНК по любому из вариантов осуществления 54-72, причем спейсерная последовательность составляет в длину около 18-23, например 20 нуклеотидов.

74. нРНК по любому из вариантов осуществления 54-73, в которой спейсерная последовательность имеет содержание GC равное 45%-65% или 50-60%, например 55%.
75. нРНК по любому из вариантов осуществления 54-74, которая содержит одну или более химических модификаций (например, химическую модификацию по нуклеотидному основанию, углеводу или части скелета).
76. нРНК по любому из вариантов осуществления 54-75, которая содержит один или более 2'-О-метил нуклеотидов, например в положении, описанном в данном документе.
77. нРНК по любому из вариантов осуществления 54-76, которая содержит одну или более тиофосфатных или тиоРАСЕ-связей, например в положении, описанном в данном документе.
78. нРНК по любому из вариантов осуществления 54-77, которая представляет собой одномолекулярную нРНК (онРНК).
79. нРНК по любому из вариантов осуществления 54-78, которая связывает Cas9.
80. нРНК по любому из вариантов осуществления 54-79, которая связывает tracrнРНК.
81. нРНК по любому из вариантов осуществления 54-79, которая содержит каркасную последовательность.
82. Набор или композиция, содержащие:
а) нРНК по любому из вариантов осуществления 54-81 или нуклеиновую кислоту, кодирующую такую нРНК, и
б) вторую нРНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую вторую нРНК.
83. Набор или композиция по варианту осуществления 82, в которых нРНК (а) содержит спейсерную последовательность CCUCACUAGACUUGACCCAC (SEQ ID NO:70).

84. Набор или композиция по варианту осуществления 82, в которых нРНК (а) содержит спейсерную последовательность AUCCCUGGCACUCUAGAACC (SEQ ID NO:67).
- 5 85. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 82-84, в которых вторая нРНК нацеливает линиеспецифический антиген клеточной поверхности.
86. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 82-85, в которых вторая нРНК нацеливает линиеспецифический антиген клеточной поверхности, отличный
10 от CD33.
87. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 82-86, в которых вторая нРНК нацеливает CLL-1.
- 15 88. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 82-87, в которых вторая нРНК нацеливает спейсерную последовательность
GUUGUAGAGAAUAUUUCUC (SEQ ID NO: 115), GGAGAGGUUCCUGAUCUUGU
(SEQ ID NO: 116) или UGAAUAUCUCCAACAAGAUC (SEQ ID NO: 119).
- 20 89. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 82-88, в которых нРНК (а) содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 70 и вторая нРНК содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 115.
90. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 82-88, в которых
25 нРНК (а) содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 70, и вторая нРНК содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 116.
91. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 82-88, в которых нРНК (а) содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 67, и
30 вторая нРНК содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 115.
92. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 82-88, в которых нРНК (а) содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 67, и вторая нРНК содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 116.

93. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 82-88, в которых нРНК (а) содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 67, и вторая нРНК содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 70.
- 5 94. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 82-88, в которых нРНК (а) содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 115 и вторая нРНК содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 116.
- 10 95. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 82-94, которые дополнительно содержат третью нРНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую третью нРНК.
- 15 96. Набор или композиция по варианту осуществления 95, в которых третья нРНК нацеливает линиеспецифический антиген клеточной поверхности.
97. Набор или композиция по варианту осуществления 95, в которых третья нРНК нацеливает CD33 или CLL-1.
- 20 98. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 95-97, в которых нРНК (а) содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 70, вторая нРНК содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 115, и третья нРНК содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 116.
- 25 99. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 95-97, в которых нРНК (а) содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 67, вторая нРНК содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 115, и третья нРНК содержит спейсерную последовательность SEQ ID NO: 116.
- 30 100. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 95-97, в которых нРНК (а) содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 67, вторая нРНК содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 70, и третья нРНК содержит спейсерную последовательность SEQ ID NO: 116.

101. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 95-97, в которых нРНК (а) содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 67, вторая нРНК содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 70, и третья нРНК содержит спейсерную последовательность SEQ ID NO: 115.

5

102. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 95-101, которые дополнительно содержат четвертую нРНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую четвертую нРНК.

10 103. Набор или композиция по варианту осуществления 102, в которых четвертая нРНК нацеливает линиеспецифический антиген клеточной поверхности.

104. Набор или композиция по варианту осуществления 102, в которых четвертая нРНК нацеливает CD33 или CLL-1.

15 105. Набор или композиция по варианту осуществления 102, в которых нРНК (а) содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 67, вторая нРНК содержит спейсерную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 70, третья нРНК содержит спейсерную последовательность SEQ ID NO: 115, и четвертая нРНК содержит спейсерную последовательность SEQ ID NO: 116.

20

106. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 102-105, в которых смешаны нРНК (а), вторая нРНК, третья нРНК и четвертая нРНК.

25 107. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 102-105, в которых в отдельных контейнерах находятся нРНК (а), вторая нРНК, третья нРНК и четвертая нРНК.

108. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 82-105, в которых смешаны (а) и (b).

30

109. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 82-105, в которых в отдельных контейнерах находятся (а) и (b).

110. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 82-109, в которых нуклеиновая кислота (a) и нуклеиновая кислота (b) являются частью одной и той же нуклеиновой кислоты.
- 5 111. Набор или композиция по любому из вариантов осуществления 82-109, в которых нуклеиновая кислота (a) и нуклеиновая кислота (b) являются отдельными нуклеиновыми кислотами.
- 10 112. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник), которая содержит одну или более (например, 2, 3 или все):
- (a) генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность ATCCCTGGCACTCTAGAACC (SEQ ID NO: 50);
- 15 (b) генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация находится в сайте, имеющем последовательность CCTCACTAGACTTGACCCAC (SEQ ID NO: 58).
- (c) генетическую мутацию в CLL-1 в сайте, имеющем последовательность GTTGTAGAGAAATATTTCTC (SEQ ID NO: 117)
- 20 (c) генетическую мутацию в CLL-1 в сайте, имеющем последовательность GGAGAGGTTCCCTGATCTTGT (SEQ ID NO: 118).
113. Гемопоэтическая клетка варианта осуществления 112, которая содержит (a) и (b).
- 25 114. Гемопоэтическая клетка по варианту осуществления 112, которая содержит (a) и (c).
115. Гемопоэтическая клетка по варианту осуществления 112, которая содержит (a) и (d).
- 30 116. Гемопоэтическая клетка по варианту осуществления 112, которая содержит (b) и (c).
117. Гемопоэтическая клетка по варианту осуществления 112, которая содержит (b) и (d).
- 35

118. Гемопозитическая клетка по варианту осуществления 112, которая содержит (c) и (d).
- 5 119. Гемопозитическая клетка по варианту осуществления 112, которая содержит (a), (b) и (c).
120. Гемопозитическая клетка по варианту осуществления 112, которая содержит (a), (b) и (d).
- 10 121. Гемопозитическая клетка по варианту осуществления 112, которая содержит (a), (c) и (d).
122. Гемопозитическая клетка по варианту осуществления 112, которая содержит (b), (c) и (d).
- 15 123. Гемопозитическая клетка по варианту осуществления 112, которая содержит (a), (b), (c) и (d).
- 20 124. Гемопозитическая клетка по любому из вариантов осуществления 112-123, которая содержит делецию, проходящую от положения в пределах SEQ ID NO: 50 до положения в пределах SEQ ID NO: 58.
125. Гемопозитическая клетка по любому из вариантов осуществления 112-124, которая содержит делецию, проходящую от положения в пределах SEQ ID NO: 117 до положения в пределах SEQ ID NO: 118.
- 25 126. Применение нРНК по любому из вариантов осуществления 54-81 или композиция или набор по любому из вариантов осуществления 82-111 для понижения экспрессии CD33 в образце гемопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников с использованием системы CRISPR/Cas9.
- 30 127. Применение системы CRISPR/Cas9 для понижения экспрессии CD33 в образце гемопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников, в котором нРНК

системы CRISPR/Cas9 представляет собой нРНК по любому из вариантов осуществления 54-81 или нРНК композиции или набора по любому из вариантов осуществления 82-111.

5 128. Способ получения генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, включающий:

(i) предоставление гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника (например, гемопоэтической стволовой клетки дикого типа или клетки-предшественника), и

10 (ii) внедрение в клетку (а) направляющей РНК (нРНК) по любому из вариантов осуществления 22-39 или нРНК из композиции или набора по любому из вариантов осуществления 82-111; и (b) нуклеазы (например, эндонуклеазы), которая связывает нРНК (например, эндонуклеазы Cas9),

тем самым получая генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественник.

15

129. Способ получения генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, включающий:

(i) предоставление генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки и/или клетки-предшественника, и

20 (ii) внедрение в клетку (а) направляющей РНК (нРНК), которая содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 70, и (b) эндонуклеазы Cas9, тем самым получая генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку и/или клетку-предшественника с пониженным уровнем экспрессии CD33.

25

130. Способ получения генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, включающий:

(i) предоставление гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, и

30 (ii) внедрение в клетку (а) направляющей РНК (нРНК), которая содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 70; и (b) эндонуклеазы Cas9, тем самым получая генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественника.

131. Способ получения генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника с пониженным уровнем экспрессии CD33, включающий:

(i) предоставление гемопоэтической стволовой клетки или клетки-

5 предшественника, и

(ii) внедрение в клетку (а) направляющей РНК (нРНК), которая содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 70; и (b) эндонуклеазы Cas9, тем самым получая генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественника с

10 пониженным уровнем экспрессии CD33.

132. Способ получения генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, включающий:

(i) предоставление гемопоэтической стволовой клетки или клетки-

15 предшественника, и

(ii) внедрение в клетку (а) направляющей РНК (нРНК), которая содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 67; и (b) эндонуклеазы Cas9, тем самым получая генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественника.

20

133. Способ получения генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, включающий:

(i) предоставление гемопоэтической стволовой клетки или клетки-

предшественника, и

25 (ii) внедрение в клетку (а) направляющей РНК (нРНК), которая содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 70; и (b) эндонуклеазы Cas9, тем самым получая генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественника.

30 134. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 51-53 или 126-133, которые приводят к генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетке или клетке-предшественнику с пониженным уровнем экспрессии CD33 по сравнению с аналогичной клеткой дикого типа.

135. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 51-53 или 126-134, которые приводят к генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетке или клетке-предшественнику с пониженным уровнем экспрессии CD33, который составляет менее 20% уровня CD33 в аналогичной клетке дикого типа.
- 5
136. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 51-53 или 126-135, которые выполнены на множестве гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников.
- 10
137. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 51-53 или 126-136, которые выполнены на клеточной популяции, содержащей множество гемопоэтических стволовых клеток и множество гемопоэтических клеток-предшественников.
- 15
138. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 51-53 или 126-137, которые приводят к получению клеточной популяции в соответствии с любым из вариантов осуществления 34-48.
- 20
139. Способ по любому из вариантов осуществления 128-138, в котором нуклеиновые кислоты (a) и (b) кодируются на одном векторе, который внедряют в клетку.
140. Способ по варианту осуществления 139, в котором вектор представляет собой вирусный вектор.
- 25
141. Способ по варианту осуществления 139, в котором (a) и (b) внедряют в клетку в виде предварительно созданного рибонуклеопротеинового комплекса.
- 30
142. Способ по варианту осуществления 141, в котором рибонуклеопротеиновый комплекс внедряют в клетку посредством электропорации.
143. Способ по любому из вариантов осуществления 128-142, в котором эндонуклеазу (например, эндонуклеазу Cas9) внедряют в клетку путем доставки в клетку молекулы нуклеиновой кислоты (например, молекулы мРНК), кодирующей эндонуклеазу Cas9.

144. Способ по любому из вариантов осуществления 128-143, в котором нРНК представляет собой одномолекулярную направляющую РНК (онРНК).
145. Способ по любому из вариантов осуществления 128-144, в котором нРНК
5 представляет собой модифицированную онРНК.
146. Способ по любому из вариантов осуществления 128-145, в котором нРНК представляет собой химически модифицированную онРНК.
- 10 147. Способ по любому из вариантов осуществления 128-146, в котором гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник представляет собой CD34+.
148. Способ по любому из вариантов осуществления 128-147, в котором
15 гемопоэтическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник походит из клеток костного мозга или мононуклеаров периферической крови (МНПК) субъекта.
149. Способ по варианту осуществления 148, в котором субъект имеет гемопоэтическое
20 нарушение.
150. Способ по варианту осуществления 148, в котором субъект представляет собой
здорового донора.
151. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 51-53 или 126-
25 150, которые приводят к мутации, которая вызывает пониженный уровень экспрессии CD33 по сравнению с аналогичной клеткой дикого типа.
152. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 51-53 или 126-
30 151, которые приводят к мутации, которая вызывает пониженный уровень экспрессии CD33 дикого типа по сравнению с аналогичной клеткой дикого типа.
153. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 51-53 или 126-
35 152, которые создают генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественник с пониженным уровнем экспрессии CD33 по сравнению с аналогичной клеткой дикого типа.

154. Способ или применение по любому из вариантов осуществления 51-53 или 126-153, которые создают генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественник с пониженным уровнем экспрессии CD33 дикого типа по сравнению с аналогичной клеткой дикого типа.
155. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, которая получена способом или применением по любому из вариантов осуществления 51-53 или 126-154.
156. Способ лечения гемопоэтического нарушения, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника по любому из вариантов осуществления 1-33, или клеточной популяции по любому из вариантов осуществления 34-48, или гемопоэтической клетки по любому из вариантов осуществления 112-125.
157. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из вариантов осуществления 1-33, клеточная популяция по любому из вариантов осуществления 34-38 или гемопоэтическая клетка по любому из вариантов осуществления 112-125, для применения в лечении гемопоэтического нарушения, причем лечение включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника или клеточной популяции, и дополнительно включает введение субъекту эффективного количества агента, который нацеливает CD33, причем агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33.
158. Агент, который нацеливает CD33, причем агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33, для применения в лечении гемопоэтического нарушения, причем лечение включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества агента, который нацеливает CD33, и дополнительно включает введение пациенту эффективного количества генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника по любому из вариантов осуществления 1-33, клеточной популяции по любому из вариантов осуществления 34-38 или гемопоэтической клетки по любому из вариантов осуществления 112-125.

159. Комбинация генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника по любому из вариантов осуществления 1-33, клеточная популяция по любому из вариантов осуществления 34-38 или гемопоэтической клетки по
5 любому из вариантов осуществления 112-125, и агента, который нацеливает CD33, причем агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33, для применения в лечении гемопоэтического нарушения, при этом лечение включает введение
10 нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника или клеточной популяции, и агента, который связывает CD33.

160. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из вариантов осуществления 1-33, клеточная популяция по
15 любому из вариантов осуществления 34-38 или гемопоэтическая клетка по любому из вариантов осуществления 112-125 для применения в противораковой иммунотерапии.

161. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из вариантов осуществления 1-33, клеточная популяция по
20 любому из вариантов осуществления 34-38 или гемопоэтическая клетка по любому из вариантов осуществления 112-125 для применения в противораковой иммунотерапии, причем пациент имеет гемопоэтическое нарушение.

162. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из вариантов осуществления 1-33, клеточная популяция по
25 любому из вариантов осуществления 34-38 или гемопоэтическая клетка по любому из вариантов осуществления 112-125 для применения в восстановлении гемопоэтической популяции у пациента с гемопоэтическим нарушением.

163. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из вариантов осуществления 1-33, клеточная популяция по
30 любому из вариантов осуществления 34-38 или гемопоэтическая клетка по любому из вариантов осуществления 112-125 для применения в способе лечения гемопоэтического нарушения, тем самым генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, описанная в данном документе, или клеточная популяция,
35 описанная в данном документе, восстанавливает популяцию у пациента.

164. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из вариантов осуществления 1-33, клеточная популяция по любому из вариантов осуществления 34-38 или гемопоэтическая клетка по любому из вариантов осуществления 112-125 для применения в снижении цитотоксических эффектов агента, который нацеливает CD33 в иммунотерапии.
165. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из вариантов осуществления 1-33, клеточная популяция по любому из вариантов осуществления 34-38 или гемопоэтическая клетка по любому из вариантов осуществления 112-125 для применения в способе иммунотерапии с использованием агента, который нацеливает CD33, тем самым генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, описанная в данном документе, или клеточная популяция, описанная в данном документе, снижает цитотоксические эффекты агента, который нацеливает CD33.
166. Способ, клетка, агент или комбинация по любому из вариантов осуществления 156-165, в которых генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественник или клеточную популяцию вводят параллельно с агентом, который нацеливает CD33.
167. Способ, клетка, агент или комбинация по любому из вариантов осуществления 156-165, в которых генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественник или клеточную популяцию вводят перед агентом, который нацеливает CD33.
168. Способ, клетка, агент или комбинация по любому из вариантов осуществления 156-165, в которых агент, который нацеливает CD33, вводят перед генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клеткой или клеткой-предшественником или клеточной популяцией.
169. Способ, клетка, агент, применение или комбинация по любому из вариантов осуществления 156-168, в которых гемопоэтическое нарушение представляет собой гемопоэтическое злокачественное новообразование.

170. Способ, клетка, агент, применение или комбинация по любому из вариантов осуществления 156-169, дополнительно включающие введение субъекту эффективного количества агента, который нацеливает CD33, причем агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33.

5

171. Способ, клетка, агент, применение или комбинация по варианту осуществления 170, в которых агент, который нацеливает CD33, представляет собой иммунную клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33.

10

172. Способ, клетка, агент, применение или комбинация по варианту осуществления 171, в которых иммунная клетка представляет собой Т-клетку.

173. Способ, клетка, агент, применение или комбинация по любому из вариантов осуществления 170-172, в которых иммунные клетки, генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник, или и та и другая, являются аллогенными.

15

174. Способ, клетка, агент, применение или комбинация по вариантам осуществления 170-173, в которых иммунные клетки, генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник, или и та и другая, являются аутологичными.

20

175. Способ, клетка, агент, применение или комбинация по вариантам осуществления 170-174, в которых антигенсвязывающий фрагмент в химерном рецепторе представляет собой одноцепочечный фрагмент (scFv) антитела, который специфически связывает CD33 человека.

25

176. Способ, клетка, агент, применение или комбинация по любому из вариантов осуществления 170-175, в которых субъект представляет собой пациента-человека с лимфомой Ходжкина, неходжкинской лимфомой, лейкозом или множественной миеломой.

30

177. Способ, клетка, агент, применение или комбинация по варианту осуществления 176, в которых субъект представляет собой пациента-человека с лейкозом, который

35

представляет собой острый миелоидный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфобластный лейкоз.

5 Подробности одного или более вариантов осуществления данного изобретения изложены в описании ниже. Другие признаки или преимущества настоящего изобретения будут очевидны из подробного описания нескольких вариантов осуществления, а также из приложенной формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

10 Следующие графические материалы составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения, которые можно лучше понять, обратившись к одному или более из этих графических материалов в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в данном документе.

15 **На ФИГ. 1** представлен пример иллюстрации линиеспецифических антигенов типа 0, типа 1, типа 2 и типа 3.

На ФИГ. 2 представлена схема, показывающая экспрессию иммунной клеткой химерного рецептора, который нацеливается на линиеспецифический антиген клеточной поверхности типа 0, CD307. Клетки множественной миеломы (ММ), экспрессирующие CD307, а также другие клетки, экспрессирующие CD307, такие как плазмоциты, являются мишенями для иммунных клеток, экспрессирующих химерные рецепторы против CD307.

На ФИГ. 3 представлена схема, показывающая экспрессию иммунной клеткой химерного рецептора, который нацеливается на линиеспецифический антиген клеточной поверхности типа 2, CD33. Клетки острого миелоидного лейкоза (AML), экспрессирующие CD33. Гемопоэтические стволовые клетки человека (HSC), генетически конструируют дефектными по CD33, и поэтому они не распознаются иммунными клетками, экспрессирующими химерный рецептор против CD33. HSC способны приводить к образованию миелоидных клеток.

На ФИГ. 4 представлена схема, показывающая редактирование генома с использованием системы CRISPR/Cas. онРНК гибридизируется с частью экзона линиеспецифического антигена клеточной поверхности, и эндонуклеаза Cas9 расщепляет последовательность (5'-NGG-3') перед примыкающим к протоспейсеру мотивом (PAM). Последовательности сверху вниз соответствуют SEQ ID NO: 45 и 46.

На ФИГ. 5 представлена схема, показывающая стратегию редактирования генома с использованием системы CRISPR/Cas9 для разрушения CD33. Вектор PX458,

кодирующий белок Cas9 и направляющую РНК, нацеливающую CD33, нуклеофицировали в клетки К-562, линия лейкозных клеток человека. Проводили проточную цитометрию на клеточной популяции с использованием антитела против CD33 до (верхний график) и после (нижний график) доставки Cas9 и направляющей РНК в клетки. Редактирование генома привело к удалению кодирующей области гена и значительному снижению по CD33 на поверхности клеток.

На ФИГ. 6 представлена схема, показывающая стратегию редактирования генома с использованием системы CRISPR/Cas9 для разрушения CD45RA. Вектор PX458, кодирующий белок Cas9 и направляющую РНК, нацеливающую CD45RA, нуклеофицировали в ретикулярные клетки Т1В-67 саркомы мыши, подобные клеткам-макрофагам. Проводили проточную цитометрию на клеточной популяции с использованием антитела против CD45RA до (верхний график) и после (нижний график) доставки Cas9 и направляющей РНК в клетки. Редактирование генома привело к удалению кодирующей области гена и значительному снижению по CD45RA на поверхности клеток.

На ФИГ. 7А–7D показаны схемы примеров химерных рецепторов, содержащих антигенсвязывающие фрагменты, которые нацеливают CD33. Фиг. 7А характерный химерный рецептор, нацеливающий CD33, содержит scFv против CD33, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен. Фиг. 7В: химерный рецептор, нацеливающий CD33, содержит scFv против CD33, шарнирный домен из CD8, трансмембранный домен из CD8 и внутриклеточные домены из CD28 и CD3 ζ . Фиг. 7С: химерный рецептор, нацеливающий CD33, содержит scFv против CD33, шарнирный домен из CD8, трансмембранный домен из CD8 и внутриклеточные домены из ICOS (или CD27, 4-1BB, или OX-40) и CD3 ζ . Фиг. 7D: химерный рецептор, нацеливающий CD33, содержит scFv против CD33, шарнирный домен из CD8, трансмембранный домен из CD8 и внутриклеточные домены из OX40, CD28 и CD3 ζ .

На ФИГ. 8 представлена схема иммунотоксина.

На ФИГ. 9А–9В показана экспрессия химерных рецепторов против CD33 в клетках К562, трансдуцированных пустым вектором или вектором, кодирующим химерный рецептор против CD33. Фиг. 9А: вестерн-блот с использованием первичного антитела, которое распознает CD3 ζ . В таблице представлена оценочная молекулярная масса каждого из тестированных химерных рецепторов. Фиг. 9В: проточный цитометрический анализ, показывающий увеличение в популяции клеток, которые окрашиваются положительно на химерный рецептор против CD33.

На ФИГ. 10А–10С показаны химерные рецепторы против CD33, связывающиеся с CD33. Фиг. 10А: гель с белками, окрашенный Ронсеау. Дорожки 1, 3, 5: молекула CD33. Дорожки 2, 4, 6: мол. CD33 + конъюгат APC. Фиг. 10В: вестерн-блот с использованием первичного антитела, которое распознает CD33 ζ . Дорожки 1, 3 и 5 содержат химерные рецепторы совместно инкубируемые с молекулами CD33, а дорожки 2, 4 и 6 содержат химерные рецепторы совместно инкубируемые с конъюгатом CD33-APC. Фиг. 10С: проточный цитометрический анализ, показывающий увеличение в популяции клеток, которые экспрессируют химерные рецептор против CD33 и связывают CD33.

На ФИГ. 11А–11В показана цитотоксичность для клеток K562, создаваемая клетками NK92, экспрессирующими указанные химерные рецепторы. Фиг. 11А: CART1 и CART2 по сравнению с пустым вектором HIVzsG. Фиг. 11В: CART3 по сравнению с пустым вектором HIVzsG.

На ФИГ. 12А–12В показана цитотоксичность (выраженная как процент цитотоксичности на у-оси) для клеток K562, дефектных по CD33, создаваемая клетками NK92, экспрессирующими указанные химерные рецепторы. Фиг. 12А: несортированная популяция клеток K562 предварительно обработанная CD33-нацеливающими реагентами CRISPR/Cas. Фиг. 12В: одиночные клоны клеток K562, дефектных по CD33. Колонки слева направо соответствуют пустому вектору HIVzsG, CART1, CART2 и CART3.

На ФИГ. 13А–13В показан проточный цитометрический анализ первичных Т-клеточных популяций. Фиг. 13А: сортировка клеток на основе экспрессии Т-клеточных маркеров C4⁺, CD8⁺, или обоих CD4⁺CD8⁺. Фиг. 13В: относительная экспрессия CD33 на указанных популяциях первичных Т-клеток.

На ФИГ. 14А–14В показана цитотоксичность для клеток K562, создаваемая первичными Т-клетками, экспрессирующими указанные химерные рецепторы. Фиг. 14А: CD4⁺ Т-клетки. Фиг. 14В: CD4⁺/CD8⁺ (CD 4/8) и CD8⁺ (CD8).

На ФИГ. 15 показан проточный цитометрический анализ редактирования CD33 в клетках K562 с использованием системы CRISPR/Cas9 и двух различных нРНК (Crispr3, правое верхнее изображение, и Crispr5, правое нижнее изображение).

На ФИГ. 16А–16С показаны клетки K562, дефектные по CD33, присутствующим при пролиферации нормальных клеток и эритропоэтической дифференцировке. Фиг. 16А: проточный цитометрический анализ указанных клеточных популяций на день 1 + 50 мкМ гемина. Фиг. 16В: проточный цитометрический анализ указанных клеточных популяций на день 9. Фиг. 16С: анализ МТТ пролиферации клеток.

На ФИГ. 17А–17С показан проточный цитометрический анализ редактирования CD33 в клетках CD34⁺ человека с использованием системы CRISPR/Cas9 и двух

различных нРНК (crispr3, нижнее левое изображение, и crispr5, нижнее правое изображение). Фиг. 17А: проточный цитометрический анализ редактирования CD33 в клетках CD34⁺ человека с использованием системы CRISPR/Cas9. Фиг. 17В: crispr3. Фиг. 17С: crispr5.

5 **На ФИГ. 18** показано образование колоний для клеток CD34⁺/CD33⁻ человека по сравнению с клетками CD34⁺/CD33⁺ человека. Колонки слева направо соответствуют отсутствию лентивирусной инфекции, контролю с пустым вектором, crispr1, crispr 3 и crispr5.

10 **На ФИГ. 19А–19F** показана CRISPR/Cas9-опосредованная генетическая абляция антигена CD33. На Фиг. 19А показан подход: стволовые клетки, мобилизованные или полученные из пуповинной крови донора, подвергаются генетическим манипуляциям для удаления экспрессии CD33 с использованием технологии редактирования генов, такой как CRISPR/Cas9, и трансплантируют пациентам с рецидивом, подходящим для HSCT. После трансплантации Т-клетки от аллогенного донора будут подвергнуты генетической

15 манипуляции с использованием вирусной системы доставки для экспрессии химерных антигенных рецепторов, нацеливающих CD33, и введены инфузией реципиенту.

Альтернативно, пациенты могут получать ADC (GO) либо отдельно, либо в комбинации с CAR-T. На Фиг. 19В–19F показана экспрессия CD33 и его абляция в клетках человека.

20 Фиг. 19В: экспрессия CD33 в клеточной линии AML HL-60 человека, в первичных клетках CD34⁺CD33^{ДТ} человека из костного мозга (ВМ) и пуповинной крови (СВ) и в первичных CD34⁺CD33^{Дел} человека после опосредованной CRISPR/Cas9 абляции. Фиг.19С:

Схематическое представление геномного локуса CD33, показывающее экзон 2-4 и расположение и последовательность онРНК (жирным шрифтом), нацеливающую CD33.

Последовательности сверху вниз соответствуют SEQ ID NO: 52-53. Фиг. 19D:

25 Поверхностная экспрессии CD33 методом проточной цитометрии после электропорации в клетках CD34⁺CD33^{ДТ} и CD34⁺CD33^{Дел}. Все клетки сохраняют свой фенотип стволовых клеток, что оценивается по экспрессии CD90. Фиг. 19Е: хроматограмма секвенирования по Сэнгеру, показывающая область, окружающую сайт двухцепочечного разрыва ДНК, верхний график: клетки CD34⁺CD33^{ДТ} и нижний график: CD34⁺CD33^{Дел}.

30 Последовательности сверху вниз соответствуют SEQ ID NO: 54-55. Фиг. 19F: от 5 до 7 дней после электропорации, культивированные клетки CD34⁺ показывают согласующуюся делецию CD33 по сравнению с контролем.

На ФИГ. 20А–20Е показано, что делеция CD33 не ухудшает приживание и восстановление гемопоэтической популяции у мышей NSG-SGM3. Фиг. 20А: схема плана

35 эксперимента. На Фиг. 20В–20С показаны приживание и восстановление популяции

происходящих из костного мозга клеток $CD34^+$: анализировали, как указано, периферическую кровь (7 недель; Фиг. 20B) и цельный костный мозг (21 неделя; Фиг. 20C) после трансплантации на клетки различных линий. Клетки $CD34^+CD33^{Дел}$ показывают такое же приживание ($CD45^+$) как у контрольных клеток, а также сравнимый процент зрелых миелоидных и лимфоидных клеток. Клетки $CD34^+CD33^{Дел}$ костного мозга показывают сравнимый процент миелоидных (предшественник $CD123^+$, зрелые $CD14^+$) и лимфоидных клеток (предшественник $CD10^+$, зрелые $CD19^+$), Т-клеток ($CD3^+$) и стволовых клеток $CD34^+38^-$. На Фиг. 20D–20E показаны приживание и восстановление популяции происходящих из пуповинной крови клеток $CD34^+$: анализировали, как

5
 10
 15

указано, периферическую кровь (9 недель; Фиг. 20D) и костный мозг (21 неделя; Фиг. 20E) после трансплантации на клетки различных линий. Клетки $CD34^+CD33^{Дел}$ показывают такое же приживание ($CD45^+$) как у контрольных клеток, а также сравнимый процент зрелых миелоидных и лимфоидных клеток. Клетки $CD34^+CD33^{Дел}$ костного мозга показывают сравнимый процент миелоидных (предшественник $CD123^+$, зрелые $CD14^+$) и лимфоидных клеток (предшественник $CD10^+$, зрелые $CD19^+$), Т-клеток ($CD3^+$) и стволовых клеток $CD34^+38^-$. Данные анализировали с использованием непарного t-теста, и во всех исследованных группах не было обнаружено значимых различий ($p > 0,05$). Все данные представлены в виде среднего значения \pm SEM (стандартная ошибка среднего).

На ФИГ. 21A–21D показаны снимки экранов программы-просмотра integrated genomic viewer (IGV) геномной области генов CD33 (Фиг. 21A) и SIGLEC9 (Фиг. 21B),

20
 25
 30
 35

окружающих направляющие последовательности в клетках Cas9+онРНК (вверху) и только Cas9 (внизу), как указано в левой части. Серые полосы на дорожке покрытия (указаны справа) показывают глубину чтений, отображаемых в каждом локусе. Как правило, покрытие должно быть равномерным и, следовательно, высота полос должна быть одинаковой, но делеции приводят к уменьшению высоты. На дорожке чтений показаны все чтения (серые прямоугольники), картированные в этой области. Делеции представлены сплошной черной линией, а вставки — диагонально заштрихованными прямоугольниками. Чтения с жирной границей представляют те чтения, которые не имеют картированной комплементарной последовательности. Одно чтение в каждой группе было без картированной комплементарной последовательности. Несовпадающие основания заполнены ромбами, незакрашенными кругами, покрашенными кругами и белые символы предназначены для нуклеотидов А, С, G и Т, соответственно. Геномная область SIGLEC9 выбрана в качестве репрезентативной области для демонстрации отсутствия инсерционно-делеционных мутаций (инделов) в нецелевом сайте, поскольку 1) он принадлежит к семейству SIGLEC с гомологией с CD33, и 2) он имеет самую высокую гомологию в

пределах 10 п. о. от ожидаемого сайта разрезания по сравнению с любой другой направляющей последовательностью. Хромосомные координаты внизу основаны на hg38. Фиг. 21C: график рассеяния, показывающий корреляцию между \log_{10} средних нормализованных значений, нормализованных с использованием способом DEseq2, между CD33-редактированными клетками и контрольными клетками. Фиг. 21D: Расширяющийся график, показывающий \log_2 кратности изменения и $-\log_{10}$ р-значения для генов, анализированных методом edgeR, гены, которые были значимо дифференциально экспрессированы ($p < 0,05$), показаны как красные незакрашенные круги, и ген CD33 указан левой стрелкой.

10 **На ФИГ. 22A–22F** показана делеция CD33, защищающая клетки CD34⁺ от цитотоксичности CART33 *in vitro*. Фиг. 22A: схема конструкции CART33. Фиг. 22B: Контурный график, показывающий экспрессию CAR в первичных Т-клетках человека после лентивирусной трансдукции контрольным (черный) вирусом или вирусом CART33 (зеленый или синий). Процент трансдукции в каждой группе указан рядом с графиками. 15 Клетки CD4⁺ и CD8⁺ трансдуцировали независимо и совместно смешивали 1:1 перед экспериментом. Фиг. 22C–22F: анализы цитотоксичности. Фиг. 22C: клетки CART33 или контрольные Т-клетки инкубировали с HL-60 или CD34⁺CD33^{ДТ} или CD34⁺CD33^{Дел}, и оценивали цитотоксичность проточной цитометрией. Фиг. 22D–22F: анализ цитотоксичности в тройной культуре. Клетки CART33 или контрольные Т-клетки 20 совместно инкубировали с клетками HL-60 и CD34⁺CD33^{ДТ} (Фиг. 22D), или с клетками HL-60 и CD34⁺CD33^{Дел} (Фиг. 22E), или с клетками CD34⁺CD33^{ДТ} и CD34⁺CD33^{Дел} (Фиг. 22F).

На ФИГ. 23A–23F показана терапевтическая модель: клетки CD34⁺CD33^{Дел} устойчивые к CD33-нацеленной иммунотерапии. Фиг. 23A: схема плана эксперимента: 25 5×10^5 HL-60 и 5×10^5 CD34⁺CD33^{Дел} вводили инъекцией мышам NSGM3 на день 0. Через одну неделю после этого мышей лечили ФСБ (фосфатно-солевым буфером) или аллогенными CART33 или контрольными Т-клетками. Через 3 дня после этого новая группа получала только GO, тогда как мыши, которым вводили инъекции CART33 и контрольных Т-клеток, получали GO или ФСБ. Лечение продолжали на неделе 3. Затем 30 отслеживали прогрессирование лейкоза и приживление CD34⁺CD33^{Дел} путем последовательных аспираций костного мозга. Фиг. 23B: отслеживание лейкозной нагрузки в аспиратах костного мозга. Лейкозные клетки отбирали в гейты по Ter119⁺dtomato⁺. Фиг. 23C: величина лейкозной нагрузки, полученная посредством изображений эпифлуоресцентного количественного определения, проявленная на 3,5 недели (Фиг. 23D) 35 и на 8 недель (Фиг. 23E). Фон удаляли по данным не получавшей лечение мыши

(* контроль визуализации). Фиг. 23F: устранение лейкоза посредством CART33 или GO не ухудшало приживление клеток $CD34^+CD33^{Дел}$ с течением времени (% клеток $hCD45^+$), как показано проточной цитометрией аспириатов костного мозга. Происходящие из введенных инъекцией клеток $CD34^+$ клетки человека отбирали в гейты по $Ter119^{-}dtomato^{-}$, $Ly5^{-}/H2kd^{-}$ и $CD45^{+}CART^{-}$ человека.

На ФИГ. 24А–24D показано, что HSPC $CD34^+CD33^{Дел}$ демонстрируют приживление и дифференцировку по множеству линий в данной модели терапии. Фиг. 24А: клетки $CD34^+CD33^{Дел}$ устойчивые к $CD33$ -нацеленной иммунотерапии и принимают участие в миелопоэзе и лимфопоэзе. Два левые изображения в каждом состоянии представляют собой отслеживание с течением времени восстановления популяции миелоидных предшественников, и два правые изображения представляют лимфоидные предшественники и зрелые клетки в аспириатах ВМ. Не наблюдалось значимых различий между разными группами лечения во всех анализируемых временных точках. На Фиг. 24В–24D показано, что клетки $CD34^+CD33^{ДТ}$ чувствительны к $CD33$ -нацеленной иммунотерапии. Фиг. 24В: схема плана эксперимента: клетки $5 \cdot 10^5 CD34^+CD33^{ДТ}$ самостоятельно или в комбинации с $5 \cdot 10^5$ HL-60 вводили инъекцией мышам NSG-SGM3 на день 0. Через одну неделю после этого мышей лечили ФСБ или аллогенными клетками CART33. Затем отслеживали прогрессирование лейкоза и приживление $CD34^+CD33^{ДТ}$ путем аспирации костного мозга на неделе 3 на наличие CART33. В тот же день группе мышей вводили инъекцию GO и через 4 дня проводили анализ. Фиг. 24С–24D: на аспириатах ВМ показано полное удаление лейкозных клеток $CD33^{ДТ}$ (Фиг. 24С) и первичных клеток $CD33^{ДТ}$ (Фиг. 24D) у мышей, получавших лечение CART33 или GO, по сравнению с получением только ФСБ. Значимую разницу наблюдали между CART33 и GO по сравнению с ФСБ. Происходящие из введенных инъекцией клеток $CD34^+$ клетки человека отбирали в гейты по $Ter119^{-}dtomato^{-}$, $Ly5^{-}/H2kd^{-}$ и $CD45^{+}CART^{-}$ человека. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SEM.

На ФИГ. 25А–25В показаны дополнительные онРНК, протестированные на подавление экспрессии $CD33$, демонстрирующие высокий уровень наличия инделов. Фиг. 25А–25В: схематическое представление геномного локуса $CD33$, показывающее экзон 2-4 и расположение и последовательность двух дополнительных онРНК, нацеливающих локус $CD33$. Хроматограмма в нижней части снимка экрана секвенирования по Сэнгеру, показывающая область, окружающую сайт двухцепочечного разрыва ДНК, слева: клетки $CD34^+CD33^{ДТ}$ и справа: $CD34^+CD33^{Дел}$. Направляющие последовательности выделены на хроматограмме синим цветом, и появление инделов обозначено красной нисходящей

стрелкой. Последовательности соответствуют SEQ ID NO: 56-57, 75-76, 113, 59 и 77-78, соответственно, в порядке появления.

На **ФИГ. 26А–26D** показано, что делеция CD33 не ухудшает приживание и восстановление гемопоэтической популяции у мышей NSGM3. На **Фиг. 26А–26В** показаны приживание и восстановление популяции происходящих из костного мозга клеток CD34⁺. **Фиг. 26А**: аспират костного мозга (15 недель) после трансплантации анализировали на клетки различных линий, как указано. Клетки CD34⁺CD33^{Дел} показывают такое же приживание (CD45⁺) как у контрольных клеток, а также сравнимый процент зрелых миелоидных и лимфоидных клеток. Гистограмма представляет собой сводные данные по отдельным изображениям. **Фиг. 26В**: обобщенные данные из основной **Фиг. 20С**. На **Фиг. 26С–26D** показаны приживание и восстановление популяции происходящих из пуповинной крови клеток CD34⁺. **Фиг. 26С**: аспират костного мозга (16 недель) после трансплантации анализировали на клетки различных линий, как указано. Клетки CD34⁺CD33^{Дел} показывают такое же приживание (CD45⁺) как у контрольных клеток, а также сравнимый процент зрелых миелоидных и лимфоидных клеток. Гистограмма представляет собой сводные данные по отдельным изображениям. **Фиг. 26D**: обобщенные данные из **Фиг. 20Е**. Значительных различий между обеими группами во всех анализируемых типах клеток не наблюдалось ($p > 0,05$), непарный t-тест. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SEM (стандартная ошибка среднего).

На **ФИГ. 27** показано покрытие чтений в данных секвенирования РНК. Снимки экранов программы-просмотра integrated genomic viewer (IGV) покрытия геномных областей CD33, окружающих направляющие последовательности в клетках Cas9+онРНК (n=5; сверху) и только Cas9 (n=5; внизу), как указано в левой части. Серые полосы на дорожке покрытия (указаны справа) показывают глубину чтений, отображаемых в каждом локусе. Как правило, покрытие должно быть равномерным и, следовательно, высота полос должна быть одинаковой, но делеции приводят к уменьшению высоты полос, что отмечено пунктирным прямоугольником на нижнем изображении. На **Фиг. 27** представлены SEQ ID NO: 114 и 114, соответственно, в порядке появления.

На **ФИГ. 28** показаны обобщенные данные чтений и вариантов, обнаруженных при полногеномном секвенировании.

На **ФИГ. 29** показаны нецелевые сайты для онРНК 846 (онРНК: AUCCCUGGCACUCUAGAACC (SEQ ID NO: 67); PAM: CGG). При анализе полногеномного секвенирования не было обнаружено ни одного индела в пределах 100 п. о. от ожидаемого нецелевого сайта разрезания. Несовпадение с направляющей

последовательностью отмечено жирным шрифтом. На Фиг. 29 раскрыты SEQ ID NO: 79-98, соответственно, в порядке появления.

На ФИГ. 30 показаны нецелевые сайты для онРНК 811 (онРНК: CCUCACUAGACUUGACCCAC (SEQ ID NO: 70); PAM: AGG). При анализе

5 полногеномного секвенирования не было обнаружено ни одного индела в пределах 100 п. о. от ожидаемого нецелевого сайта разрезания. Несовпадение с направляющей последовательностью отмечено жирным шрифтом. На Фиг. 30 раскрыты SEQ ID NO: 99-107, 106, 107, 107, 107, 107 и 107-112, соответственно, в порядке появления.

На ФИГ. 31 показан перечень генов, различным образом экспрессирующихся в 10 клетках с делецией CD33. Гены, экспрессия которых снижена в клетках с делецией CD33 по сравнению с клетками CD33 дикого типа, отмечены отрицательным знаком.

На ФИГ. 32А-32С показано, что GO-нацеленная иммунотерапия удаляет первичные AML и сохраняет клетки CD33^{Дел}. Фиг. 32А: Схема плана эксперимента: 0,5 миллиона первичных клеток AML вводили инъекцией мышам NSGS на день 1. После 15 оценки остаточной минимальной болезни группа мышей, получающая лечение, получала хроническую дозу GO (1 мкг каждые 10 дней). Через 10 дней после первой инъекции GO в группе, получающей лечение, мышам трансплантировали 0,5 миллиона клеток CD34⁺CD33^{Дел}. Фиг. 32В, левое изображение: нагрузку AML (остаточное минимальное заболевание) перед лечением оценивали проточной цитометрией аспиранта костного 20 мозга. Лейкозные клетки отбирали в гейты по Ter119⁻hCD45⁺hCD33⁺. Правые изображения: нагрузка AML и приживление hCD45⁺hCD33^{Дел} в аспирате ВМ после хронического лечения с помощью GO. На Фиг. 23В (продолжение): восстановление гемопоэтической популяции (миелоидные/лимфоидные предшественники и зрелые клетки) клеток CD34⁺CD33^{Дел} отбирали в гейты по Ter119⁻, Ly5⁻/H2kd⁻, hCD45⁺, hCD33⁻. 25 Фиг. 32С. Кривая выживаемости и анализ цельного костного мозга (ВМ), селезенки и периферической крови (РВ) контрольной группы на момент смерти (сплошная линия, без лечения; пунктирная линия, с лечением).

На Фиг. 33А-33D показаны клетки, созданные дефектными по CD33 и CLL-1, могут успешно приживаться. На Фиг. 33А представлен ряд графиков проточной 30 цитометрии, показывающих, что уровни CD33 и CLL-1 могут снижаться отдельно и в комбинации. На Фиг. 33В представлен ряд графиков проточной цитометрии, показывающих, что уровни CD33 и CLL-1 в клетках обеспечивают приживление у мышей. Фиг. 33С и 33D: частота встречаемости в пределах клеточной популяции hCD45⁺ указанных типов клеток в образцах цельного костного мозга (Фиг. 33С) или образцах

селезенки (Фиг. 34D). Слева направо, каждый набор из четырех столбиков представляет следующие типы клеток: $CD34^{+}DT$ (круги); $CD34^{+}CD33^{Дел}$ (квадраты), $CD34^{+}CLL1^{Дел}$ (треугольники) и $CD34^{+}CD33^{Дел}CLL1^{Дел}$ (перевернутые треугольники).

5 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Виды иммунотерапии рака, нацеливающие антигены, присутствующие на клеточной поверхности раковой клетки, особенно сложны, когда целевой антиген также присутствует на клеточной поверхности нормальных нераковых клеток, которые необходимы или критически важны для развития и/или выживания субъекта.

10 Нацеливание этих антигенов может приводить к вредным воздействиям у субъекта из-за цитотоксических эффектов иммунотерапии на такие клетки в дополнение к раковым клеткам.

Способы, нуклеиновые кислоты и клетки, описанные в данном документе, обеспечивают нацеливание антигенов (*например*, антигенов 1 типа или 2 типа), которые
 15 представлены не только на раковых клетках, но также и клетках, критических для развития и/или выживания субъекта. Способ включает: (1) снижение количества клеток, несущих целевой линиеспецифический антиген клеточной поверхности, с использованием агента, который нацеливает такой антиген; и (2) замену нормальных клеток (*например*, нераковых клеток), которые представляют данный антиген и, таким образом, могут быть
 20 уничтожены в результате введения агента, гемопоэтическими клетками, дефицитными по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности. Описанные в данном документе способы могут обеспечивать контроль за целевыми клетками, включая раковые клетки, которые экспрессируют линиеспецифический антиген клеточной поверхности, представляющий интерес, а также поддерживать популяцию нераковых клеток,
 25 экспрессирующих линиеспецифический антиген, который может быть критическим для развития и/или выживания субъекта.

Соответственно, в данном документе описано совместное применение иммунных клеток, экспрессирующих химерные рецепторы, содержащие антигенсвязывающий фрагмент, который нацеливает линиеспецифический антиген клеточной поверхности
 30 (*например*, CD33), и гемопоэтических клеток, таких как гемопоэтические стволовые клетки (HSC) или гемопоэтические клетки-предшественники (HPC), которые дефектны по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности, для лечения гемопоэтического злокачественного новообразования. В данном документе также предлагаются химерные рецепторы, нуклеиновые кислоты, кодирующие их, векторы, содержащие их, и иммунные
 35 клетки (*например*, Т-клетки), экспрессирующие такой химерный рецептор. В настоящем

раскрытии также предлагаются генетически сконструированные гемопоэтические клетки, которые дефектны по такому линиеспецифическому антигену, как описанные в данном документе, а также способы (*например*, способы редактирования генома) для их получения.

5

Определения

Термины «субъект», «индивид» и «пациент» применяются взаимозаменяемо, и относятся к позвоночному, предпочтительно такому млекопитающему, как человек. Млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, человеческие приматы, не являющиеся человеком приматы или виды мышевидных, крупного рогатого скота, лошадей, собачьих или кошачьих. В контексте настоящего раскрытия термин «субъект» также охватывает ткани и клетки, которые могут культивировать *in vitro* или *ex vivo* или с которыми могут работать *in vivo*. Термин «субъект» могут применять взаимозаменяемо с термином «организм».

15 Термины «полинуклеотид», «нуклеотид», «нуклеотидная последовательность», «нуклеиновая кислота» и «олигонуклеотид» применяются взаимозаменяемо. Они относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидов, либо рибонуклеотидов, или их аналогов. Примеры полинуклеотидов включают, но не ограничиваются ими, кодирующие или не кодирующие области гена или фрагмента гена, экзоны, интроны, матричную РНК (мРНК), транспортную РНК, рибосомальную РНК, короткие интерферирующие РНК (киРНК), короткие шпилечные РНК (кшРНК), микро-РНК (миРНК), рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенную ДНК любой последовательности, выделенную РНК любой последовательности, нуклеиновокислотные зонды и праймеры.

20 Один или более нуклеотидов в пределах полинуклеотида может быть дополнительно модифицирован. Последовательность нуклеотидов может прерываться нуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть также модифицирован после полимеризации, например, путем конъюгации с маркирующим агентом.

Термин «гибридизация» относится к реакции, в которой один или более полинуклеотидов вступает в реакцию с образованием комплекса, который стабилизируется посредством водородных связей между основаниями нуклеотидных остатков. Водородная связь может возникать путем спаривания оснований Уотсона-Крика, связывания Хугштейна или любым другим последовательность-специфическим способом. Комплекс может включать в себя две цепи, образующие дуплексную структуру, три или более цепи, образующие многоцепочечный комплекс, одну

35

самогибридизирующуюся цепь, или любую их комбинацию. Реакция гибридизации может составлять стадию в более обширном процессе, таком как инициация ПЦР или расщепление полинуклеотида ферментом. Последовательность, способная гибридизоваться с заданной последовательностью, называется «комплементарной» заданной последовательности.

Термин «рекомбинантный экспрессионный вектор» означает генетически модифицированный олигонуклеотид или полинуклеотидную конструкцию, которая обеспечивает экспрессию мРНК, белка, полипептида или пептида клеткой-хозяином, когда конструкция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую мРНК, белок, полипептид или пептид, и вектор приводится в контакт с клеткой в условиях, достаточных для получения экспрессированных мРНК, белка, полипептида или пептида в пределах клетки. Вектор по настоящему раскрытию не встречается в природе как единое целое. Части векторов могут быть природного происхождения. Рекомбинантные экспрессионные векторы искусственного происхождения по настоящему раскрытию могут содержать любой тип нуклеотидов, включая, но не ограничиваясь ими, ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, синтезированными или полученными частично из природных источников, и которые могут содержать природные, искусственные или измененные нуклеотиды.

«Трансфекция», «трансформация» или «трансдукция», используемые в данном документе, относятся к внедрению одного или более экзогенных полинуклеотидов в клетку-хозяина путем использования физических или химических методов.

«Антитело», «фрагмент антитела», «антительный фрагмент», «функциональный фрагмент антитела» или «антигенсвязывающая часть» применяют взаимозаменяемо для обозначения одного или более фрагментов или частей антитела, которые сохраняют способность специфически связываться со специфическим антигеном (Holliger et al., *Nat. Biotech.* (2005) 23(9): 1126). Настоящие антитела могут представлять собой антитела и/или их фрагменты. Фрагменты антител включают в себя Fab, F(ab')₂, scFv, связанный дисульфидами Fv, Fc, или варианты и/или смеси. Антитела могут быть химерными, гуманизированными, одноцепочечными или биспецифическими. Все изотипы антител охватываемые настоящим раскрытием, включая IgA, IgD, IgE IgG и IgM. Подходящие подтипы IgG включают IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Варибельные области легкой и тяжелой цепи антитела состоит из каркасной области, прерываемая тремя гиперварибельными областями, называются определяющими комплементарность областями (CDR). CDR настоящих антител или антигенсвязывающих частей может происходить из человеческого или нечеловеческого источника. Каркас настоящих антител или антигенсвязывающих

частей может быть человеческим, гуманизированным, нечеловеческим (например, мышинным каркасом, модифицированным для снижения антигенности у человека) или синтетическим каркасом (*например*, консенсусная последовательность).

5 Настоящие антитела или антигенсвязывающие части могут специфически связываться с константой диссоциации (K_D) менее около 10^{-7} М, менее около 10^{-8} М, менее около 10^{-9} М, менее около 10^{-10} М, менее около 10^{-11} М или менее около 10^{-12} М.

Аффинности антител в соответствии с настоящим раскрытием могут легко определять с использованием традиционных методик (см., *например*, Scatchard et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1949) 51:660; и патенты США № 5 283 173, 5 468 614, или эквиваленты).

10 Термины «химерный рецептор», «химерный антигенный рецептор» или, альтернативно, «CAR» используют взаимозаменяемо по всему документу и относятся к рекомбинантной полипептидной конструкции, содержащей по меньшей мере

внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и

15 цитоплазматический сигнальный домен (также называемый в данном документе как «внутриклеточный сигнальный домен»), включающий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы, как определено ниже. Lee et al., *Clin. Cancer Res.* (2012) 18(10):2780; Jensen et al., *Immunol Rev.* (2014) 257(1):127; www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells. В одном варианте осуществления стимулирующая молекула представляет собой цепь дзета,

20 ассоциированную с Т-клеточным рецепторным комплексом. В одном аспекте цитоплазматический сигнальный домен дополнительно содержит один или более функциональных сигнальных доменов происходящих из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы, как определено ниже. Костимулирующая молекула также может представлять собой 4-1BB (*m. e.*, CD137), CD27 и/или CD28 или фрагменты этих

25 молекул. В другом аспекте CAR содержит химерный белок слияния, содержащий внеклеточный домен распознавания антигена, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, происходящий из стимулирующей молекулы. CAR содержит химерный белок слияния, содержащий внеклеточный домен распознавания антигена, трансмембранный домен и

30 внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, происходящий из костимулирующей молекулы, и функциональный сигнальный домен, происходящий из стимулирующей молекулы. Альтернативно, CAR содержит химерный белок слияния, содержащий внеклеточный домен распознавания антигена, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий два

35 функциональных сигнальных домена, происходящих из одной или более

костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, происходящий из стимулирующей молекулы. CAR может также содержать химерный белок слияния, содержащий внеклеточный домен распознавания антигена, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий по меньшей мере два функциональных сигнальных домена, происходящих из одной или более костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, происходящий из стимулирующей молекулы. Фрагмент распознавания антигена из CAR, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, может содержать любой линиеспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела. Фрагмент антитела может содержать один или более CDR, вариабельную область (или ее часть), константную область (или ее часть) или комбинации любых из предыдущих.

Термин «сигнальный домен» относится к функциональной части белка, которая действует путем передачи информации в пределах клетки для регуляции клеточной активности посредством определенных сигнальных путей через генерирование вторичных мессенджеров или функционирование в виде эффекторов в ответ на такие мессенджеры.

Термин «дзета» или, альтернативно, «цепь дзета», «CD3-дзета» или «TCR-дзета» определяется как белок, предоставленный номерами доступа в Genbank NP_932170, NP_000725 или XP_011508447; или эквивалентные остатки из не являющихся человеком видов, например мыши, грызуна, обезьяны, примата и т. п., и «стимулирующий домен дзета» или, альтернативно, «стимулирующий домен CD3-дзета» или «стимулирующий домен TCR-дзета» определяется как аминокислотные остатки из цитоплазматического домена цепи дзета, которые достаточны для функциональной передачи начального сигнала, необходимого для активации Т-клеток.

Термин «генетически сконструированный» или «генетически модифицированный» относится к клетке, прошедшей манипуляцию генетической инженерией, например редактирование генома. А именно, клетки содержат гетерологичную последовательность, которая не встречается естественным образом в указанных клетках. Как правило, гетерологичная последовательность внедрена посредством векторной системы или другими способами для внедрения молекул нуклеиновых кислот в клетки, включая липосомы. Молекула гетерологичной нуклеиновой кислоты может интегрироваться в геном клетки или может присутствовать внехромосомно, *например* в форме плазмиды. Термин также включает варианты осуществления с внедрением в клетку генетически сконструированных выделенных полипептидов CAR.

Термин «аутологичный» относится к любому материалу, полученному из от того же индивида, которому впоследствии он будет обратно вводиться.

Термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному от другого индивида того же вида, что и индивид, которому этот материал вводится. Считается, что два или более индивидов являются аллогенными по отношению друг к другу, когда гены в одном или более локусов не являются идентичными.

5 Термин «клеточная линия» относится к клетками с общим предком, развивающимся из того же типа идентифицируемой клетки в специфические идентифицируемые/функционирующие клетки. Клеточные линии, используемые в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, респираторные, простатические, панкреатические, маммарные, почечные, кишечные, нейрональные, 10 скелетные, сосудистые, печеночные, гемопоэтические, мышечные или сердечные клеточные линии.

Термин «ингибирование», при использовании касательно экспрессии или функции гена линиеспецифического антигена относится к уменьшению уровня экспрессии или функции гена линиеспецифического антигена, причем ингибирование является 15 результатом интерференции с экспрессией или функцией гена. Ингибирование может быть полным, в случае которого отсутствует выявляемая экспрессия или функция, или оно может быть частичным. Частичное ингибирование может находиться в диапазоне от почти полного ингибирования до почти отсутствия ингибирования. Путем удаления конкретных клеток-мишеней, CAR-T-клетки могут эффективно ингибировать всеобщую 20 экспрессию конкретной клеточной линии.

Клетки, такие как гемопоэтические клетки, которые являются «дефектными по линиеспецифическому антигену», относятся к клеткам, имеющим по существу пониженный уровень экспрессии линиеспецифического антигена, по сравнению с их аналогами природного происхождения, *например* эндогенные гемопоэтические клетки 25 того же типа, или клеткам, которые не экспрессируют линиеспецифический антиген, т. е. не выявляемый обычным анализом, таким как FACS. В некоторых случаях экспрессируемый уровень линиеспецифического антигена клеток, которые «дефектны по антигену», может быть ниже около 40% (например, 30%, 20%, 15%, 10%, 5% или ниже) уровня экспрессии того же линиеспецифического антигена аналога природного 30 происхождения. Используемый в данном документе термин «около» относится к конкретному значению +/- 5%. Например, уровень экспрессии около 40% может включать в себя любое количество экспрессии между 35%-45%.

Агенты, нацеливающие линиеспецифические антигены клеточной поверхности

В аспектах раскрытия предлагаются агенты (например, агенты, которые нацеливают CD33, например, при этом агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33), нацеливающие линиеспецифический антиген клеточной поверхности, например на целевой раковой клетке. Такой агент может содержать антигенсвязывающий фрагмент, который связывает и нацеливает линиеспецифический антиген клеточной поверхности. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой одноцепочечное антитело (scFv), специфически связывающееся с линиеспецифическим антигеном.

10 А. *Линиеспецифические антигены клеточной поверхности*

Используемые в данном документе термины «линиеспецифический антиген клеточной поверхности» и «клеточноповерхностный линиеспецифический антиген» могут применяться взаимозаменяемо и относится к любому антигену, который достаточно представлен на поверхности клетки и ассоциирован с одной или более популяций клеточной(-ых) линии(-й). Например, антиген может присутствовать на одной или более популяций клеточной(-ых) линии(-й) и отсутствовать (или на сниженных уровнях) на клеточной поверхности других клеточных популяций.

В целом, линиеспецифические антигены клеточной поверхности могут классифицировать на основе ряда факторов, таких как антиген и/или популяции клеток, которые представляют антиген, требуются для выживания и/или развития организма хозяина. Обобщенные данные примеров типов линиеспецифических антигенов представлены ниже в таблице 1. См. также ФИГ. 1.

Таблица 1. Классификация линиеспецифических антигенов

25

Тип линиеспецифического антигена	Характеристики линиеспецифического антигена
Тип 0	а) антиген требуется для выживания организма и б) тип клеток, несущий антиген 0 типа, требуется для выживания организма и не уникальный для опухоли или опухолеассоциированного вируса

Тип 1	<p>a) антиген не требуется для выживания организма</p> <p>и</p> <p>b) тип клеток, несущий антиген 1 типа, не требуется для выживания организма</p>
Тип 2	<p>a) антиген не требуется для выживания организма</p> <p>и</p> <p>b) тип клеток, несущий антиген 2 типа, требуется для выживания организма</p>
Тип 3	<p>a) антиген не требуется для выживания организма</p> <p>и</p> <p>b) тип клеток, несущий антиген, не требуется для выживания организма</p> <p>c) Антиген является уникальным для опухоли или опухолеассоциированного вируса</p> <p>Пример представляет собой антиген LMP-2 в инфицированных EBV клетках, включая инфицированные EBV опухолевые клетки (назофарингальная карцинома и лимфома Беркитта)</p>

Как показано в таблице 1 и на ФИГ. 1, линиеспецифические антигены 0 типа клеточной поверхности антиген необходимы для гомеостаза и выживания, и типы клеток, несущие линиеспецифические антигены 0 типа клеточной поверхности могут также быть

5 необходимыми для выживания субъекта. Таким образом, принимая во внимание важность линиеспецифического антигена 0 типа клеточной поверхности или клеток, несущих линиеспецифический антиген 0 типа клеточной поверхности, в гомеостазе и выживания, нацеливание этой категории антигенов может быть сложным при использовании традиционных иммунотерапий с CAR-T-клетками, так как ингибирование

или удаление таких антигенов и клеток, несущих такие антигены, может наносить вред выживанию субъекта. Вследствие этого, линиеспецифические антигены клеточной поверхности (такие как линиеспецифические антигены 0 типа) и/или типы клеток, которые несут такие антигены, могут требоваться для выживания, например поскольку они выполняют жизненную недублирующую функцию у субъекта, потом этот тип линиеспецифического антигена может быть слабой мишенью для иммунотерапии на основе CAR-T-клеток.

В отличие от антигена 0 типа, линиеспецифический антиген 1 типа клеточной поверхности и клетки, несущие линиеспецифический антиген 1 типа клеточной поверхности не требуются для тканевого гомеостаза или выживания субъекта. Нацеливание линиеспецифических антигенов 1 типа клеточной поверхности, вероятно, не приводит к вредным последствиям у субъекта. Например, CAR-T-клетка, сконструированная для нацеливания CD307, антигена 1 типа, экспрессируемого однозначно как на нормальных плазмочитах, так и на клетках множественной миеломы (ММ), приводит к удалению обоих типов клеток (ФИГ. 2) (Elkins et al., *Mol Cancer Ther.* 10:2222 (2012)). Тем не менее, поскольку плазмочитарная линия является не востребованной для выживания организма, CD307 и другие линиеспецифические антигены 1 типа являются антигенами, которые подходят для иммунотерапии на основе CAR-T-клеток. Линиеспецифические антигены класса 1 типа могут экспрессироваться в большом разнообразии различных тканей, включая, яичники, яички, предстательную железу, молочную железу, эндометрий и поджелудочную железу. В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты нацеливают линиеспецифический антиген клеточной поверхности, который представляет собой антиген 1 типа.

Нацеливание антигенов 2 типа представляет значительную трудность по сравнению с антигенами 1 типа. Антигены 2 типа характеризуются тем, что: (1) антиген несущественен для выживания организма (т. е. не требуется для выживания), и (2) клеточная линия, несущая антиген, незаменима для выживания организма (т. е. конкретная клеточная линия требуется для выживания). Например, CD33 представляет собой антиген 2 типа, экспрессируемый как в нормальных миелоидных клетках, так и в клетках острого миелоидного лейкоза (AML) (Dohner et al., *NEJM* 373:1136 (2015)). В результате, CAR-T-клетки, сконструированные для нацеливания антигена CD33, могут приводить к уничтожению как нормальных, так и клеток AML, которые могут быть несовместимы с выживанием субъекта (ФИГ. 3). В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты нацеливают линиеспецифический антиген клеточной поверхности, который представляет собой антиген 2 типа.

Большое разнообразие антигенов может нацеливаться способами и композициями по настоящему раскрытию. Моноклональные антитела к этим антигенам могут приобретать в коммерческом масштабе или получать с использованием стандартных методик, включающих иммунизацию животного с помощью представляющего интерес антигена, следуя традиционной методологии моноклональных антител, например стандартной методике гибридизации соматических клеток по Kohler and Milstein, *Nature* (1975) 256: 495, как обсуждается выше. Антитела или нуклеиновые кислоты, кодирующие эти антитела, могут секвенировать с использованием любых стандартных методик секвенирования ДНК или белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения линиеспецифический антиген клеточной поверхности, который нацеливается с использованием способа и клеток описанных в данном документе, представляет собой линиеспецифический антиген клеточной поверхности лейкоцитов или субпопуляции лейкоцитов. В некоторых вариантах осуществления изобретения линиеспецифический антиген клеточной поверхности представляет собой антиген, который ассоциирован с миелоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления изобретения линиеспецифический антиген клеточной поверхности представляет собой кластер дифференцировки антигенов (CD). Примеры антигенов CD включают, без исключения, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD16, CD16b, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32a, CD32b, CD32c, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64a, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66F, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75S, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85A, CD85C, CD85D, CD85E, CD85F, CD85G, CD85H, CD85I, CD85J, CD85K, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD99R, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD152, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156a, CD156b, CD156c, CD157,

CD158b1, CD158b2, CD158d, CD158e1/e2, CD158f, CD158g, CD158h, CD158i, CD158j, CD158k, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CDw198, CDw199, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210a, CDw210b, CD212, CD213a1, CD213a2, CD215, CD217, CD218a, CD218b, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD239, CD240, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CD248, CD249, CD252, CD253, CD254, CD256, CD257, CD258, CD261, CD262, CD263, CD264, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD286, CD288, CD289, CD290, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300a, CD300c, CD300e, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, 306, CD307a, CD307b, CD307c, D307d, CD307e, CD309, CD312, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD344, CD349, CD350, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD357, CD358, CD359, CD360, CD361, CD362 и CD363. См.

www.bdbiosciences.com/documents/BD_Reagents_CDMarkerHuman_Poster.pdf.

В некоторых вариантах осуществления изобретения линиеспецифический антиген клеточной поверхности представляет собой CD19, CD20, CD11, CD123, CD56, CD34, CD14, CD33, CD66b, CD41, CD61, CD62, CD235a, CD146, CD326, LMP2, CD22, CD52, CD10, CD3/TCR, CD79/BCR и CD26. В некоторых вариантах осуществления изобретения линиеспецифический антиген клеточной поверхности представляет собой CD33.

Альтернативно или дополнительно, линиеспецифический антиген клеточной поверхности может быть раковым антигеном, например линиеспецифическим антигеном клеточной поверхности, который отличительным образом присутствует на раковых клетках. В некоторых вариантах осуществления изобретения раковый антиген представляет собой антиген, который специфичен по тканевой или клеточной линии. Примеры линиеспецифических антигенов клеточной поверхности, которые ассоциированы с конкретным типом ракового заболевания, включают, без ограничений, CD20, CD22 (неходжкинская лимфома, В-клеточная лимфома, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)), CD52 (В-клеточный CLL), CD33 (острый миелогенный лейкоз (AML)), CD10 (gp100) (распространенный (пре-В) острый лимфоцитарный лейкоз

и злокачественная меланома), CD3/Т-клеточный рецептор (TCR) (Т-клеточная лимфома и лейкемия), CD79/В-клеточный рецептор (BCR) (В-клеточные лимфома и лейкоз), CD26 (эпителиальные и лимфоидные злокачественные опухоли), человеческий лейкоцитарный антиген (HLA)-DR, HLA-DP и HLA-DQ (лимфоидные злокачественные опухоли), RCAS1 (гинекологические карциномы, билиарные аденокарциномы и протоковые аденокарциномы поджелудочной железы), а также простат-специфический мембранный антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген клеточной поверхности представляет собой CD33 и ассоциирован с клетками AML.

10 В. Антигенсвязывающий фрагмент

Любое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, который связывает CD33) могут применять для конструкции агента, который нацеливает линиеспецифический антиген клеточной поверхности, как описано в данном документе. Такое антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут получать традиционным

15 способом, например с использованием гибридной технологии или рекомбинантной технологии.

Например, антитела, специфические к линиеспецифическому представляющему интерес антигену, могут получать традиционной гибридной технологией.

Линиеспецифический антиген, который может соединяться с белком-носителем, таким как KLN, могут применять для иммунизации животного-хозяина для получения антител, связывающихся с таким комплексом. Путь и график иммунизации животного-хозяина находятся, в целом, в соответствии с принятыми и традиционными методиками для стимуляции и продукции антител, как дополнительно описано в данном документе.

Общие методики для продукции мышинных, гуманизированных и человеческих антител известны в данной области техники и описаны в данном документе. Подразумевается, что

25 любой субъект-млекопитающее, включая людей или продуцирующие антитела клетки из них, могут подвергать манипуляции, чтобы получить основу для продукции из млекопитающего, включая гибридные клеточные линии человека. Как правило, животное-хозяин инокулируют внутрибрюшинно, внутримышечно, перорально,

30 подкожно, внутripодошвенно и/или внутрикoжно некоторым количеством иммуногена, включая так, как описано в данном документе.

Гибридомы могут получать из лимфоцитов и иммортализованных миеломных клеток с использованием общей методики гибридизации соматических клеток по Kohler, B. and Milstein, C. (1975) Nature 256:495-497 или как модифицировано Buck, D. W., et al.,

35 In Vitro, 18:377-381 (1982). В гибридизации могут применять доступные миеломные

линии, включающие, но ограничивающиеся X63-Ag8.653 и линии из Salk Institute, Cell Distribution Center, г. Сан-Диего, Калиф., США. Как правило, методика включает слияние миеломных клеток и лимфоидных клеток с использованием фузогена, такого как полиэтиленгликоль, или с помощью электрических средств, хорошо известных специалистам в данной области техники. После слияния клетки отделяют от среды слияния и выращивают в селективной среде для роста, такой как среда с гипоксантином-аминоптериним-тимидином (НАТ), для удаления негибридизованных родительских клеток. Любую из описанных в данном документе сред, с добавлением сыворотки или без нее, могут использовать для культивирования гибридом, секретирующих моноклональные антитела. В качестве другой альтернативы методике слияния клеток для получения описанных в данном документе ТCR-подобных моноклональных антител могут использовать иммортализованные EBV В-клетки. При желании гибридомы размножают и субклонировать, и супернатанты анализируют на антииммуногенную активность с помощью обычных процедур иммуноанализов (например, радиоиммуноанализа, иммуноферментного анализа или флуоресцентного иммуноанализа).

Гибридомы, которые могут использовать в качестве источника антител, включают все производные, клетки-потомки родительской гибридомы, которые продуцируют моноклональные антитела, способные связываться с линиеспецифическим антигеном. Гибридомы, которые продуцируют такие антитела, могут выращивать *in vitro* или *in vivo* с использованием известных процедур. Моноклональные антитела, при желании, могут выделять из культуральной среды или жидкостей организма с помощью обычных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как осаждение сульфатом аммония, гель-электрофорез, диализ, хроматография и ультрафильтрация. Нежелательная активность, если она присутствует, может быть удалена, например, путем пропускания препарата через адсорбенты, изготовленные из иммуногена, прикрепленного к твердой фазе, и элюирования или высвобождения требуемых антител из иммуногена. Иммунизация животного-хозяина целевым антигеном или фрагментом, содержащим целевую аминокислотную последовательность, конъюгированным с белком, который является иммуногенным для иммунизируемого вида, *например* гемоцианином фисуреллы, сывороточным альбумином, бычим тиреоглобулином или соевым ингибитором трипсина, с использованием бифункционального или дериватизирующего агента, например сложного эфира малеимидобензоилсульфосукцинимиды (конъюгация через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимиды (через остатки лизина), глутаральдегида, янтарного ангидрида, SOCl₂, или R1N=C=NR, где R и R1 являются различными алкильными группами, может давать популяцию антител (*например*, моноклональных антител).

При желании, представляющее интерес антитело (*например*, продуцированное гибридомой) могут секвенировать, и полинуклеотидную последовательность затем могут клонировать в вектор для экспрессии или репродукции. Последовательность, кодирующая представляющее интерес антитело, может сохраняться в векторе в клетке-хозяине, а затем клетка-хозяин может размножаться и замораживаться для будущего применения. В альтернативном варианте полинуклеотидную последовательность могут использовать для генетических манипуляций с целью «гуманизации» антитела или улучшения аффинности (аффинного созревания) или других характеристик антитела. Например, константная область может быть сконструирована таким образом, чтобы больше напоминать константные области человека, чтобы избежать иммунного ответа, если антитело будет использоваться в клинических испытаниях и лечении на людях. Может быть желательным генетически манипулировать последовательностью антитела для достижения большей аффинности к линиеспецифическому антигену. Для специалиста в данной области техники очевидно, что в антитело можно внести одно или более полинуклеотидных изменений и все же сохранить его специфичность связывания с целевым антигеном.

В других вариантах осуществления изобретения могут получать полностью человеческие антитела с использованием коммерчески доступных мышей, которые были сконструированы для экспрессии специфических иммуноглобулиновых белков человека. Трансгенные животные, предназначенные для получения более желательного (*например*, полностью человеческого антитела) или более устойчивого иммунного ответа, также могут быть использованы для создания гуманизированных или человеческих антител. Примером такой технологии являются Xenomouse™ от компании Amgen, Inc. (г. Фремонт, Калиф.) и HuMAb-Mouse™ и TC Mouse™ от компании Medarex, Inc. (г. Принстон, Нью-Джерси). В другом варианте антитела могут быть получены рекомбинантно с помощью фагового дисплея или дрожжевой технологии. См., например, патенты США № 5 565 332; 5 580 717; 5 733 743 и 6 265 150; и Winter et al., (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455. Альтернативно, могут использовать технологию фагового дисплея (McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-553) для продукции антител и фрагментов антител человека *in vitro*, из репертуаров генов варибельного (V) домена иммуноглобулина, полученных у неиммунизированных доноров.

Антигенсвязывающие фрагменты интактного антитела (полноразмерное антитело) могут получать посредством обычных способов. Например, фрагменты F(ab')₂ могут получать путем расщепления пепсином молекулы антитела, и фрагменты Fab могут создавать путем восстановления дисульфидных мостиков фрагментов F(ab')₂.

Генетически сконструированные антитела, такие как гуманизированные антитела, химерные антитела, одноцепочечные антитела и биспецифические антител, могут продуцировать посредством, *например*, традиционной рекомбинантной технологии. В одном примере ДНК, кодирующая моноклональные антитела, специфические к целевому антигену, могут легко выделять и секвенировать с использованием обычных процедур (*например*, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи моноклональных антител). Гибридомные клетки служат предпочтительным источником такой ДНК. После выделения ДНК могут помещать в один или более экспрессионных векторов, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомяка (СНО) или клетки миеломы, которые в противном случае не продуцируют белок иммуноглобулина, для обеспечения синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. См., *например*, публикацию РСТ № WO 87/04462. Затем ДНК могут модифицировать, например, путем замены кодирующей последовательности константных доменов тяжелой и легкой цепей человека вместо гомологичных последовательностей мыши Morrison et al., (1984) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851, или путем ковалентного присоединения к кодирующей последовательности иммуноглобулина всей или части кодирующей последовательности неиммуноглобулинового полипептида. Таким образом, могут быть получены генно-инженерные антитела, такие как «химерные» или «гибридные» антитела, которые обладают специфичностью связывания целевого антигена.

Методики, разработанные для продукции «химерных антител» хорошо известны в данной области техники. См., *например*, Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851; Neuberger et al. (1984) *Nature* 312, 604; и Takeda et al. (1984) *Nature* 314:452.

Способы конструирования гуманизированных антител также хорошо известны в данной области техники. См., *например*, Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10033 (1989). В одном примере переменные области VH и VL родительского нечеловеческого антитела подвергают анализу трехмерного молекулярного моделирования в соответствии с методами, известными в данной области. Далее с помощью того же анализа молекулярного моделирования определяют каркасные аминокислотные остатки, которые, как предполагается, важны для формирования правильных структур CDR. Параллельно, VH и VL цепи человека, имеющие аминокислотные последовательности, которые гомологичны последовательностям родительского нечеловеческого антитела, идентифицируют из любой базы данных генов

антител, используя в качестве поисковых запросов родительские VH и VL последовательности. Затем выбирают акцепторные гены VH и VL человека.

Области CDR в пределах выбранных акцепторных генов человека могут заменять областями CDR из исходного нечеловеческого антитела или его функциональных вариантов. При необходимости остатки в пределах каркасных областей родительской цепи, которые, как предполагается, важны для взаимодействия с областями CDR (см. описание выше), могут использоваться для замены соответствующих остатков в акцепторных генах человека.

Одноцепочечное антитело может быть получено с помощью рекомбинантной технологии путем соединения нуклеотидной последовательности, кодирующей переменную область тяжелой цепи, и нуклеотидной последовательности, кодирующей переменную область легкой цепи. Предпочтительно между двумя переменными областями внедрен гибкий линкер. Альтернативно, методики описаны для продукции одноцепочечных антител (патенты США № 4 946 778 и 4 704 692) могут адаптировать для продукции библиотеки фага или дрожжевого scFv, и могут идентифицировать клоны scFv, специфические к линиеспецифическому антигену из библиотеки, следуя обычным процедурам. Положительные клоны могут подвергать дополнительному скринингу для идентификации тех клонов, которые связывают линиеспецифический антиген.

В некоторых случаях представляющий интерес линиеспецифический антиген представляет собой CD33, и антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CD33, например CD33 человека. Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот примера переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи антитела против CD33 человека предложены ниже. Последовательности CDR показаны в аминокислотных последовательностях жирным шрифтом и подчеркиванием.

Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи антитела против CD33 (SEQ ID NO: 12)

QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDI
SYNQKFOGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREEVRLRYFDVWGQGTTVT
 VSS

Последовательность нуклеиновой кислоты переменной области тяжелой цепи антитела против CD33 (SEQ ID NO: 2)

CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCCGGCGCCGAGGTGGTGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAA
 GATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCTACTACATCCACTGGATCA

AGCAGACCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGGTGGGCGTGATCTACCCCGGCAACGAC
 GACATCAGCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGAG
 CAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGT
 ACTACTGCGCCAGGGAGGTGAGGCTGAGGTA CTTCGACGTGTGGGGCCAGGGCACC
 5 ACCGTGACCGTGAGCAGC

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела против CD33 (SEQ ID NO: 13)

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWAST
 10 RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHOYLSRTFGQGTKLEIKR

Последовательность нуклеиновой кислоты вариабельной области тяжелой цепи антитела против CD33 (SEQ ID NO: 1)

GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCAGCCTGGCCGTGAGCCCCGGCGAGAGGGT
 15 GACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGTCTTCAGCAGCAGCCAGAAGAACT
 ACCTGGCCTGGTACCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGGCTGCTGATCTACTGG
 GCCAGCACCAGGGAGAGCGGCGTGCCCGACAGGTTACCGGCAGCGGCAGCGGCA
 CCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACT
 GCCACCAGTACCTGAGCAGCAGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
 20 AGG

Связывающий фрагмент антитела против CD33 для применения в конструировании агента, который нацеливает CD33, как описано в данном документе, может содержать такие же области CDR тяжелой цепи и/или легкой цепи области, как описанные в SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:13. Такие антитела могут включать в себя вариации аминокислотных остатков в одной или более каркасных областей. В некоторых случаях фрагмент антитела против CD33 может содержать вариабельную область тяжелой цепи, которая разделяет по меньшей мере 70% идентичности последовательности (*например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или выше*) с SEQ ID NO:12, и/или может содержать вариабельную область легкой цепи, которая разделяет по меньшей мере 70% идентичности последовательности (*например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или выше*) с SEQ ID NO:13.

«Процент идентичности» двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма, описанного Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, модифицированного, как описано Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST

(версия 2.0) из Altschul, et al. *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990. Поиски по белкам BLAST можно осуществлять с помощью программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных с белковыми молекулами по настоящему раскрытию. Если между двумя последовательностями существуют гэпы, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

10 *C. Иммунные клетки, экспрессирующие химерные рецепторы*

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, который нацеливает линиеспецифический антиген клеточной поверхности, как описано в данном документе, представляет собой иммунную клетку, которая экспрессирует химерный рецептор, содержащий антигенсвязывающий фрагмент (*например*, одноцепочечное антитело), способный связываться с линиеспецифическим антигеном (*например*, CD33).

Распознавание целевой клетки (*например*, раковой клетки), имеющей на своей клеточной поверхности линиеспецифический антиген, с помощью антигенсвязывающего фрагмента химерного рецептора трансдуцирует сигнал активации к сигнальному(-ым) домену(-ам) (*например*, костимулирующему сигнальному домену и/или цитоплазматическому сигнальному домену) химерного рецептора, который может активировать эффекторную функцию в иммунной клетке, экспрессирующей данный химерный рецептор.

Используемый в данном документе, химерный рецептор относится к молекуле искусственного происхождения, которая может экспрессироваться на поверхности клетки-хозяина и содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с линиеспецифическим антигеном клеточной поверхности. В целом, химерные рецепторы содержат по меньшей мере из двух доменов, которые получены из разных молекул. В дополнение к антигенсвязывающему фрагменту, описанному в данном документе, химерный рецептор может дополнительно содержать один или более из шарнирного домена, трансмембранного домена, по меньшей мере одного костимулирующего домена и цитоплазматического сигнального домена. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный рецептор содержит от N-конца до C-конца, антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с линиеспецифическим антигеном клеточной поверхности, шарнирный домен, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный рецептор дополнительно содержит по меньшей мере один костимулирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные рецепторы, описанные в данном документе, содержат шарнирный домен, который расположен между антигенсвязывающим фрагментом и трансмембранным доменом. Шарнирный домен представляет собой аминокислотный сегмент, который обычно находится между двумя доменами белка и может обеспечивать гибкость белка и перемещение одного или обоих доменов относительно друг друга. Может использоваться любая аминокислотная последовательность, которая обеспечивает такую гибкость и перемещение антигенсвязывающего фрагмента относительно другого домена химерного рецептора.

Шарнирный домен может содержать около 10-200 аминокислот, например 15-150 аминокислот, 20-100 аминокислот или 30-60 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен может содержать около 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 аминокислот в длину.

В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен представляет собой шарнирный домен белка природного происхождения. Шарнирные домены любого белка, известного в данной области техники, содержащие шарнирный домен, совместимы для применения в химерных рецепторах, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен является по меньшей мере частью шарнирного домена белка природного происхождения и обеспечивает гибкость химерного рецептора. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен представляет собой CD8 α или CD28 α . В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен представляет собой часть шарнирного домена CD8 α , например фрагмент, содержащий по меньшей мере 15 (например, 20, 25, 30, 35 или 40) последовательных аминокислот шарнирного домена CD8 α или CD28 α .

Шарнирные домены антител, таких как антитела IgG, IgA, IgM, IgE или IgD, также совместимы для применения в химерных рецепторах, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен представляет собой шарнирный домен, который соединяет константные домены CH1 и CH2 антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен происходит из антитела и содержит шарнирный домен антитела и одну или более константных областей антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен содержит шарнирный домен антитела и константную область CH3

антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен содержит шарнирный домен антитела и константные области CH2 и CH3 антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой антитело IgG, IgA, IgM, IgE или IgD. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирная область содержит шарнирную область и константные области CH2 и CH3 антитела IgG1. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирная область содержит шарнирную область и константную область CH3 антитела IgG1.

В объем настоящего раскрытия также входят химерные рецепторы, содержащие шарнирный домен, который представляет собой пептид искусственного происхождения. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен между С-концом внеклеточного лиганд-связывающего домена Fc-рецептора и N-концом трансмембранного домена представляет собой пептидный линкер, такой как линкер $(Gly_xSer)_n$ (SEQ ID NO: 74), где x и n независимо могут являться целыми числами от 3 до 12, включая 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более.

Дополнительные пептидные линкеры, которые могут применять в шарнирном домене химерных рецепторов, описанных в данном документе, известны в данной области техники. См., например, Wriggers et al. *Current Trends in Peptide Science* (2005) 80(6): 736-746 и публикацию PCT WO 2012/088461.

В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные рецепторы, описанные в данном документе, могут содержать трансмембранный домен. Трансмембранный домен для применения в химерных рецепторах может находиться в любой форме, известной в данной области техники. Используемый в данном документе термин «трансмембранный домен» относится к любой структуре белка, которая является термодинамически стабильной в клеточной мембране, предпочтительно эукариотической клеточной мембраной. Трансмембранный домен, совместимый для применения в химерных рецепторах, используемых в данном документе, могут получать из белка природного происхождения. Альтернативно, трансмембранный домен он может представлять собой синтетический сегмент белка искусственного происхождения, например сегмент гидрофобного белка, который является термодинамически стабильным в клеточной мембране.

Трансмембранные домены классифицируют на основе топологии трансмембранных доменов, включая количество проходов трансмембранного домена

через мембрану и ориентацию белка. Например, однократно пересекающие мембрану белки пересекают клеточную мембрану один раз, а многократно пересекающие белки пересекают клеточную мембрану по меньшей мере дважды (*например*, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более раз). В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен представляет собой однократно пересекающий трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен представляет собой однократно пересекающий трансмембранный домен, который ориентирует N-конец химерного рецептора по отношению к внеклеточной стороне клетки, а C-конец химерного рецептора по отношению к внутриклеточной стороне клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен получают из однократно пересекающего трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен получен из CD8 α . В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен получен из CD28. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен получен из ICOS.

В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные рецепторы, описанные в данном документе, содержат один или более костимулирующие сигнальные домены. Используемый в данном документе термин «костимулирующий сигнальный домен» относится по меньшей мере к по меньшей мере части белка, который опосредует трансдукцию сигнала в клетке для индукции иммунного ответа, такого как эффекторная функция. Костимулирующий сигнальный домен химерного рецептора, описанного в данном документе, может представлять собой цитоплазматический сигнальный домен из костимулирующего белка, который трансдуцирует сигнал и модулирует ответы, опосредованные иммунными клетками, такими как Т-клетки, НК-клетки, макрофаги, нейтрофилы или эозинофилы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный рецептор содержит более одного (по меньшей мере 2, 3, 4 или более) костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный рецептор содержит более одного костимулирующего сигнального домена, полученного из различных костимулирующих белков. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный рецептор не содержит костимулирующего сигнального домена.

В целом, многие иммунные клетки требуют костимуляции, в дополнение к стимуляции антигенспецифическим сигналом, для стимулирования пролиферации, дифференцировки и выживания клеток, а также для активации эффекторных функций клетки. Активация костимулирующего сигнального домена в клетке-хозяине

(*например*, иммунной клетке) может индуцировать клетку к увеличению или уменьшению продукции и секреции цитокинов, фагоцитарных свойств, пролиферации, дифференцировке, выживанию и/или цитотоксичности. Костимулирующий сигнальный домен из любого костимулирующего белка может быть совместим для применения в химерных рецепторах, описанных в данном документе. Тип(-ы) костимулирующего сигнального домена выбирается(-ются) на основе таких факторов, как тип иммунных клеток, в которых будут экспрессироваться химерные рецепторы (*например*, первичные Т-клетки, Т-клеточные линии, НК-клеточные линии), и требуемая иммунная эффекторная функция (*например*, цитотоксичность). Примерами костимулирующих сигнальных доменов для применения в химерных рецепторах может быть цитоплазматический сигнальный домен костимулирующих белков, включая, без ограничений, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, Cd40, PD-1, ICOS, ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3. В некоторых вариантах осуществления изобретения костимулирующий домен получен из 4-1BB, CD28 или ICOS. В некоторых вариантах осуществления изобретения костимулирующий домен получен из CD28 и химерный рецептор содержит второй костимулирующий домен из 4-1BB или ICOS.

В некоторых вариантах осуществления изобретения костимулирующий домен представляет собой домен слияния, содержащий более одного костимулирующего домена или части более одного костимулирующего домена. В некоторых вариантах осуществления изобретения костимулирующий домен представляет собой слияние из костимулирующих доменов CD28 или ICOS.

В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные рецепторы, описанные в данном документе, содержат цитоплазматический сигнальный домен. В химерных рецепторах, описанных в данном документе, могут применять любой цитоплазматический сигнальный домен. В целом, цитоплазматический сигнальный домен передает сигнал, такой как взаимодействие внеклеточного лиганд-связывающего домена со своим лигандом, для стимуляции клеточного ответа, такого как индукция эффекторной функции клетки (*например*, цитотоксичность).

Как будет очевидно специалисту обычно квалификации в данной области техники, фактор, задействующий активацию Т-клеток, представляет собой фосфорилирование иммунорецепторного тирозинового мотива активации (ITAM) цитоплазматического сигнального домена. Для конструирования химерных рецепторов, описанных в данном документе, могут применять любой ITAM-содержащий домен, известный в данной области техники. В целом, мотив ITAM может

содержать два повтора из аминокислотной последовательности YxxL/I, разделенные 6-8 аминокислотами, где каждый x представляет собой независимо любую аминокислоту, создавая консервативный мотив YxxL/Ix(6-8)YxxL/I. В некоторых вариантах осуществления изобретения цитоплазматический сигнальный домен получен из CD3 ζ .

5 Примеры химерных рецепторов представлены ниже в таблице 2 и 3.

Таблица 2. Примеры компонентов химерного рецептора

Компонент химерного рецептора	Аминокислотная последовательность
Антигенсвязывающий фрагмент	Легкая цепь-GSTSSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 14)-Тяжелая цепь
Костимулирующий домен CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVA FIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 6)
Костимулирующий домен ICOS (жирный шрифт), трансмембранный домен ICOS (курсив) и часть внеклеточного домена ICOS (подчеркнуто)	<u>LSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLK</u> <i>F</i> <i>WLPIGCAAFVVCILGCILICWLTKKKYSSS</i> VHDPNGEYMFMR <i>AVNTAKKSRLTDVTL</i> (SEQ ID NO: 7)
Костимулирующий домен ICOS	CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMR AVNTA KKSRLTDVTL (SEQ ID NO: 47)
Химера CD28/ICOS (часть ICOS показана подчеркнутой), включая шарнирный домен (курсив) и трансмембранный домен (жирный шрифт) из CD28	<i>IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP</i> <i>FPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVA</i> FIIFWVRSKRSRLLHSDYMFMR <u>AVNTAKK</u> <u>SRLTDVTL</u> (SEQ ID NO: 8)
Цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 15)

10 Последовательность нуклеиновой кислоты из примеров компонентов для
конструкции химерного рецептора, представленных ниже.

Внутриклеточный сигнальный домен CD28-ДНК-человека (SEQ ID NO: 3)

ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATT
 ATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAG
 CCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTA
 5 ACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGT
 GACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCC
 STATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAG
 CGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATC
 TAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
 10 ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGC
 AGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCG
 GAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACA
 CCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

15 Внутриклеточный сигнальный домен ICOS-ДНК-человека (SEQ ID NO: 4)

СТАТСААТТТТТГАТCCTCCTCCTTTTAAAGTAACTCTTACAGGAGGATATTTGCATA
 TTTATGAATCACAАСТТТГТТGCCAGCTGAAGTТCTGGTTACCCATAGGATGTGCAG
 CCTTTGTTGTAGTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTTACAAAAAAGAA
 GTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTTCATGAGAGCAGTGAA
 20 CACAGCCAAAAAATCTAGACTCACAGATGTGACCCTAAGAGTGAAGTTCAGCAGGA
 GCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAAT
 CTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGA
 GATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTG
 CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCC
 25 GGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGAC
 ACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

КОСТИМУЛИРУЮЩАЯ СИГНАЛЬНАЯ ОБЛАСТЬ CD28/ICOS-ДНК-человека (SEQ ID NO: 5)

30 ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATT
 ATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAG
 CCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTA
 ACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGT
 GACTACATGTTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCTAGACTCACAGATGT
 35 GACCCTAAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCC

AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG
 GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
 CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGT
 GAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACC
 5 AGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG
 CCCCCTCGC

В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность
 нуклеиновой кислоты, кодирующая антигенсвязывающий фрагмент, который
 10 связывается с CD33 и содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет
 такие же CDR, как CDR в SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи,
 которая содержит такие же CDR, как CDR в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах
 осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную
 область тяжелой цепи, как представлено SEQ ID NO: 12, и вариабельную область
 15 легкой цепи, как представлено SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления
 изобретения химерный рецептор дополнительно содержит по меньшей мере
 трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен. В некоторых
 вариантах осуществления изобретения химерный рецептор дополнительно содержит
 шарнирный домен и/или костимулирующий сигнальный домен.

20 В таблице 3 представлены примеры химерных рецепторов, описанные в данном
 документе. Примеры конструкций содержат от N-конца к C-концу
 антигенсвязывающий фрагмент, трансмембранный домен и цитоплазматический
 сигнальный домен. В некоторых примерах химерный рецептор содержит шарнирный
 домен, который расположен между антигенсвязывающим фрагментом и
 25 трансмембранным доменом. В некоторых примерах химерный рецептор
 дополнительно содержит один или более костимулирующих доменов, которые могут
 располагаться между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным
 доменом.

30

Таблица 3. Примеры химерных рецепторов

Конструкц ии	Векто р	Специфи чность антигенс	Шарн ирны й	Трансмембра нный домен	Сигналь ный домен 1	Сигналь ный домен 2	Сигнал ьный домен 3
-----------------	------------	-------------------------------	-------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------

		в	до	до			
		язываю	мен				
		щего					
		фрагмент					
		а					
CART1 (SEQ ID NO: 20)	HIV _{zS} -Gfp	CD33	CD8 α	CD8	4-1BB	CD3 ζ	Нет
CART2 (SEQ ID NO: 21)	HIV _{zS} -Gfp	CD33	CD8 α	CD28	CD28	CD3 ζ	Нет
CART3 (SEQ ID NO: 22)	HIV _{zS} -Gfp	CD33	CD8 α	CD28	CD28	4-1BB	CD3 ζ
CART8 (SEQ ID NO: 23)	HIV _{zS} -Gfp	CD33	CD8 α	ICOS	ICOS	4-1BB	CD3 ζ
<i>CART4dual</i> (SEQ ID NO: 24)	HIV _{zS} -dT	CD19	CD8 α	CD28	CD3 ζ	-	-
<i>CART5dual</i> (SEQ ID NO: 25)	HIV _{zS} -Gfp	CD33	CD8 α	CD28	CD28	-	-
CART6 (SEQ ID NO: 26)	HIV _{zS} -dT	CD19	CD8 α	CD28	CD28	CD3 ζ	-
CART7 (SEQ ID NO: 27)	HIV _{zS} -Gfp	CD33	CD28	CD28 hge	CD28	CD3 ζ	-

Аминокислотные последовательности примеров химерных рецепторов, перечисленных выше в таблице 3, представлены ниже:

- 5 Аминокислотная последовательность CART1 (SEQ ID NO: 20)
 MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAW
 YQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSS

RTFGQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASG
 YFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQ GKATLTADKSSTTAYMQL
 SSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTT
 TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDIYWAPLAGTCGVLLLSLVIT
 5 KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ
 GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
 YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

Аминокислотная последовательность CART2 (SEQ ID NO: 21)

10 MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAW
 YQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSS
 RTFGQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASG
 YFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQ GKATLTADKSSTTAYMQL
 SSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTT
 15 PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWVLVVVGGVLACYSLLV
 TVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRS
 ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
 QKDKMAEAAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

20 Аминокислотная последовательность CART3 (SEQ ID NO: 22)

MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAW
 YQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSS
 RTFGQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASG
 YFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQ GKATLTADKSSTTAYMQL
 25 SSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTT
 TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWVLVVVGGVLACYSLLV
 VTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKRGRKK
 LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY
 NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAAYSEIGM
 30 KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

Аминокислотная последовательность CART8 (SEQ ID NO: 23)

MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAW
 YQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSS
 35 RTFGQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASG

YTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQ GKATLTADKSSTTAYMQL
 SSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGT TVTVSSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTT
 TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFWLP IGC AAFVVVCILGCILI
 CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSR L TDVTLTKRGRKKLLYIFKQPFMR
 5 PVQTTQEEDGCSCRFP EEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
 DVLDKRRGRDP E MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD
 GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

Аминокислотная последовательность CART4dual (SEQ ID NO: 24)

10 MWLQSLLLLGTVAC SISIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDG
 TVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG
 TKLEIGSTSGSGKPGSGEGSTKGLQESG PGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIR
 QPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
 AKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPA
 15 PTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP E MGGKPRRKNPQ
 EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALP
 PR

20 Аминокислотная последовательность CART5dual (SEQ ID NO: 25)

MWLQSLLLLGTVAC SISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTM SCKSSQS VFFSSSQKNYLAW
 YQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSS
 RTFGQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGA EVVKPGASVKMSCKASG
 YTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQ GKATLTADKSSTTAYMQL
 25 SSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGT TVTVSSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTT
 TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWVLVVGGVLACYSLL
 VTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

Аминокислотная последовательность CART6 (SEQ ID NO: 26)

30 MWLQSLLLLGTVAC SISIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDG
 TVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG
 TKLEIGSTSGSGKPGSGEGSTKGLQESG PGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIR
 QPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
 AKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPA
 35 PTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQ
 GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
 YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

5 Аминокислотная последовательность CART7 (SEQ ID NO: 27)

MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAW
 YQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSS
 RTFGQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASG
 YFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQKATLTADKSSTTAYMQL
 10 SSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVK
 GKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMN
 MTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR
 EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMGERRRGKG
 HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

15

Последовательности нуклеиновых кислот примеров химерных рецепторов,
 перечисленных выше в таблице 3, представлены ниже:

Последовательность нуклеиновой кислоты CART1 (SEQ ID NO: 38)

20 GGTGTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTG
 CTGGGCACCGTGGCCTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCT
 CTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAG
 CGTGTCTTCAGCAGCTCCCAGAAGA ACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGATCCCC
 GGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCCAGAGAAAGCGGCGTG
 25 CCCGATAGATTACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCCTGACAATCAGCA
 GCGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCG
 GACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCAGCACAAGCGGCAG
 CGGAAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGCA
 GCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCC
 30 AGCGGCTACACCTTACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGGAC
 AGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACA
 ACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCG
 CCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGC
 CAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGAC
 35 CGTGTCTAGCGCCCTGAGCAACAGCATCATGTA CTTCAGCCACTTCGTGCCCCGTG

TTTCTGCCCCGCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCCTAGACCTCCTACCCCAGCCCC
 TACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCT
 GGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGCCTGGATATCTACATCTGGGCCCCACTGGCCG
 GCACCTGTGGCGTGCTGCTGTCTCTCGTGATCACCAAGAGAGGGCCGGAAGAA
 5 GCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGCAGACCACCCAGGAA
 GAGGACGGCTGTAGCTGCCGGTTCCTCCGAGGAAGAAGAAGGGGGCTGCGAGCTG
 AGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTATCAGCAGGGCCAGAAC
 CAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGAC
 AAGCGGAGAGGCAGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAACCC
 10 TCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACTC
 CGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGGAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGACTGT
 ACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGG
 CCCTGCCCCCAGATGAAATTCATCGACGTAACTATTCTAG

15 Последовательность нуклеиновой кислоты CART2 (SEQ ID NO: 39)

GGTGTCTGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTG
 CTGGGCACCGTGGCCTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCT
 CTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGAGCGGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAG
 CGTGTCTTTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGATCCCC
 20 GGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTG
 CCCGATAGATTACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCA
 GCGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCG
 GACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCAGCACAAGCGGCAG
 CGGAAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGCA
 25 GCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCC
 AGCGGCTACACCTTCACCAGTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGGAC
 AGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACA
 ACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCG
 CCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGC
 30 CAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGAC
 CGTGTCTGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGTGTTTC
 TGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCCTAGACCTCCTACCCCAGCCCCTAC
 AATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGC
 GGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTTCGTG
 35 GGCGGAGTGCTGGCCTGTTACAGCCTGCTCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTG

GGTGCGCAGCAAGCGGTCTAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCC
 CAGAAGGCCAGGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCCTTACGCCCCTCCCAGAGA
 CTTCGCCGCCTACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCC
 TATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAA
 5 GAGTACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAA
 GCCCAGACGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAA
 GATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGCATGAAGGGCGAACGGCGGAGAGGCAA
 GGGACACGATGGACTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGA
 CGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGATGAAATTCATCGACGTAACTATT
 10 CTAG

Последовательность нуклеиновой кислоты CART3 (SEQ ID NO: 40)

GGTGTTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTG
 CTGGGCACCGTGGCCTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCT
 15 CTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAG
 CGTGTTCCTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGATCCCC
 GGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCCAGAGAAAGCGGCGTG
 CCCGATAGATTACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCA
 GCGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCG
 20 GACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCAGCACAAAGCGGCAG
 CGGAAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGCA
 GCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCC
 AGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGGAC
 AGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACA
 25 ACCAGAAGTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCG
 CCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGC
 CAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGAC
 CGTGTCTAGCGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCCGTG
 TTTCTGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCTAGACCTCCTACCCAGCCCC
 30 TACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCT
 GGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTC
 GTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTACAGCCTGCTCGTGACAGTGGCCTTCATCATCT
 TTTGGGTGCGCAGCAAGCGGTCTAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGAC
 CCCCAGAAGGCCAGGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCCTTACGCCCCTCCCAGA
 35 GACTTCGCCGCCTACAGATCCAAGAGAGGCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTCA

AGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGCAGACCACCCAGGAAGAGGACGGCTGTAGCT
 GCCGGTTCCTCCGAGGAAGAAGAAGGGGGCTGCGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCA
 GAAGCGCCGACGCCCCTGCCTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGC
 TGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCCGG
 5 GACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTAT
 AACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGAATGAAG
 GGCGAGCGGCGGAGAGGCAAGGGACACGATGGACTGTACCAGGGCCTGAGCACC
 GCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGATGAA
 ATTCATCGACGTAACTATTCTAG

10

Последовательность нуклеиновой кислоты CART4dual (SEQ ID NO: 41)

GGTGTCTGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTG
 CTGGGCACCGTGGCCTGCAGCATCAGCATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGC
 CTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGAC
 15 ATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAAGCTG
 CTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCTCTAGATTTTCCGGCA
 GCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATAT
 CGCTACCTACTTCTGTGTCAGCAAGGCAACACCCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGC
 ACCAAGCTGGAAATCGGCAGCACAAGCGGCTCTGGCAAGCCTGGATCTGGCGAG
 20 GGCTCTACCAAGGGCCTGCAGGAATCTGGCCCTGGACTGGTGGCCCCTAGCCAGA
 GCCTGTCTGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCTGACTATGGCGTGTCC
 TGGATCAGACAGCCCCCAGAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGC
 AGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAG
 GACAACCTCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGAC
 25 ACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGG
 ACTACTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACCGTGTCTGCCCTGAGCAACAGCATCAT
 GTACTIONCAGCCACTTCGTGCCCGTGTCTGCCCCGCAAGCCTACCACAACCCCTG
 CCCCTAGACCTCCTACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAG
 GCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGA
 30 CAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTATAGCCTG
 CTCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCGTGAAGTTCAGCCGCAGCG
 CCGATGCCCTGCCTATCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCT
 GGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCCGGGACCCTG
 AGATGGGCGGCAAGCCCAGAAGAAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAAC
 35 TGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAAC

GGCGGAGAGGCAAGGGCCACGATGGACTGTATCAGGGCCTGAGCACCGCCACCA
 AGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCTCTGCCCCCTCGCTGAAATTCATC
 GACGTТААСТАТТСТAG

5 Последовательность нуклеиновой кислоты CART5dual (SEQ ID NO: 42)

GGTGTTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTG
 CTGGGCACCGTGGCCTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCT
 CTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAG
 CGTGTTCCTCAGCAGCTCCCAGAAGAАСТАСТGGCCTGGTATCAGCAGATCCCC
 10 GGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTG
 CCCGATAGATTACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCA
 GCGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCG
 GACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCAGCACAAGCGGCAG
 CGGAAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGCA
 15 GCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCC
 AGCGGCTACACCTTACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGGAC
 AGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACA
 ACCAGAAGTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCG
 CCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGC
 20 CAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGAC
 CGTGTCTAGCGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCCTG
 TTTCTGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCTAGACCTCCTACCCCAGCCCC
 TACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCT
 GGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTC
 25 GTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTACAGCCTGCTCGTGACAGTGGCCTTCATCATCT
 TTTGGGTGCGCAGCAAGCGGTCTAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGAC
 CCCAGAAGGCCAGGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCCTTACGCCCTCCCAGA
 GACTTCGCCCGCCTACAGAAGCTGAAATTCATCGACGTТААСТАТТСТAG

30 Последовательность нуклеиновой кислоты CART6 (SEQ ID NO: 43)

GGTGTTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTG
 CTGGGCACCGTGGCCTGCAGCATCAGCATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGC
 CTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGAC
 ATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAAGCTG
 35 CTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCTCTAGATTTTCCGGCA

GCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATAT
 CGCTACCTACTTCTGTCAGCAAGGCAACACCCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGC
 ACCAAGCTGGAAATCGGCAGCACAAGCGGCTCTGGCAAGCCTGGATCTGGCGAG
 GGCTCTACCAAGGGCCTGCAGGAATCTGGCCCTGGACTGGTGGCCCCTAGCCAGA
 5 GCCTGTCTGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCCTGACTATGGCGTGTCC
 TGGATCAGACAGCCCCCAGAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGC
 AGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAG
 GACAACCTCCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGAC
 ACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGG
 10 ACTACTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACCGTGTCTGCCCTGAGCAACAGCATCAT
 GTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGTGTCTTCTGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTG
 CCCCTAGACCTCCTACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAG
 GCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGA
 CAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTATAGCCTG
 15 CTCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGGAGCCGGCTGC
 TGCACTCCGACTACATGAACATGACCCCCAGACGGCCAGGCCCCACCCGGAAC
 ACTATCAGCCTTACGCCCTCCCAGAGACTTCGCCGCCTACCGGTCCAGAGTGAA
 GTTCAGCAGATCCGCCGACGCCCTGCCTATCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTAC
 AACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGAAG
 20 AGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGAAGAAAGAACCCCCAGGAAG
 GCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCG
 GCATGAAGGGCGAACGGCGGAGAGGCAAGGGCCACGATGGACTGTATCAGGGCC
 TGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCTCTGCCCCC
 TCGCTGAAATTCATCGACGTAACTATTCTAG

25

Последовательность нуклеиновой кислоты CART7 (SEQ ID NO: 44)

GGTGTTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTG
 CTGGGCACCGTGGCCTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCT
 CTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGAGCGGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAG
 30 CGTGTTCCTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGATCCCC
 GGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCCAGAGAAAGCGGCGTG
 CCCGATAGATTACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCA
 GCGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCG
 GACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCAGCACAAGCGGCAG
 35 CGGAAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGCA

GCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCC
 AGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGGAC
 AGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACA
 ACCAGAAGTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCG
 5 CCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGC
 CAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGAC
 CGTGTCCAGCATCGAAGTGATGTACCCCCCTCCCTACCTGGACAACGAGAAGTCC
 AACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGCCCCAGCCCTCTGTTTC
 CTGGCCCTAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTG
 10 TTACAGCCTGCTCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGG
 TCTAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCAGAAGGCCAGGCCCC
 ACCCGGAAGCACTATCAGCCTTACGCCCCTCCCAGAGACTTCGCCGCCTACCGGT
 CCAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTATCAGCAGGGCCAGA
 ACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGG
 15 ACAAGCGGAGAGGCAGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAAC
 CCTCAGGAAGGCCTGTATAACGAAGTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTAC
 TCCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGACT
 GTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCA
 GGCCCTGCCCCCAGATGAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

20

Любой из химерных рецепторов, описанных в данном документе, могут
 получать обычным способом, таким как рекомбинантная технология. Способы
 получения химерных рецепторов в данном настоящем документе включают создание
 нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, содержащий каждый из доменов
 25 химерных рецепторов, включая антигенсвязывающий фрагмент и, необязательно,
 шарнирный домен, трансмембранный домен, по меньшей мере один костимулирующий
 сигнальный домен и цитоплазматический сигнальный домен. В некоторых вариантах
 осуществления изобретения нуклеиновые кислоты, кодирующая каждый из
 компонентов химерного рецептора, соединены вместе с использованием
 30 рекомбинантной технологии.

Последовательности каждого из компонентов химерных рецепторов могут
 получать посредством обычной технологии, *например*, амплификации ПЦР из любого
 из разнообразных источников, известных в данной области техники. В некоторых
 вариантах осуществления изобретения последовательности одного или более
 35 компонентов химерных рецепторов получены из клетки человека. Альтернативно,

могут синтезировать последовательности одного или более компонентов химерных рецепторов. Последовательности каждого из компонентов (*например*, доменов) могут соединяться прямо или опосредованно (*например*, с помощью последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей пептидный линкер) с образованием

5 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный рецептор, с использованием таких методов, как амплификация ПЦР или лигирование.

Альтернативно, могут синтезировать нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный рецептор. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В других вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой РНК.

10 Мутация одного или более остатков в пределах одного или более компонентов химерного рецептора (*например*, антигенсвязывающего фрагмента и т. д.), перед или после соединения последовательностей каждого из компонентов. В некоторых вариантах осуществления изобретения могут создавать одну или более мутаций в

15 компоненте химерного рецептора для модуляции (увеличения или уменьшения) аффинности компонента для мишени (*например*, антигенсвязывающего фрагмента для целевого антигена) и/или модуляции активности компонента.

Любой из химерных рецепторов, описанных в данном документе, могут внедрять в подходящую иммунную клетку для экспрессии посредством традиционной технологии. В

20 некоторых вариантах осуществления изобретения иммунные клетки представляют собой Т-клетки, такие как первичные Т-клетки или Т-клеточные линии. Альтернативно, иммунные клетки могут представлять собой НК-клетки, такие как устойчивые НК-клеточные линии (*например*, клетки НК-92). В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунные клетки представляют собой Т-клетки, которые экспрессируют

25 CD8 (CD8⁺) или CD8 и CD4 (CD8⁺/CD4⁺). В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетки представляют собой Т-клетки, устойчивой Т-клеточной линии, клетки 293Т или клетки Jurkat.

Первичные Т-клетки могут получать из любого источника, такого как мононуклеары периферической крови (МНПК), костный мозг или ткани, такие как

30 селезенка, лимфатический узел, тимус или опухолевая ткань. Источник, подходящий для получения требуемого типа иммунных клеток, будет очевиден для специалиста в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция иммунных клеток получена от пациента-человека, имеющего гемопоэтическое злокачественное новообразование, например из костного мозга или из МНПК,

35 полученных от пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция

иммунных клеток представляет получена от здорового донора. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунные клетки получают от субъекта, которому впоследствии будут вводить иммунные клетки, экспрессирующие химерные рецепторы. Иммунные клетки, которые вводят тому же субъекту, от которого получены эти клетки, называются аутологичными клетками, тогда как иммунные клетки, полученные от субъекта, который не является субъектом, которому будут вводить эти клетки, называются аллогенными клетками.

Требуемый тип клеток-хозяев могут размножать в пределах популяции клеток, полученных путем совместного инкубирования клеток со стимулирующими молекулами, например могут использовать для размножения Т-клеток антителами против CD3 и против CD28.

Чтобы конструировать иммунные клетки, которые экспрессируют любую из конструкций химерного рецептора, могут конструировать экспрессионные векторы для стабильной или временной экспрессии конструкции химерного рецептора посредством традиционных способов, как описано в данном документе, и внедрять в иммунные клетки-хозяева. Например, нуклеиновые кислоты, кодирующие химерные рецепторы, могут клонировать в подходящий экспрессионный вектор, такой как вирусный вектор, в функциональной связи с подходящим промотором. Нуклеиновые кислоты и вектор могут приводить в контакт в подходящих условиях с рестрикционным ферментом для создания комплементарных концов на каждой молекуле, которые могут образовывать пару друг с другом и соединяться с помощью лигазы. Альтернативно, синтетические нуклеиновокислотные линкеры могут лигировать с концами нуклеиновой кислоты, кодирующей химерные рецепторы. Синтетические линкеры могут содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые соответствуют конкретному сайту рестрикции в векторе. Выбор экспрессионных векторов/плазмид/вирусных векторов будет зависеть от типа клеток-хозяев для экспрессии химерных рецепторов, но должен подходить для интеграции и репликации в эукариотических клетках.

Для экспрессии описанных в данном документе химерных рецепторов могут использовать различные промоторы, включая, без ограничения, промежуточный ранний промотор цитомегаловируса (CMV), вирусный LTR, такой как LTR вируса саркомы Рауса, HIV-LTR, HTLV-1 LTR, LTR вируса мышинной лейкемии Малони (MMLV), LTR вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), LTR вируса некроза селезенки (SFFV), ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса простого герпеса tk, промотор фактора элонгации 1-альфа (EF1- α) с интроном EF1- α или без него. Дополнительные промоторы для экспрессии химерных рецепторов включают любой конститутивно

активный промотор в иммунной клетке. Альтернативно, может использоваться любой регулируемый промотор, так что его экспрессия может модулироваться в иммунной клетке.

Кроме того, вектор может содержать, например, некоторые или все из следующего:

5 селектируемый маркерный ген, такой как ген неомицина, для отбора стабильных или временных трансфектантов в клетках-хозяевах; энхансерные/промоторные последовательности из немедленно-раннего гена CMV человека для высоких уровней транскрипции; сигналы терминации транскрипции и процессинга РНК из SV40 для стабильности мРНК; 5' - и 3' -нетранслируемые области для стабильности мРНК и
10 эффективности трансляции из высокоэкспрессируемых генов, как α -глобин или β -глобин, точки начала репликации полиомавируса SV40 и ColE1 для правильной эписомальной репликации; внутренние сайты связывания рибосом (IRES), универсальные сайты множественного клонирования; промоторы РНК T7 и SP6 для транскрипции смысловой и антисмысловой РНК *in vitro*; «суицидальный переключатель» или «суицидальный ген»,
15 который при срабатывании заставляет клетки, несущие вектор, погибать (например, тимидинкиназа HSV или индуцибельная каспаза, такая как iCasp9), и репортерный ген для оценки экспрессии химерного рецептора. См. ниже раздел VI. Подходящие векторы и способы получения векторов, содержащих трансгены, хорошо известны и доступны в данной области техники. Примеры создания векторов для экспрессии химерных
20 рецепторов, можно найти, например, в US 2014/0106449, который в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления конструкция химерного рецептора или нуклеиновая кислота, кодирующая указанный химерный рецептор, представляет собой молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция химерного рецептора
25 или нуклеиновая кислота, кодирующая указанный химерный рецептор, представляет собой ДНК-вектор и может вводиться в иммунные клетки электропорацией (см., например, Till, et al. Blood (2012) 119(17): 3940-3950). В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая химерный рецептор, представляет собой молекулу РНК, которая может вводиться в иммунные клетки
30 электропорацией.

Любой из векторов, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует конструкцию химерного рецептора, описанную в данном документе, также входит в объем настоящего раскрытия. Такой вектор может быть доставлен в клетки хозяина, такие как иммунные клетки хозяина, подходящим способом. Способы
35 доставки векторов в иммунные клетки хорошо известны в данной области техники и

могут включать электропорацию ДНК, РНК или транспозонов, трансфекционные реагенты, такие как липосомы или наночастицы для доставки ДНК, РНК или транспозонов; доставку ДНК, РНК, транспозонов или белка путем механической деформации (см., *например*, Sharei et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2013) 110(6): 2082-2087); или вирусную трансдукцию. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы для экспрессии химерных рецепторов доставляются в клетки-хозяина путем вирусной трансдукции. Примеры вирусных способов доставки включают, но не ограничиваются ими, рекомбинантные ретровирусы (см., *например*, публикации РСТ № WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218 и WO 91/02805; патенты США № 5 219 740 и 4 777 127; патент Великобритании № 2 200 651; и патент ЕР № 0 345 242), векторы на основе альфавирусов и векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (см., *например*, публикации РСТ № WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 и WO 95/00655). В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы для экспрессии химерных рецепторов представляют собой ретровирусы. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы для экспрессии химерных рецепторов представляют собой лентивирусы. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы для экспрессии химерных рецепторов представляют собой аденоассоциированные вирусы.

В примерах, в которых векторы, кодирующие химерные рецепторы внедряются в клетки-хозяева с использованием вирусного вектора, вирусные частицы, которые способны инфицировать иммунные клетки и нести вектор, могут получать любым способом, известным в данной области техники, и их можно найти, например, в заявке РСТ № WO 1991/002805 A2, WO 1998/009271 A1 и патенте США 6 194 191. Вирусные частицы собирают из супернатанта клеточной культуры, и их могут выделять и/или очищать перед приведением в контакт вирусных частиц с иммунными клетками.

Способы подготовки клеток-хозяев, экспрессирующих любой из описанных в данном документе химерных рецепторов, могут включать активацию и/или размножение иммунных клеток *ex vivo*. Активация клетки-хозяина означает стимуляцию клетки-хозяина до активированного состояния, в котором клетка может выполнять эффекторные функции (*например*, цитотоксичность). Способы активации клетки-хозяина будут зависеть от типа клетки-хозяина, используемой для экспрессии химерных рецепторов. Размножение клеток-хозяев может включать любой способ, который приводит к увеличению количества клеток, экспрессирующих химерные рецепторы, например, позволяя клеткам-хозяевам пролиферировать или стимулируя пролиферацию клеток-хозяев. Способы стимуляции размножения клеток-хозяев будут зависеть от типа клетки-

хозяина, используемой для экспрессии химерных рецепторов, и будут очевидны специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, экспрессирующие любой из химерных рецепторов, описанных в данном документе, активируют и/или размножают *ex vivo* перед введением субъекту.

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты, нацеливающие линиеспецифический антиген клеточной поверхности представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC). Как будет очевидно для специалиста в данной области техники, термин «конъюгат антитело-лекарственное средство» может использоваться взаимозаменяемо с термином «иммунотоксин» и относится к молекуле
10 слияния, содержащей антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент), конъюгированное с токсином или лекарственной молекулой. Связывание антитела с соответствующим антигеном позволяет доставлять токсин или лекарственную молекулу в клетку, которая представляет антиген на своей клеточной поверхности (*например*, клетка-мишень), что приводит к гибели клетки-мишени.

15 В некоторых вариантах осуществления изобретения агент представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство содержит антигенсвязывающий фрагмент и токсин или лекарственное средство, которое индуцирует цитотоксичность в клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат антитело-
20 лекарственное средство нацеливает антиген 2 типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство нацеливает CD33 или CD19.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент конъюгата антитело-лекарственное средство содержит такие же CDR тяжелой
25 цепи, как переменная область тяжелой цепи, представленная SEQ ID NO: 12, и такие же CDR легкой цепи, как переменная область легкой цепи, представленная SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент конъюгата антитело-лекарственное средство содержит переменную область тяжелой цепи, представленную SEQ ID NO: 12, и такую же переменную область легкой цепи,
30 представленную SEQ ID NO: 13.

Токсины или лекарственные средства, совместимые для применения в конъюгате антитело-лекарственное средство, хорошо известны в данной области техники и будет очевидно специалисту средней квалификации в данной области техники. См., *например*, Peters et al. *Biosci. Rep.*(2015) 35(4): e00225; Beck et al. *Nature Reviews Drug Discovery*

(2017) 16:315-337; Marin-Acevedo et al. *J. Hematol. Oncol.*(2018)11: 8; Elgundi et al. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2017) 122: 2-19.

В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство может дополнительно содержать линкер (*например*, пептидный линкер, такой как расщепляемый линкер), присоединяя антитело и молекулу лекарственного средства. Примеры конъюгатов антитело-лекарственное средство включает, без ограничений, брентуксимаб ведотин, глембатумаб ведотин/CDX-011, депатуксизумаб мафодотин/ABT-414, PSMA ADC, полатузумаб ведотин/RG7596/DCDS4501A, денинтузумаб мафодотин/SGN-CD19A, AGS-16C3F, CDX-014, RG7841/DLYE5953A, RG7882/DMUC406A, RG7986/DCDS0780A, SGN-LIV1A, энфортумаб ведотин/ASG-22ME, AG-15ME, AGS67E, телисотузумаб ведотин/ABBV-399, ABBV-221, ABBV-085, GSK-2857916, тисотумаб ведотин/HuMax-TF-ADC, HuMax-Ax1-ADC, пинатузумаб ведотин/RG7593/DCDT2980S, лифастузумаб ведотин/RG7599/DNIB0600A, индусатумаб ведотин/MLN-0264/ТАК-264, вандортузумаб ведотин/RG7450/DSTP3086S, софитузумаб ведотин/RG7458/DMUC5754A, RG7600/DMOT4039A, RG7336/DEDN6526A, ME1547, PF-06263507/ADC 5T4, трастузумаб эмтансин/T-DM1, мирветуксимаб соравтансин/ IMGN853, колтуксимаб равтансин/SAR3419, наратуксимаб эмтансин/IMGN529, индатуксимаб равтансин/BT-062, анетумаб равтансин/BAY 94-9343, SAR408701, SAR428926, AMG 224, PCA062, HKT288, LY3076226, SAR566658, лорвотузумаб мертансин/IMGN901, кантузумаб мертансин/SB-408075, кантузумаб равтансин/IMGN242, лапритуксимаб эмтансин/IMGN289, IMGN388, биватузумаб мертансин, AVE9633, ВІВ015, MLN2704, AMG 172, AMG 595, LOP 628, вадастуксимаб талирин/SGN-CD33A, SGN-CD70A, SGN-CD19B, SGN-CD123A, SGN-CD352A, ровалпитузумаб тесириин/SC16LD6.5, SC-002, SC-003, ADC-301/HuMax-TAC-PBD, ADC-402, MEDI3726/ADC-401, IMGN779, IMGN632, гемтузумаб озогамидин, инотузумаб озогамидин/ CMC-544, PF-06647263, CMC-193, CMC-401, трастузумаб дуокармазин/SYD985, BMS-936561/MDX-1203, сацитузумаб говитекан/IMMU-132, лабетузумаб говитекан/IMMU-130, DS-8201a, U3-1402, милатузумаб доксорубицин/IMMU-110/hLL1-DOX, BMS-986148, RC48-ADC/хертузумаб-vc-MMAE, PF-06647020, PF-06650808, PF-06664178/RN927C, лупартумаб амадотин/ BAY1129980, апрутумаб иксадотин/BAY1187982, ARX788, AGS62P1, XMT-1522, AbGn-107, MEDI4276, DSTA4637S/RG7861. В одном примере конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой гемтузумаб озогамидин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание конъюгата антитело-лекарственное средство с эпитопом линиеспецифического белка клеточной

поверхности индуцирует интернализацию конъюгата антитело-лекарственное средство, и лекарственное средство (или токсин) может высвободиться внутриклеточно. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание конъюгата антитело-лекарственное средство с эпитопом линиеспецифического белка клеточной поверхности индуцирует интернализацию токсина или лекарственного средства, которая позволяет токсину или лекарственному средству уничтожать клеток, экспрессирующих линиеспецифический белок (клетки-мишени). В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание конъюгата антитело-лекарственное средство с эпитопом линиеспецифического белка клеточной поверхности индуцирует интернализацию токсина или лекарственного средства, которая может регулировать активность клетки, экспрессирующей линиеспецифический белок (клетки-мишени). Тип токсина или лекарственного средства, применяемого в конъюгатах антитело-лекарственное средство, описанных в данном документе, не ограничивается любым специфическим типом.

ADC, описанные в данном документе, могут применять как дополнительное лечение у субъектов, которые прошли комбинированную терапию, как описано в данном документе.

Гемопозитические клетки, дефектные по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности

В настоящем описании также предлагаются гемопозитические клетки, такие как гемопозитические стволовые клетки (HSC) и/или гемопозитические клетки-предшественники (HPC), которые были генетически модифицированы, чтобы быть дефектными по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности (*например*, CD33, например, с использованием нРНК, описанной в данном документе, например, причем нРНК содержит нуклеотидную последовательность AUCCUGGCACUCUAGAACC (SEQ ID NO: 67) или CCUCACUAGACUUGACCCAC (SEQ ID NO: 70)). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки содержат генетическую мутацию в сайте, имеющем последовательность ATCCCTGGCACTCTAGAACC (SEQ ID NO: 50) или CCTCACTAGACTTGACCCAC (SEQ ID NO: 58). В некоторых вариантах осуществления изобретения гемопозитические клетки представляют собой HSC, HPC или их комбинации, называются в данном документе как «HSPC» («гемопозитические стволовые клетки и/или клетки-предшественники»). В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция клеток, описанная в данном документе, содержит множество гемопозитических стволовых клеток; в некоторых вариантах осуществления изобретения популяция клеток, описанная в данном документе, содержит множество гемопозитических клеток-

предшественников; и в некоторых вариантах осуществления изобретения популяция клеток, описанная в данном документе, содержит множество гемопоэтических стволовых клеток и множество гемопоэтических клеток-предшественников. HSC способны давать повышение содержания как миелоидных, так и лимфоидных клеток-предшественников, что дополнительно дает повышение содержания миелоидных клеток (*например*, моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, базофилов, дендритных клеток, эритроцитов, тромбоцитов и т. д.) и лимфоидных клеток (*например*, Т-клеток, В-клеток, НК-клеток), соответственно. HSC характеризуются экспрессией маркера CD34 клеточной поверхности (*например*, CD34⁺), который могут применять для идентификации и/или выделения HSC, и отсутствием маркеров клеточной поверхности, ассоциированных с принадлежностью к некоторой клеточной линии. Поэтому, в некоторых вариантах осуществления изобретения HSC представляют собой CD34⁺.

В некоторых вариантах осуществления изобретения HSC получают от такого субъекта, как субъект-млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект-млекопитающее является приматом, не являющимся человеком, грызуном (*например*, мышью или крысой), крупным рогатым скотом, свиньей, лошадью или домашним животным. В некоторых вариантах осуществления изобретения HSC получены от здорового донора. В некоторых вариантах осуществления изобретения HSC получают от субъекта, которому впоследствии будут вводить иммунные клетки, экспрессирующие химерные рецепторы. HSC, которые вводят тому же субъекту, от которого получены эти клетки, называются аутологичными клетками, тогда как HSC, полученные от субъекта, который не является субъектом, которому будут вводить эти клетки, называются аллогенными клетками.

HSC могут получать от любого подходящего источника с использованием традиционных средств, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления изобретения HSC получены из образца субъекта, такого как образец костного мозга или образец крови. Альтернативно или дополнительно, HSC могут получать из пуповины. В некоторых вариантах осуществления изобретения HSC получают из костного мозга или мононуклеаров периферической крови (МНПК). В целом, клетки костного мозга могут получать из гребня подвздошной кости, бедренной кости, большеберцовой кости, позвоночника, ребра или других костномозговых полостей субъекта. Костный мозг могут отбирать у пациента и выделять с помощью различных процедур разделения и промывки, известных в данной области техники. Пример процедуры выделения клеток костного мозга включает следующие стадии: а) выделение

клеток костного мозга; b) разделение центрифугированием суспензии костного мозга на три фракции и сбор промежуточной фракции или лейкотромбоцитарного слоя; c) центрифугирование фракции лейкотромбоцитарного слоя со стадии (b) еще раз в разделительной жидкости, обычно Ficoll(TM), и сбор промежуточной фракции, содержащей клетки костного мозга; и d) отмывка собранной фракции со стадии (c) для выделения подходящих для обратной трансплантации клеток костного мозга.

HSC обычно находятся в костном мозге, но могут быть мобилизованы в циркулирующую кровь путем введения мобилизующего агента для сбора HSC из периферической крови. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъекту, от которого получены HSC, вводят мобилизующий агент, такой как гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF). Количество HSC, собранных после мобилизации с использованием мобилизующего агента, обычно больше, чем количество клеток, полученных без использования мобилизующего агента. В некоторых вариантах осуществления изобретения HSC представляют собой HSC периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления изобретения образец получают у субъекта и затем обогащают требуемым типом клеток (*например*, клетками CD34⁺/CD33⁻). Например, МНПК и/или гемопоэтические клетки CD34⁺ могут выделять из крови, как описано в данном документе. Клетки также могут выделять из других клеток, например путем выделения и/или активации с помощью антитела, связывающегося с эпитопом на клеточной поверхности требуемого типа клеток. Другой способ, который могут использовать, включает отрицательный отбор с использованием антител к маркерам клеточной поверхности для селективного обогащения определенным типом клеток без активации клетки путем взаимодействия с рецептором.

Популяции HSC могут размножать до или после генетического конструирования HSC для превращения в дефектные по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности. Клетки могут культивировать в условиях, которые включают в себя среду для размножения, содержащую один или более цитокинов, таких как фактор стволовых клеток (SCF), лиганд Flt-3 (Flt3L), тромбопоэтин (TPO), интерлейкин 3 (IL-3) или интерлейкин 6 (IL-6). Клетку могут размножать в течение около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 дней или любого необходимого диапазона. В некоторых вариантах осуществления изобретения HSC размножают после выделения требуемой клеточной популяции (*например*, CD34⁺/CD33⁻) из образца, полученного из субъекта и до генетической инженерии. В некоторых вариантах осуществления изобретения HSC размножают после генетической инженерии, тем самым селективно размножая клетки, которые проходят генетическую модификацию и являются

дефектными по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетку («клон») или несколько клеток, имеющих требуемую характеристику (*например*, фенотип или генотип) после генетической модификации, могут отбирать и независимо размножать.

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения гемопоэтические клетки генетически сконструированы, чтобы быть дефектными (*например*, не экспрессируют) по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности (*например*, CD33). В некоторых вариантах осуществления изобретения гемопоэтические клетки генетически сконструированы, чтобы быть дефектными по такому же линиеспецифическому антигену

10 клеточной поверхности, который нацеливается агентом. Используемая в данном документе гемопоэтическая клетка считается дефектной по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности, если гемопоэтическая клетка имеет по существу пониженную экспрессию линиеспецифического антигена клеточной поверхности по сравнению с гемопоэтической клеткой природного происхождения такого же типа, как

15 генетически сконструированная гемопоэтическая клетка (*например*, характеризуется наличием тех же маркеров клеточной поверхности, такие как CD34). В некоторых вариантах осуществления изобретения гемопоэтическая клетка не имеет выявляемой экспрессии линиеспецифического антигена клеточной поверхности (*например*, не экспрессирует линиеспецифический антиген клеточной поверхности). Уровень

20 экспрессии линиеспецифического антигена клеточной поверхности могут оценивать любыми средствами, известными в данной области техники. Например, уровень экспрессии линиеспецифического антигена клеточной поверхности могут оценивать путем выявления антигена с помощью антигенспецифического антитела (*например*, методами проточной цитометрии, вестерн-блоттингом).

25 В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессию линиеспецифического антигена клеточной поверхности на генетически сконструированной гемопоэтической клетке сравнивают с экспрессией линиеспецифического антигена клеточной поверхности на гемопоэтической клетке природного происхождения (*например*, аналоге дикого типа). В некоторых вариантах

30 осуществления изобретения результаты генетической инженерии по восстановлению уровня экспрессии линиеспецифического антигена клеточной поверхности на по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по сравнению с экспрессией линиеспецифического антигена клеточной поверхности на гемопоэтической клетке природного происхождения. А именно, в некоторых вариантах

35 осуществления изобретения генетически сконструированная гемопоэтическая клетка

экспрессирует менее около 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% линиеспецифического антигена клеточной поверхности (*например*, CD33) по сравнению с гемопоэтической клеткой природного происхождения (*например*, аналогом природного происхождения).

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения результаты генетической инженерии по восстановлению уровня экспрессии линиеспецифического антигена клеточной поверхности (*например*, CD33) на по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по сравнению с экспрессией уровня линиеспецифического антигена дикого типа клеточной поверхности на
10 гемопоэтической клетке природного происхождения. А именно, в некоторых вариантах осуществления изобретения генетически сконструированная гемопоэтическая клетка экспрессирует менее около 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% линиеспецифического антигена дикого типа клеточной поверхности (*например*, CD33) по сравнению с гемопоэтической клеткой
15 природного происхождения (*например*, аналогом природного происхождения).

В некоторых вариантах осуществления изобретения гемопоэтическая клетка является дефектной по целому эндогенному гену, кодирующему линиеспецифический антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления изобретения целый эндогенный ген, кодирующий линиеспецифический антиген клеточной
20 поверхности, был удален. В некоторых вариантах осуществления изобретения гемопоэтическая клетка содержит часть эндогенного гена, кодирующего линиеспецифический антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления изобретения гемопоэтическая клетка, экспрессирующая часть (*например*, усеченный белок) линиеспецифического антигена клеточной поверхности. В других
25 вариантах осуществления изобретения часть эндогенного гена, кодирующая линиеспецифический антиген клеточной поверхности, была удалена. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или более гена, кодирующего линиеспецифический антиген клеточной поверхности, было удалено.

30 Как будет понятно специалисту средней квалификации в данной области техники, часть нуклеотидной последовательности, кодирующей линиеспецифический антиген клеточной поверхности, или одна или более некодирующих последовательностей могут удаляться, так что гемопоэтическая клетка становится дефектной по антигену (*например*, имеет существенно пониженную экспрессию антигена).

В некоторых вариантах осуществления изобретения линиеспецифический антиген клеточной поверхности представляет собой CD33. Предполагаемая структура CD33 содержит два иммуноглобулиновых домена, домен IgV и домен IgC2. В некоторых вариантах осуществления изобретения часть иммуноглобулинового C-домена CD33 удалена.

Любую из генетически сконструированных гемопоэтических клеток, таких как HSC, которые дефектны по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности, могут получать обычным способом или способом, описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения генная инженерия выполняется с использованием редактирования генома. Используемый в данном документе термин «редактирование генома» относится к способу модифицирования генома, включающему любую кодирующую белок или не кодирующую белок нуклеотидную последовательность, организма для нокаута экспрессии целевого гена. В целом, способы редактирования генома включают применение эндонуклеазы, которая способна расщеплять нуклеиновую кислоту генома, например в нацеливаемой нуклеотидной последовательности. Репарация двухцепочечных разрывов в геноме может выполняться внедрением мутаций, и/или в целевой сайт может вставляться экзогенная нуклеиновая кислота.

Способы редактирования генома обычно классифицируют по типу эндонуклеазы, которая участвует в создании двухцепочечных разрывов в целевой нуклеиновой кислоте. Эти способы включают применение цинк-пальцевых нуклеаз (ZFN), активатора транскрипции, подобного эффекторной нуклеазе (TALEN), мегануклеаз и систем CRISPR/Cas.

В одном аспекте по настоящему раскрытию замена опухолевых клеток модифицированной популяцией нормальных клеток выполняют с использованием нормальных клеток, в которых линиеспецифический антиген модифицирован. Такая модификация может включать истощение или ингибирование любого линиеспецифического антигена с использованием системы CRISPR-Cas9, причем система коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR)-Cas9 является сконструированной системой CRISPR-Cas9 искусственного происхождения (ФИГ. 4).

Систему CRISPR-Cas успешно применяли для редактирования геномов различных организмов, включая, но ограничиваясь ими, бактерии, людей, фруктовых мушек, полосатого данио и растений. См., например, Jiang et al., *Nature Biotechnology* (2013) 31(3):233; Qi et al., *Cell* (2013) 5:1173; DiCarlo et al., *Nucleic Acids Res.* (2013) 7:4336; Hwang et al., *Nat. Biotechnol* (2013), 3:227; Gratz et al., *Genetics* (2013) 194:1029; Cong et al.,

Science (2013) 6121:819; Mali et al., *Science* (2013) 6121:823; Cho et al. *Nat. Biotechnol* (2013) 3: 230; и Jiang et al., *Nucleic Acids Research* (2013) 41(20):e188.

В настоящем раскрытии применяется система CRISPR/Cas9, которая гибридируется с целевой последовательностью в полинуклеотиде линии специфического антигена, причем система CRISPR/Cas9 содержит нуклеазу Cas9 и сконструированную crPНК/tracrPНК (или одну направляющую PНК). Комплекс CRISPR/Cas9 может связываться с полинуклеотидом линии специфического антигена и обеспечивает расщепление полинуклеотида антигена, тем самым модифицируя данный полинуклеотид.

Система CRISPR/Cas по настоящему раскрытию может связываться с представляющей интерес областью и/или расщеплять ее в пределах линии специфического антигена клеточной поверхности в кодирующей или не кодирующей области, внутри или рядом с геном, такой как, например, лидерная последовательность, трейлерная последовательность или интрон, или в нетранскрибируемой области, либо выше или ниже кодирующей области. Направляющие PНК (nPНК), применяемые в настоящем раскрытии, могут разрабатывать таким образом, чтобы nPНК направляла связывание комплекса Cas9-nPНК с предварительно определенными сайтами расщепления (целевым сайтом) в геноме. Сайты расщепления могут выбирать таким образом, чтобы высвободить фрагмент, содержащий область неизвестной последовательности или область, содержащую SNP, нуклеотидную вставку, нуклеотидную делецию, перестройку и т. д.

Расщепление области гена может включать в себя расщепление одной или двух цепей в расположении целевой последовательности ферментом Cas. В одном варианте осуществления изобретения такое расщепление может приводить к уменьшению транскрипции целевого гена. В другом варианте осуществления изобретения расщепление может дополнительно включать репарацию расщепленного целевого полинуклеотида гомологичной рекомбинацией с помощью экзогенного матричного полинуклеотида, при этом репарация приводит к вставке, делеции или замене одного или более нуклеотидов целевого полинуклеотида.

Термины «nPНК», «направляющая PНК» и «направляющая последовательность CRISPR» могут применяться взаимозаменяемо по всему документу и относятся к нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, которая определяет специфичность ДНК-связывающего белка Cas системы CRISPR/Cas. nPНК гибридируется с (комплементарной, частично или полностью) последовательностью целевой нуклеиновой кислоты в геноме клетки-хозяева. nPНК или ее часть, которая гибридируется с целевой нуклеиновой кислотой, может составлять в длину в пределах

15-25 нуклеотидов, 18-22 нуклеотидов или 19-21 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность нРНК, которая гибридизируется с целевой нуклеиновой кислотой составляет в длину 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность нРНК, которая гибридизируется с целевой нуклеиновой кислотой составляет в длину в пределах 10-30 или в пределах 15-25 нуклеотидов.

Кроме того, последовательность, которая связывается с целевой нуклеиновой кислотой, в некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК также содержит каркасную последовательность. Экспрессия нРНК, кодирующей как последовательность, комплементарную с целевой нуклеиновой кислотой, так и каркасную последовательность, имеет двойную функцию как связывания (гибридизации) с целевой нуклеиновой кислотой, так и рекрутирования эндонуклеазы к целевой нуклеиновой кислоте, что может приводить к сайт-специфической активности CRISPR. В некоторых вариантах осуществления изобретения такая химерная нРНК может называться одной направляющей РНК (онРНК).

В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является модифицированной, *например*, химически модифицированной. Модифицированная нРНК содержит по меньшей мере один нуклеотид, имеющий модификацию в химической структуре, из по меньшей мере одного из следующего: нуклеотидное основание, углевод и фосфодиэфирная связь или часть скелета (*например*, нуклеотидфосфаты). Примеры модификаций нРНК будут очевидны специалисту в данной области техники и их можно найти, например, в Lee et al., Synthetically modified guide RNA and donor DNA are a versatile platform for CRISPR-Cas9 engineering. *Elife*. 2017 May 2;6. pii: e25312. doi:10.7554/eLife.25312 и публикации США 2016/0289675. Дополнительные подходящие модификации включают в себя тиофосфатную модификацию скелета, 2'-О-Ме-модифицированный углевод, 2'F-модифицированный углевод, замену рибозного углевода на бициклический нуклеотид-cEt, 3'тиоPASE (MSP) или любую их комбинацию. Подходящие модификации нРНК описаны, например, в Rahdar et al. *PNAS* December 22, 2015 112 (51) E7110-E7117 и Hendel et al., *Nat Biotechnol*. 2015 Sep; 33(9): 985–989, каждая из которых включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК, описанная в данном документе, химически модифицирована. Например, нРНК может содержать один или более 2'-О модифицированных нуклеотидов, например 2'-О-метил нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК содержит 2'-О модифицированный нуклеотид, например 2'-О-метил нуклеотид, на 5'-конце нРНК. В

некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК содержит 2'-О модифицированный нуклеотид, например 2'-О-метил нуклеотид, на 3'-конце нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК содержит 2'-О модифицированный нуклеотид, например 2'-О-метил нуклеотид, на обоих 5'- и 3'-концах нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является 2'-О-модифицированной, например 2'-О-метил-модифицированной по нуклеотиду на 5'-конце нРНК, второму нуклеотиду от 5'-конца нРНК и третьему нуклеотиду от 5'-конца нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является 2'-О-модифицированной, например 2'-О-метил-модифицированной по нуклеотиду на 3'-конце нРНК, второму нуклеотиду от 3'-конца нРНК и третьему нуклеотиду от 3'-конца нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является 2'-О-модифицированной, например 2'-О-метил-модифицированной по нуклеотиду на 5'-конце нРНК, второму нуклеотиду от 5'-конца нРНК, третьему нуклеотиду от 5'-конца нРНК, нуклеотиду на 3'-конце нРНК, второму нуклеотиду от 3'-конца нРНК и третьему нуклеотиду от 3'-конца нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является 2'-О-модифицированной, например 2'-О-метил-модифицированной по второму нуклеотиду от 3'-конца нРНК, третьему нуклеотиду от 3'-конца нРНК и четвертому нуклеотиду от 3'-конца нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотид на 3'-конце нРНК не является химически модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотид на 3'-конце нРНК не содержит химически модифицированный углевод. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является 2'-О-модифицированной, например 2'-О-метил-модифицированной по нуклеотиду на 5'-конце нРНК, второму нуклеотиду от 5'-конца нРНК, третьему нуклеотиду от 5'-конца нРНК, второму нуклеотиду от 3'-конца нРНК, третьему нуклеотиду от 3'-конца нРНК и четвертому нуклеотиду от 3'-конца нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения 2'-О-метил нуклеотид содержит фосфатную связь со смежным нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения 2'-О-метил нуклеотид содержит тиофосфатную связь со смежным нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения 2'-О-метил нуклеотид содержит связь тиоРАСЕ со смежным нуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК может содержать один или более 2'-О-модифицированных и 3' фосфор-модифицированных нуклеотидов, например 2'-О-метил 3' тиофосфатный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3' фосфор-модифицированный, например 2'-О-метил 3' тиофосфатный нуклеотид на 5'-конце нРНК. В некоторых

вариантах осуществления изобретения нРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3' фосфор-модифицированный, например 2'-О-метил 3' тиофосфатный нуклеотид на 3'-конце нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3' фосфор-модифицированный, например 2'-О-метил 3' тиофосфатный нуклеотид на 5'- и 3'-концах нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК содержит скелет, в котором один или более немостиковых атомов кислорода заменены атомом серы. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является 2'-О-модифицированной и 3' фосфор-модифицированной, например 2'-О-метил 3' тиофосфат-модифицированной по нуклеотиду на 5'-конце нРНК, второму нуклеотиду от 5'-конца нРНК и третьему нуклеотиду от 5'-конца нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является 2'-О-модифицированной и 3' фосфор-модифицированной, например 2'-О-метил 3' тиофосфат-модифицированной по нуклеотиду на 3'-конце нРНК, второму нуклеотиду от 3'-конца нРНК и третьему нуклеотиду от 3'-конца нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является 2'-О-модифицированной и 3' фосфор-модифицированной, например 2'-О-метил 3' тиофосфат-модифицированной по нуклеотиду на 5'-конце нРНК, второму нуклеотиду от 5'-конца нРНК, третьему нуклеотиду от 5'-конца нРНК, нуклеотиду на 3'-конце нРНК, второму нуклеотиду от 3'-конца нРНК и третьему нуклеотиду от 3'-конца нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является 2'-О-модифицированной и 3' фосфор-модифицированной, например 2'-О-метил 3' тиофосфат-модифицированной по второму нуклеотиду от 3'-конца нРНК, третьему нуклеотиду от 3'-конца нРНК и четвертому нуклеотиду от 3'-конца нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотид на 3'-конце нРНК не является химически модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотид на 3'-конце нРНК не содержит химически модифицированный углевод. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является 2'-О-модифицированной и 3' фосфор-модифицированной, например 2'-О-метил 3' тиофосфат-модифицированной по нуклеотиду на 5'-конце нРНК, второму нуклеотиду от 5'-конца нРНК, третьему нуклеотиду от 5'-конца нРНК, второму нуклеотиду от 3'-конца нРНК, третьему нуклеотиду от 3'-конца нРНК и четвертому нуклеотиду от 3'-конца нРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК может содержать один или более 2'-О-модифицированных и 3' фосфор-модифицированных нуклеотидов, например 2'-О-метил 3' тиоРАСЕ нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3' фосфор-модифицированный,

например 2'-О-метил 3'тиоРАСЕ нуклеотид на 5'-конце нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3'фосфор-модифицированный, например 2'-О-метил 3'тиоРАСЕ нуклеотид на 3'-конце нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК содержит 2'-О-модифицированный и 3'фосфор-модифицированный, например 2'-О-метил 3'тиоРАСЕ нуклеотид на 5'- и 3'-концах нРНК. В некоторых вариантах осуществления нРНК содержит скелет, в котором один или более немостиковых атомов кислорода заменены атомом серы, и один или более немостиковых атомов кислорода заменены ацетатной группой. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является 2'-О-модифицированной и 3'фосфор-модифицированной, например 2'-О-метил 3'тиоРАСЕ-модифицированной по нуклеотиду на 5'-конце нРНК, второму нуклеотиду от 5'-конца нРНК и третьему нуклеотиду от 5'-конца нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является 2'-О-модифицированной и 3'фосфор-модифицированной, например 2'-О-метил 3'тиоРАСЕ-модифицированной по нуклеотиду на 3'-конце нРНК, второму нуклеотиду от 3'-конца нРНК и третьему нуклеотиду от 3'-конца нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является 2'-О-модифицированной и 3'фосфор-модифицированной, например 2'-О-метил 3'тиоРАСЕ-модифицированной по нуклеотиду на 5'-конце нРНК, второму нуклеотиду от 5'-конца нРНК, третьему нуклеотиду от 5'-конца нРНК, нуклеотиду на 3'-конце нРНК, второму нуклеотиду от 3'-конца нРНК и третьему нуклеотиду от 3'-конца нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является 2'-О-модифицированной и 3'фосфор-модифицированной, например 2'-О-метил 3'тиоРАСЕ-модифицированной по второму нуклеотиду от 3'-конца нРНК, третьему нуклеотиду от 3'-конца нРНК и четвертому нуклеотиду от 3'-конца нРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотид на 3'-конце нРНК не является химически модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотид на 3'-конце нРНК не содержит химически модифицированный углевод. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК является 2'-О-модифицированной и 3'фосфор-модифицированной, например 2'-О-метил 3'тиоРАСЕ-модифицированной по нуклеотиду на 5'-конце нРНК, второму нуклеотиду от 5'-конца нРНК, третьему нуклеотиду от 5'-конца нРНК, второму нуклеотиду от 3'-конца нРНК, третьему нуклеотиду от 3'-конца нРНК и четвертому нуклеотиду от 3'-конца нРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК содержит химически модифицированный скелет. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК содержит тиофосфатную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения один

Химические модификации нРНК описаны, например, в Hendel, A. et al., *Nature Biotech.*, 2015, Vol 33, No. 9, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Используемый в данном документе термин «каркасная последовательность», также называемая *tracrRNA*, относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая рекрутирует эндонуклеазу Cas к целевой нуклеиновой кислоте, связанной (гибридизированной) с комплементарной последовательностью нРНК. Любая каркасная последовательность, которая содержит по меньшей мере одну структуру типа «стебель-петля» и рекрутирует эндонуклеазу, может применяться в генетических элементах и векторах, описанных в данном документе. Примеры каркасных последовательностей будут очевидны специалисту в данной области техники и их можно найти, например, в Jinek, et al. *Science* (2012) 337(6096):816-821, Ran, et al. *Nature Protocols* (2013) 8:2281-2308, заявке РСТ № WO2014/093694 и заявке РСТ № WO2013/176772.

В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность нРНК не содержит каркасную последовательность, и каркасная последовательность экспрессируется как отдельный транскрипт. В таких вариантах осуществления последовательность нРНК дополнительно содержит дополнительную последовательность, которая комплементарна части каркасной последовательности и функционирует для связывания (гибридизации) каркасной последовательности и рекрутирования эндонуклеазы к целевой нуклеиновой кислоте.

В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность нРНК является по меньшей мере на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или по меньшей мере 100% комплементарной целевой нуклеиновой кислоте (см. также патент США 8 697 359, который включен в данный документ посредством ссылки за его разъяснение комплементарности последовательности нРНК с целевой полинуклеотидной последовательностью). Было продемонстрировано, что несовпадения между направляющей последовательностью CRISPR и целевой нуклеиновой кислотой возле 3'-конца целевой нуклеиновой кислоты могут нарушать активность нуклеазного расщепления (Upadhyay, et al. *Genes Genome Genetics* (2013) 3(12):2233-2238). В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность нРНК является по меньшей мере на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или по меньшей мере 100% комплементарной 3'-концу целевой нуклеиновой кислоты (*например*, последним 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидам 3'-конца целевой нуклеиновой кислоты).

Целевая нуклеиновая кислота фланкирована с 3'-стороны смежным с протоспейсером мотивом (PAM), который может взаимодействовать с эндонуклеазой и дополнительно участвовать в нацеливании эндонуклеазной активности на целевую нуклеиновую кислоту. Обычно считается, что последовательность PAM, фланкирующая целевую нуклеиновую кислоту, зависит от эндонуклеазы и источника, из которого получена эндонуклеаза. Например, для эндонуклеаз Cas9, которые получены из *Streptococcus pyogenes*, последовательность PAM представляет собой NGG. Для эндонуклеаз Cas9, полученных из *Staphylococcus aureus*, последовательность PAM представляет собой NNGRRT. Например, для эндонуклеаз Cas9, которые получены из *Neisseria meningitidis*, последовательность PAM представляет собой NNNNGATT. Для эндонуклеаз Cas9, полученных из *Streptococcus thermophilus*, последовательность PAM представляет собой NNAGAA. Для эндонуклеазы Cas9, полученной из *Treponema denticola*, последовательность PAM представляет собой NAAAAC. Для нуклеазы Cpf1, последовательность PAM представляет собой TTN.

В некоторых вариантах осуществления изобретения генная инженерия клетки также включает внедрение одной или более (например, 1, 2, 3 или более) эндонуклеаз Cas в клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеазу Cas и нуклеиновую кислоту, кодирующую нРНК, предоставляют на одной и той же нуклеиновой кислоте (например, векторе). В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеазу Cas и нуклеиновую кислоту, кодирующую нРНК, предоставляют на разных нуклеиновых кислотах (например, разных векторах). Альтернативно или дополнительно, эндонуклеазу Cas могут предоставлять или внедрять в клетки в форме белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза Cas представляет собой фермент Cas9 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза Cas9 получена из *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), *Staphylococcus aureus* (SaCas9), *Neisseria meningitidis* (NmCas9), *Streptococcus thermophilus*, *Campylobacter jejuni* (CjCas9) или *Treponema denticola*. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая эндонуклеазу Cas, может быть кодон-оптимизированной для экспрессии в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза представляет собой гомолог или ортолог Cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая эндонуклеазу Cas9, дополнительно модифицирована для изменения активности белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза Cas9 была модифицирована для инактивации одного из каталитических

остатков данной эндонуклеазы, она называется «никаза» или «Cas9n». Никазные эндонуклеазы Cas9 расщепляют одну цепь ДНК целевой нуклеиновой кислоты. См., например, Dabrowska et al. *Frontiers in Neuroscience* (2018) 12(75). Было показано, что одна или более мутаций в каталитических доменах RuvC и HNH данного фермента могут

5 повышать эффективность Cas9. См., например, Sarai et al. *Currently Pharma. Biotechnol.* (2017) 18(13). В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза Cas9 представляет собой каталитически неактивную Cas9. Например, dCas9 содержит мутации каталитически активного остатка (D10 и H840) и не имеет нуклеазной активности.

Альтернативно или дополнительно, эндонуклеазу Cas9 могут сливать с другим белком

10 или его частью. В некоторых вариантах осуществления изобретения dCas9 сливают с репрессорным доменом, таким как домен KRAB. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такие белки слияния dCas9 применяют с конструкциями, описанными в данном документе для мультиплексной репрессии генов (*например*, интерференции CRISPR (CRISPRi)). В некоторых вариантах осуществления изобретения dCas9 сливают с

15 активаторным доменом, таким как VP64 или VPR. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такие белки слияния dCas9 применяют с конструкциями, описанными в данном документе для активации генов (*например*, активации CRISPR (CRISPRa)). В некоторых вариантах осуществления изобретения dCas9 сливают с эпигенетическим модулирующим доменом, таким как доменом гистон-деметиلاзы или доменом гистон-

20 ацетилацетилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления изобретения dCas9 сливают с LSD1 или p300, или их частью. В некоторых вариантах осуществления изобретения слияние dCas9 применяют для эпигенетической модуляции на основе CRISPR. В некоторых вариантах осуществления изобретения dCas9 или Cas9 сливают с доменом нуклеазы FokI. В некоторых вариантах осуществления изобретения dCas9 или Cas9,

25 слитые с доменом нуклеазы FokI, применяют для редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления изобретения dCas9 или Cas9 сливают с флуоресцентным белком (*например*, GFP, RFP, mCherry и т. д.). В некоторых вариантах осуществления изобретения белки Cas9/dCas9, слитые с флуоресцентными белками, применяют для маркировки и/или визуализации геномных локусов или идентификации клеток,

30 экспрессирующих эндонуклеазу Cas.

В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеазу Cas модифицируют для усиления специфичности фермента (*например*, снижения нецелевых эффектов, сохранения устойчивого нецелевого расщепления). В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза Cas представляет собой вариант Cas9 с

35 улучшенной специфичностью (*например*, eSPCas9). См., *например*, Slaymaker et al.

Science (2016) 351 (6268): 84-88. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза Cas представляет собой вариант Cas9 с высокой точностью (*например*, SpCas9-HF1). См., *например*, Kleinstiver et al. *Nature* (2016) 529: 490-495.

Ферменты Cas, такие как эндонуклеазы Cas, известны в данной области техники, их могут получать из различных источников и/или конструировать/модифицировать для модуляции одной или более активностей или специфичностей фермента. В некоторых вариантах осуществления изобретения фермент Cas был сконструирован/модифицирован для распознавания одной или более последовательностей PAM. В некоторых вариантах осуществления изобретения фермент Cas был сконструирован/модифицирован для распознавания одной или более последовательностей PAM, которые отличаются от последовательности PAM, которую фермент Cas распознает без конструирования/модификации. В некоторых вариантах осуществления изобретения фермент Cas был сконструирован/модифицирован для снижения нецелевой активности фермента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая эндонуклеазу Cas, дополнительно модифицирована для изменения специфичности эндонуклеазной активности (*например* снижения нецелевого расщепления, уменьшения эндонуклеазной активности Cas или времени жизни в клетке, увеличения гомологически направленной рекомбинации и снижения негомологического соединения концов). См., *например*, Komor et al. *Cell* (2017) 168: 20-36. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая эндонуклеазу Cas, модифицирована для изменения распознавания PAM эндонуклеазы. Например, Cas-эндонуклеаза SpCas9 распознает PAM-последовательность NGG, тогда как ослабленные варианты SpCas9, содержащие одну или более модификаций эндонуклеазы (*например*, VQR SpCas9, EQR SpCas9, VRER SpCas9), могут распознавать PAM-последовательности NGA, NGAG, NGCG. Распознавание PAM модифицированной эндонуклеазой Cas считается «ослабленным», если эндонуклеаза Cas распознает больше потенциальных последовательностей PAM по сравнению с эндонуклеазой Cas, которая не была модифицирована. Например, Cas-эндонуклеаза SaCas9 распознает PAM-последовательность NNGRRT, тогда как ослабленный вариант SaCas9, содержащий одну или более модификаций эндонуклеазы (*например*, KKH SaCas9), может распознавать PAM-последовательность NNNRRT. В одном примере Cas-эндонуклеаза FnCas9 распознает PAM-последовательность NNG, тогда как ослабленный вариант FnCas9, содержащий одну или более модификаций эндонуклеазы (*например*, RHA FnCas9), может распознавать PAM-последовательность YG. В одном примере эндонуклеаза Cas

представляет собой эндонуклеазу Cpf1, содержащую замещающие мутации S542R и K607R, и она распознает PAM-последовательность TYCV. В одном примере эндонуклеаза Cas представляет собой эндонуклеазу Cpf1, содержащую замещающие мутации S542R, K607R и N552R, и она распознает PAM-последовательность TATV. См., например, Gao et al. *Nat. Biotechnol.* (2017) 35(8): 789-792.

В некоторых вариантах осуществления изобретения используют более одной (например, 2, 3 или более) эндонуклеаз Cas. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одна из эндонуклеаз Cas представляет собой фермент Cas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одна из эндонуклеаз Cas представляет собой фермент Cpf1. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одна из эндонуклеаз Cas9 получена из *Streptococcus pyogenes*. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одна из эндонуклеаз Cas9 получена из *Streptococcus pyogenes* и по меньшей мере одна эндонуклеаза Cas9 получена из организма, не являющегося *Streptococcus pyogenes*. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза представляет собой редактор оснований. Эндонуклеаза-редактор оснований обычно состоит из каталитически неактивной эндонуклеазы Cas, слитой с функциональным доменом. См., например, Eid et al. *Biochem. J.* (2018) 475(11): 1955-1964; Rees et al. *Nature Reviews Genetics* (2018) 19:770-788. В некоторых вариантах осуществления изобретения каталитически неактивная эндонуклеаза Cas представляет собой dCas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза содержит dCas9, слитую с одним или более доменов урацилгликозилатного ингибитора (UGI). В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза содержит dCas9, слитую с редактором адениновых оснований (ABE), например ABE, выделенным из РНК-адениндезаминазы TadA. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза содержит dCas9, слитую с ферментом цитидиндезаминазой (например, дезаминазой APOBEC, pmCDA1, индуцируемой активацией цитидиндезаминазой (AID)). В некоторых вариантах осуществления изобретения каталитически неактивная эндонуклеаза Cas имеет пониженную активность и представляет собой nCas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза содержит nCas9, слитую с одним или более доменов урацилгликозилатного ингибитора (UGI). В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза содержит nCas9, слитую с редактором адениновых оснований (ABE), например ABE, выделенным из РНК-адениндезаминазы TadA. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза содержит nCas9, слитую с

ферментом цитидиндезаминазой (*например*, дезаминазой APOBEC, pmCDA1, индуцируемой активацией цитидиндезаминазой (AID)).

Примеры редакторов оснований включают, без ограничений, BE1, BE2, BE3, HF-BE3, BE4, BE4max, BE4-Gam, YE1-BE3, EE-BE3, YE2-BE3, YEE-CE3, VQR-BE3, VRER-BE3, SaBE3, SaBE4, SaBE4-Gam, Sa(KKH)-BE3, целевой-AID, целевой-AID-NG, xBE3, eA3A-BE3, BE-PLUS, TAM, CRISPR-X, ABE7.9, ABE7.10, ABE7.10*, xABE, ABESa, VQR-ABE, VRER-ABE, Sa(KKH)-ABE и CRISPR-SKIP. Дополнительные примеры редакторов оснований можно найти, например, в публикации США № 2018/0312825A1, публикации США № 2018/0312828A1 и публикации PCT № WO 2018/165629A1, которые включены в данный документ во всей своей полноте посредством ссылок.

В некоторых вариантах осуществления изобретения редактор оснований был дополнительно модифицирован для ингибирования репарации с вырезанием оснований в целевом сайте и индукции клеточной репарации несовпадений. Любую из эндонуклеаз Cas, описанных в данном документе, могут сливать с доменом Gam (белок бактериофага Мю) для защиты эндонуклеазы Cas от деградации и экзонуклеазной активности. См., *например*, Eid et al. *Biochem. J.* (2018) 475(11): 1955-1964.

В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза Cas принадлежит к эндонуклеазе Cas класса 2 типа V. Эндонуклеазы Cas класса 2 типа V могут дополнительно разделять на категории типа V-A, типа V-B, типа V-C и типа V-U. См., *например*, Stella et al. *Nature Structural & Molecular Biology* (2017). В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза Cas представляет собой эндонуклеазу Cas типа V-A, такую как нуклеаза Cpf1. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза Cas представляет собой эндонуклеазу Cas типа V-B, такую как нуклеаза C2c1. См., *например*, Shmakov et al. *Mol Cell* (2015) 60: 385-397. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза Cas представляет собой Mad7.

Альтернативно или дополнительно, эндонуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 или ее вариант. Как будет понятно специалисту в данной области техники, Cas-эндонуклеаза Cpf1 также может называться Cas12a. См., например, Strohkendl et al. *Mol Cell* (2018) 71: 1-9. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин экспрессирует нуклеазу Cpf1, полученную из *Provetella spp.* или *Francisella spp.*, *Acidaminococcus sp.* (AsCpf1), *Lachnospiraceae bacterium* (LpCpf1) или *Eubacterium rectale*. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая эндонуклеазу Cpf1, может быть кодон-оптимизированной для экспрессии в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотидная

последовательность, кодирующая эндонуклеазу Cpf1, дополнительно модифицирована для изменения активности белка.

Каталитически неактивный вариант Cpf1 (Cas12a) может называться dCas12a.

5
10
15
20
25
30
35
Описанные в данном документе каталитически неактивные варианты Cpf1 могут быть слиты с функциональным доменом для образования редактора оснований. См., например, Rees et al. *Nature Reviews Genetics* (2018) 19:770-788. В некоторых вариантах осуществления изобретения каталитически неактивная эндонуклеаза Cas представляет собой dCas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза содержит dCas12a, слитую с одним или более доменов урацилгликозилатного ингибитора (UGI). В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза содержит dCas12a, слитую с редактором адениновых оснований (ABE), например ABE, выделенным из РНК-адениндезаминазы TadA. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза содержит dCas12a, слитую с ферментом цитидиндезаминазой (например, дезаминазой АРОВЕС, pmCDA1, индуцируемой активацией цитидиндезаминазой (AID)).

15
20
25
30
35
Альтернативно или дополнительно, эндонуклеаза Cas может представлять собой эндонуклеазу Cas14 или ее вариант. В отличие от эндонуклеаз Cas9, эндонуклеазы Cas14 pochodят из архей и преимущественно меньше по размеру (например, 400–700 аминокислот). Кроме того, эндонуклеазам Cas14 не требуется последовательность PAM. См., например, Harrington et al. *Science* (2018).

20
25
30
35
Любую из эндонуклеаз Cas, описанных в данном документе, могут модулировать для регуляции уровня экспрессии и/или активности эндонуклеазы Cas в требуемое время. Например, может быть предпочтительным повышать уровни экспрессии и/или активности эндонуклеазы Cas во время конкретной(-ых) фазы (фаз) клеточного цикла. Было продемонстрировано, что уровни гомологически направленной репарации снижаются во время фазы G1 клеточного цикла, поэтому увеличение уровней экспрессии и/или активности эндонуклеазы Cas во время фазы S, фазы G2 и/или фазы M может увеличивать гомологически направленную репарацию после редактирования эндонуклеазой Cas. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни экспрессии и/или активности эндонуклеазы Cas повышаются во время фазы S, фазы G2 и/или фазы M клеточного цикла. В одном примере эндонуклеазу Cas сливают с N-концевой областью человеческого геминина. См., например, Gutschner et al. *Cell Rep.* (2016) 14(6): 1555-1566. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни экспрессии и/или активности эндонуклеазы Cas понижаются во время фазы G1. В одном примере эндонуклеаза Cas модифицирована таким образом, что ее активность во время фазы G1 понижена. См., например, Lomova et al. *Stem Cells* (2018).

Альтернативно или дополнительно, любую из описанных в данном документе эндонуклеаз Cas могут сливать с эпигенетическим модификатором (*например*, модифицирующим хроматин ферментом, *например* ДНК-метилазой, гистондеацетилазой). См., *например*, Kungulovski et al. *Trends Genet.* (2016) 32(2):101-113. Эндонуклеазы Cas, слитые с эпигенетическим модификатором, могут называться «эпизффекторами» и могут обеспечивать временную и/или транзистентную эндонуклеазную активность. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеаза Cas представляет собой dCas9, слитую с модифицирующим хроматин ферментом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем раскрытии предложены композиции и способы ингибирования клеточной поверхности линиеспецифического антигена в гемопоэтических клетках с использованием системы CRISPR/Cas9, причем последовательность направляющей РНК гибридизируется с нуклеотидной последовательностью, кодирующей линиеспецифический антиген клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления изобретения линиеспецифический антиген клеточной поверхности представляет собой CD33 и нРНК гибридизируется с частью нуклеотидной последовательности, которая кодирует CD33 (ФИГ. 5). Примеры нРНК, которые нацеливают CD33, приведены в таблице 4, хотя могут быть разработаны и другие нРНК, которые гибридизуются с CD33 и могут использоваться в описанных в данном документе способах. В некоторых вариантах осуществления нРНК содержит SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 51.

В таблице 4 предложены примеры направляющих последовательностей РНК, которые гибридизируются или предполагаемо гибридизируются с частью CD33. Несмотря на то, что иллюстративные направляющие последовательности РНК предоставлены как последовательности РНК, так и последовательности ДНК, специалисту в данной области будет понятно, что если не указано иное, в последовательностях нуклеиновых кислот, изложенных в настоящей заявке, «Т» будут указаны в репрезентативной последовательности ДНК, но если последовательность представляет собой РНК, «Т» будут заменены на «U».

Таблица 4. Направляющие последовательности РНК, нацеливающие CD33 (представлены как ДНК-, так и РНК-последовательности)

Название	Направляющая последовательность	Положение направляющей послед.	Показатель

hCD33-IgC1, называемая в данном документе как «Crispr 1»	ACCTGTCAGGTGAAGTTCGC TGG (SEQ ID NO: 11) ACCUGUCAGGUGAAGUUCGC UGG (SEQ ID NO: 60)	Chr19:+51729270	87
hCD33-IgC3, называемая в данном документе как «Crispr 3»	TGGCCGGGTTCTAGAGTGCC AGG (SEQ ID NO: 28) UGGCCGGGUUCUAGAGUGCC AGG (SEQ ID NO: 61)	Chr19:-51729087	82
hCD33-IgC5, называемая в данном документе как «Crispr 5»	GGCCGGGTTCTAGAGTGCCA GGG (SEQ ID NO: 29) GGCCGGGUUCUAGAGUGCCA GGG (SEQ ID NO: 62)	Chr19:-51729086	81
hPHK hCD33	CACCGAGGAGTGAGTAGTCC TGG (SEQ ID NO: 30) CACCGAGGAGUGAGUAGUCC UGG (SEQ ID NO: 63)		
hPHK hCD33	TCCAGCGAACTTCACCTGAC AGG (SEQ ID NO: 31) UCCAGCGAACUUCACCUGAC AGG (SEQ ID NO: 64)		
hPHK hCD33	CCTCACTAGACTTGACCCAC AGG (SEQ ID NO: 48) CCUCACUAGACUUGACCCAC AGG (SEQ ID NO: 65)	Chr19, (+) цепь, начало 51225794, конец 51225813	
hPHK hCD33	ATCCCTGGCACTCTAGAACC CGG (SEQ ID NO: 49) AUCCUGGCACUCUAGAACC CGG (SEQ ID NO: 66)	Chr19, (+) цепь, начало 51225829, конец 51225848	
hPHK hCD33	ATCCCTGGCACTCTAGAACC		

	(SEQ ID NO: 50) AUCCUGGCACUCUAGAACC (SEQ ID NO: 67)		
нРНК hCD33	GGCCGGGTCTAGAGTGCCA (SEQ ID NO: 51) GGCCGGGUUCUAGAGUGCCA (SEQ ID NO: 68)		
нРНК hCD33	CCTACTAGACTTGACCCAC (SEQ ID NO:58) CCUCACUAGACUUGACCCAC (SEQ ID NO: 70)		

В некоторых случаях нРНК для применения в настоящем раскрытии может содержать спейсерную последовательность на по меньшей мере 90% (*например*, по меньшей мере 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99%) идентичную любой из примеров последовательностей направляющих РНК в таблице 4 выше, например, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68 или SEQ ID NO:70.

«Процент идентичности» двух нуклеиновых кислоты определяют с использованием алгоритма из Karlin and Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 87:2264-68, 1990, модифицированного как в Karlin and Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (версия 2.0) из Altschul, *et al. J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990. Нуклеотидный поиск BLAST могут осуществлять с помощью программы NBLAST, показатель = 100, длина слова = -12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот по данному изобретению. Если между двумя последовательностями существуют гэпы, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul *et al., Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

В некоторых вариантах осуществления изобретения может требоваться дополнительная генетическая инженерия HSC, в частности аллогенных HSC, для уменьшения реакций «трансплантат против хозяина». Например, стандартная терапия против рецидивирующего AML представляет собой трансплантацию стволовых клеток (HSCT). Однако, по меньшей мере одним из ограничивающих факторов для успешной HSCT является болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD), в которую вовлечена

экспрессия молекулы CD45 поверхности клеток. См., *например*, Van Besie, *Hematology Am. Soc. Hematol Educ Program* (2013)56; Mawad *Curr. Hematol. Malig. Rep.* (2013) 8(2):132. CD45RA и CD45RO являются изоформами CD45 (обнаруженными на всех гемопоэтических клетках за исключением эритроцитов). В Т-лимфоцитах CD45RA экспрессируется на наивных клетках, тогда как CD45RO экспрессируется на клетках памяти. Т-клетки CD45RA имеют высокий потенциал для проявления реактивности против реципиент-специфических антигенов после HSCT, что приводит к GVHD. Таким образом, остается необходимость в эффективном и безопасном лечении AML, которое также снижало бы вероятность отторжения трансплантата или развития GVHD. CD45 представляет собой антиген линии 1 типа, поскольку несущие CD45 клетки требуются для выживания, но данный антиген может удаляться со стволовых клеток с использованием CRISPR.

Принимая во внимание осложнения, возникающие из-за развития GvHD после HSCT, в настоящем раскрытии также представлены композиции и способы нацеливания CD45RA. Такие композиции и способы предназначены для предотвращения и/или снижения частоты новых случаев или тяжести GvHD.

Таким образом, в случае GVHD, лечение пациента может включать в себя следующие стадии: (1) введение терапевтически эффективного количества Т-клеток пациенту, причем Т-клетки содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), нацеливающий линиеспецифический антиген CD45RA; и (2) инфузию пациенту гемопоэтических стволовых клеток, причем гемопоэтические клетки имеют пониженную экспрессию линиеспецифического антигена CD45RA.

Кроме того, в настоящем раскрытии предлагаются композиции и способы комбинированного ингибирования обоих линиеспецифических антигенов CD33 и CD45RA. В таком режиме лечения могут заключаться такие стадии: (1) введение терапевтически эффективного количества Т-клеток пациенту, причем Т-клетки содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), нацеливающий оба линиеспецифические антигена CD33 и CD45RA; и (2) инфузию или реинфузию пациенту гемопоэтических стволовых клеток, либо аутологичных, либо аллогенных, причем гемопоэтические клетки имеют пониженную экспрессию обоих линиеспецифических антигенов CD33 и CD45RA .

В некоторых вариантах осуществления изобретения линиеспецифический антиген CD45RA клеточной поверхности также удаляется или ингибируется в гемопоэтических клетках с использованием системы CRISPR/Cas9. В некоторых вариантах осуществления

изобретения последовательность нРНК гибридизируется с частью нуклеотидной последовательности, кодирующей CD45RA (ФИГ. 6). Примеры нРНК, которые нацеливают CD45RA, приведены в таблице 5, хотя могут быть разработаны и другие нРНК, которые гибридизуются с CD45RA и могут использоваться в описанных в данном документе способах.

В таблице 5 предложены примеры направляющих последовательностей РНК, которые гибридизируются или предполагается гибридизируются с экзоном 4 или экзоном 5 CD45 человека.

10 Таблица 5. Направляющие последовательности РНК, нацеливающие CD45

Мишень hCD45	Направляющая РНК
Экзон 4	ССАААGAGTCCGGGGATACT TGG (SEQ ID NO: 9)
	ССАAGTATCCCCGGACTCTT TGG (SEQ ID NO: 32)
	AGCATTATCCAAAGAGTCCG GGG (SEQ ID NO: 33)
	ACTTGGGTGGAAGTATTGTC TGG (SEQ ID NO: 34)
Экзон 5	GTTGAGTTTTGCATTGGCGG CGG (SEQ ID NO: 10)
	GTCTGCGAGTCTGCGTGCGT GGG (SEQ ID NO: 35)
	CGTCTGCGAGTCTGCGTGCG TGG (SEQ ID NO: 36)
	GCGAGTCTGCGTGCGTGGGA AGG (SEQ ID NO: 37)

В данном документе также предложены способы получения клетки, которая дефектна по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности, включающие предоставление клетки и внедрение в клетку компонентов системы CRISPR Cas для редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновую кислоту, которая содержит CRISPR-Cas направляющую РНК (нРНК), которая гибридизируется или предполагается гибридизируется с частью нуклеотидной последовательности, которая кодирует линиеспецифический антиген клеточной поверхности, внедряют в клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК внедряется в клетку на векторе. В некоторых вариантах осуществления изобретения в клетку внедряется эндонуклеаза Cas. В некоторых вариантах осуществления изобретения в клетку внедряется эндонуклеаза Cas в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей эндонуклеазу Cas. В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК и нуклеотидная последовательность, кодирующая эндонуклеазу Cas, вводят в клетку на той же нуклеиновой кислоты (*например*, том же векторе). В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеазу Cas внедряется в клетку в форме

белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндонуклеазу Cas и нРНК предварительно формируют *in vitro* и внедряют в клетку в виде комплекса.

В настоящем раскрытии дополнительно предлагаются сконструированные, векторы и векторные системы искусственного происхождения, которые могут кодировать один или более компонентов комплекса CRISPR/Cas9, причем вектор содержит полинуклеотид, кодирующий (i) направляющую РНК системы (CRISPR)-Cas, которая гибридизуется с последовательностью линиеспецифического антигена, и (ii) эндонуклеазу Cas9.

Векторы по настоящему раскрытию могут направлять экспрессию одной или более последовательностей в клетках млекопитающего с использованием экспрессионного вектора млекопитающего. Примеры экспрессионных векторов млекопитающего включают pCDM8 (См., *Nature* (1987) 329: 840) и pMT2PC (Kaufman, et al., *EMBO J.* (1987) 6: 187). При использовании в клетках млекопитающих функции управления экспрессионным вектором часто предоставляются одним или более регуляторными элементами. Например, обычно используемые промоторы получены из вируса полиомы, аденовируса 2, цитомегаловируса, обезьяньего вируса 40 и других, раскрытых в данном документе и известных в данной области техники. Другие подходящие системы экспрессии для прокариотических и эукариотических клеток см., *например*, главы 16 и 17 из Sambrook, et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*. 2nd eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Векторы по настоящему описанию способны направлять экспрессию нуклеиновой кислоты, преимущественно в конкретном типе клеток (*например*, для экспрессии нуклеиновой кислоты применяют тканеспецифические регуляторные элементы). Такие регуляторные элементы включают промотор, который может представлять собой тканеспецифический или клеточноспецифический промотор. Термин «тканеспецифический», применительно к промотору, относится к промотору, который способен направлять селективную экспрессию представляющей интерес нуклеотидной последовательности в определенный тип ткани (*например*, семенники) при относительном отсутствии экспрессии той же представляющей интерес нуклеотидной последовательности в другом типе ткани. Термин «специфический по типу клетки», применительно к промотору, относится к промотору, который способен направлять селективную экспрессию представляющей интерес нуклеотидной последовательности в определенный тип клетки при относительном отсутствии экспрессии той же представляющей интерес нуклеотидной последовательности в другом типе клетки той же ткани. Термин «специфический по типу клетки», при применении к промотору, также

означает промотор, способный стимулировать селективную экспрессию представляющей интерес нуклеотидной последовательности в области в пределах одной ткани.

Специфичность промотора по типу клетки могут оценивать, используя хорошо известные в данной области техники методы, *например*, иммуногистохимическое окрашивание.

5 Для внедрения нуклеиновых кислот, кодирующих CRISPR/Cas9, в клетки млекопитающих и ткани-мишени могут применять общеизвестные способы переноса генов на вирусной и невирусной основе. Такие способы могут применять для введения нуклеиновых кислот, кодирующих компоненты системы CRISPR-Cas в клетки в культуре или в организме-хозяине.

10 Невирусные векторные системы доставки включают в себя ДНК-плазмиды, РНК (*например*, транскрипт вектора, описанного в данном документе), «голую» нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту в комплексе с носителем доставки. В одном варианте осуществления применяемая невирусная векторная система доставки представляет собой предварительно сформированный рибонуклеопротеиновый комплекс (*например*,
15 комплекс, содержащий белок Cas9 в комплексе с нацеливающей нРНК). Предварительно сформированный рибонуклеопротеиновый комплекс затем могут внедрять в клетку посредством электропорации, биолистической бомбардировки или других физических способов доставки. В одном варианте осуществления применяется электропорация для внедрения в клетку предварительно сформированного рибонуклеопротеинового
20 комплекса.

Системы доставки на основе вирусных векторов включают в себя ДНК- и РНК-вирусы, которые после доставки в клетку создают либо эпизомальные, либо интегрированные геномы. Вирусные векторы могут вводить непосредственно пациентам (*in vivo*), или их могут применять для обработки клеток *in vitro* или *ex vivo*, после чего
25 модифицированные клетки могут вводить пациентам. В одном варианте осуществления изобретения в настоящем раскрытии используются системы на основе вирусов, включающие, но не ограничивающиеся ими, ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные, аденоассоциированные вирусные векторы и вирусные векторы простого герпеса для переноса генов. Кроме того, в настоящем раскрытии предлагаются векторы, способные
30 интегрироваться в геном-хозяина, такие как ретровирус или лентивирус. Предпочтительно, вектор, применяемый для экспрессии системы CRISPR-Cas по настоящему раскрытию представляет собой лентивирусный вектор.

В одном варианте осуществления в раскрытии предлагается внедрение одного или более векторов, кодирующих CRISPR-Cas, в эукариотическую клетку. Клетка может быть
35 раковой клеткой. Альтернативно, клетка представляет собой гемопоэтическую клетку,

такую как гемопоэтическая стволовая клетка. Примеры стволовых клеток включают в себя плюрипотентные, мультипотентные и унипотентные стволовые клетки. Примеры плюрипотентных стволовых клеток включают в себя эмбриональные стволовые клетки, эмбриональные зародышевые клетки, эмбриональные клетки карциномы и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). В предпочтительном варианте осуществления в описании предлагается внедрение CRISPR-Cas9 в гемопоэтическую стволовую клетку.

Векторы по настоящему раскрытию доставляют в эукариотические клетки у субъекта. Модификация эукариотических клеток посредством системы CRISPR/Cas9 может происходить в клеточной культуре, причем данный способ включает выделение эукариотической клетки от субъекта до модификации. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно включает возвращение указанной эукариотической клетки и/или клеток, полученных от субъекта.

15 **комбинированная терапия**

Описанные в данном документе агенты, содержащие антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с линиеспецифическим антигеном клеточной поверхности (например, CD33), могут вводить субъекту в комбинации с гемопоэтическими клетками, которые дефектны по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности, например гемопоэтическими стволовыми клетками или клетками-предшественниками, полученными с использованием нРНК, описанной в данном документе, например, при этом нРНК содержит нуклеотидную последовательность AUCCUGGCACUCUAGAACC (SEQ ID NO: 67) или CCUCACUAGACUUGACCCAC (SEQ ID NO: 70)). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки включают в себя генетическую мутацию по сайту, содержащему последовательность ATCCCTGGCACTCTAGAACC (SEQ ID NO: 50) или CCTCACTAGACTTGACCCAC (SEQ ID NO: 58). Используемые в данном документе термины «субъект», «индивид» и «пациент» применяют взаимозаменяемо, и относятся к позвоночному, предпочтительно такому млекопитающему, как человек. Млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, человеческие приматы, не являющиеся человеком приматы или виды мышевидных, крупного рогатого скота, лошадей, собачьих или кошачьих. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой пациента-человека, имеющего гемопоэтическое злокачественное новообразование.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты и/или гемопоэтические клетки могут смешивать с фармацевтически приемлемым носителем с образованием фармацевтической композиции, которая также входит в объем настоящего раскрытия.

Для выполнения описанных в данном документе способов могут совместно вводить субъекту, нуждающемуся в лечении, эффективное количество агента, содержащего антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с линиеспецифическим антигеном клеточной поверхности, и эффективное количество гемопозитических клеток. Используемый в данном документе термин «эффективное количество» может применяться взаимозаменяемо с термином «терапевтически эффективное количество» и относится к количеству агента, клеточной популяции или фармацевтической композиции (*например*, композиции, содержащей агент и/или гемопозитические клетки), которое достаточно для получения в результате требуемой активности при введении субъекту, нуждающемуся в этом. В контексте настоящего раскрытия термин «эффективное количество» относится к количеству соединения, клеточной популяции или фармацевтической композиции, которое достаточно для задержки проявления, остановки прогрессирования, облегчения или смягчения по меньшей мере одного симптома нарушения, излечиваемого способами по настоящему раскрытию. Следует отметить, что при введении комбинации активных ингредиентов эффективное количество комбинации может содержать или не содержать количества каждого ингредиента, которые были бы эффективным при применении по отдельности.

Эффективные количества варьируются, как признают специалисты в данной области, в зависимости от конкретного состояния, которое лечат, тяжести состояния, индивидуальных параметров пациента, включая возраст, физическое состояние, размер, пол и вес, продолжительность лечения, характера сопутствующей терапии (если таковая имеется), конкретного пути введения и подобных факторов в пределах знаний и опыта практикующего врача. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективное количество смягчает, успокаивает, облегчает, улучшает, уменьшает симптомы или задерживает прогрессирование любого заболевания или нарушения у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой пациента-человека, имеющего гемопозитическое злокачественное новообразование.

Описанные в данном документе гемопозитические клетки и/или иммунные клетки, экспрессирующие химерные рецепторы, могут быть аутологичны субъекту, *т. е.* клетки получены от субъекта, нуждающегося в лечении, генетически сконструированы дефектными по экспрессии линиеспецифического антигена клеточной поверхности или экспрессии химерных рецепторных конструкций, и затем их вводят тому же субъекту. Введение аутологичных клеток субъекту может приводить к снижению отторжения клеток-хозяев по сравнению с введением неаутологичных клеток. Альтернативно, клетки-

хозяева представляют собой аллогенные клетки, т. е. клетки получают от первого субъекта, генетически конструируют дефектными для экспрессии линиеспецифического антигена клеточной поверхности или экспрессии химерных рецепторных конструкций, и их вводят второму субъекту, отличному от первого субъекта, но того же вида. Например, аллогенные иммунные клетки могут получать от донора-человека и вводить реципиенту-человеку, который отличается от донора.

В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунные клетки и/или гемопоэтические клетки представляют собой аллогенные клетки, и они были дополнительно генетически сконструированы для снижения заболевания «трансплантат против хозяина». Например, описанные в данном документе гемопоэтические стволовые клетки могут генетически конструировать (*например*, с использованием редактирования генома) для получения пониженной экспрессии CD45RA.

В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунные клетки, экспрессирующие любой из химерных рецепторов, описанных в данном документе, вводят субъекту в количестве, эффективном в снижении количества клеток-мишеней (*например*, раковых клеток) на по меньшей мере 20%, *например* 50%, 80%, 100%, 2-кратно, 5-кратно, 10-кратно, 20-кратно, 50-кратно, 100-кратно или более.

Типичное количество клеток, т. е. иммунных клеток или гемопоэтических клеток, вводимых млекопитающему (*например*, человеку), может находиться, например, в диапазоне от одного миллиона до 100 миллиардов клеток; однако количества ниже или выше этого примерного диапазона также входят в объем настоящего раскрытия. Например, суточная доза клеток может составлять от около 1 миллиона до около 50 миллиардов клеток (*например*, около 5 миллионов клеток, около 25 миллионов клеток, около 500 миллионов клеток, около 1 миллиард клеток, около 5 миллиардов клеток, около 20 миллиардов клеток, около 30 миллиардов клеток, около 40 миллиардов клеток, или диапазон, определенный любыми двумя из двух вышеприведенных значений), предпочтительно от около 10 миллионов до около 100 миллиардов клеток (*например*, около 20 миллионов клеток, около 30 миллионов клеток, около 40 миллионов клеток, около 60 миллионов клеток, около 70 миллионов клеток, около 80 миллионов клеток, около 90 миллионов клеток, около 10 миллиардов клеток, около 25 миллиардов клеток, около 50 миллиардов клеток, около 75 миллиардов клеток, около 90 миллиардов клеток, или диапазон, определенный любыми двумя из двух вышеприведенных значений), предпочтительнее от около 100 миллионов клеток до около 50 миллиардов клеток (*например*, около 120 миллионов клеток, около 250 миллионов клеток, около 350 миллионов клеток, около 450 миллионов клеток, около 650 миллионов клеток, около 800

миллионов клеток, около 900 миллионов клеток, около 3 миллиарда клеток, около 30 миллиардов клеток, около 45 миллиардов клеток, или диапазон, определенный любыми двумя из двух вышеприведенных значений).

В одном варианте осуществления химерный рецептор (*например*, нуклеиновая кислота, кодирующая химерный рецептор) внедряют в иммунную клетку, и субъект (*например*, пациент-человек) получает начальное введение или дозу иммунных клеток, экспрессирующих данный химерный рецептор. Одна или более последующих введений агента (*например*, иммунных клеток, экспрессирующих химерный рецептор) могут предоставлять пациенту с интервалами 15 дней, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения. Более одной дозы агента могут вводить субъекту еженедельно, *например*, 2, 3, 4 или более введений агента. Субъект может получать более одной дозы агента (*например*, иммунной клетки, экспрессирующей химерный рецептор) еженедельно, затем следует неделя без введения агента, и, наконец, следует одна или более дополнительных доз агента (*например*, более одного введения иммунных клеток, экспрессирующих химерный рецептор в неделю). Иммунные клетки, экспрессирующие химерный рецептор, могут вводить каждый второй день в течение 3 введений в неделю в течение двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или более недель.

В контексте настоящего изобретения, поскольку оно относится к любому из перечисленных в данном документе болезненных состояний, термины «лечить», «лечение» и т. п. означают облегчение или смягчение по меньшей мере одного симптома, связанного с таким состоянием, или замедление или обращение вспять прогрессирования такого состояния. В контексте настоящего изобретения термин «лечить» также означает остановку, задержку начала (т. е. период до клинического проявления заболевания) и/или снижение риска развития или ухудшения заболевания. Например, в связи с раком термин «лечить» может означать устранение или уменьшение опухолевой нагрузки у пациента, или предотвращение, задержку или подавление метастазирования и т. д.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, содержащий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает линиеспецифический антиген клеточной поверхности, и популяцию гемопоэтических клеток, дефектных по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности. Соответственно, в таких терапевтических способах агент распознает (связывает) клетки-мишени, экспрессирующие линиеспецифический антиген клеточной поверхности для нацеливаемого уничтожения. Гемопоэтические клетки, дефектные по антигену, обеспечивают восстановление популяции того типа клеток, на который нацелен агент. В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение пациента может включать

следующие стадии: (1) введение пациенту терапевтически эффективного количества агента, нацеливающего линиеспецифический антиген клеточной поверхности, и (2) инфузию или реинфузию пациенту гемопоэтических стволовых клеток, либо аутологичных, либо аллогенных, причем гемопоэтические клетки имеют пониженную экспрессию линиеспецифического антигена, связанного с заболеванием. В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение пациента может включать следующие стадии: (1) введение пациенту терапевтически эффективного количества иммунных клеток, экспрессирующих химерный рецептор, причем иммунные клетки содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный рецептор, который связывает линиеспецифический антиген клеточной поверхности, связанный с заболеванием; и (2) инфузию или реинфузию пациенту гемопоэтических клеток (*например*, гемопоэтических стволовых клеток), либо аутологичных, либо аллогенных, при этом гемопоэтические клетки имеют пониженную экспрессию линиеспецифического антигена, связанного с заболеванием.

Эффективность терапевтических способов, использующих агент, содержащий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает линиеспецифический антиген клеточной поверхности, и популяцию гемопоэтических клеток, дефектных по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности, могут оценивать любым способом, известным в данной области техники, и они могут быть очевидны специалисту в медицинской области. Например, эффективность терапии может оцениваться по выживанию субъекта или раковой нагрузки у субъекта или в его ткани или образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность терапии оценивается путем количественного определения числа клеток, принадлежащих к определенной популяции или линии клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность терапии оценивается путем количественного определения числа клеток, презентующих линиеспецифический антиген клеточной поверхности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, содержащий антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с линиеспецифическим антигеном клеточной поверхности, и популяцию гемопоэтических клеток, вводят параллельно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, содержащий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает линиеспецифический антиген клеточной поверхности (*например*, иммунные клетки, экспрессирующие химерный рецептор, описанный в данном документе), вводят перед введением гемопоэтических клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, содержащий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает линиеспецифический антиген

клеточной поверхности (*например*, иммунные клетки, экспрессирующие химерный рецептор, описанный в данном документе), вводят за по меньшей мере примерно 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 3 месяца, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев или более до введения гемопоэтических клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, содержащий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает линиеспецифический антиген клеточной поверхности (*например*, иммунные клетки, экспрессирующие химерный рецептор, описанный в данном документе), вводят субъекту множество раз перед введением гемопоэтических клеток.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гемопоэтические клетки вводят перед агентом, содержащим антигенсвязывающий фрагмент, который связывает линиеспецифический антиген клеточной поверхности (*например*, иммунные клетки, экспрессирующие химерный рецептор, описанный в данном документе). В некоторых вариантах осуществления изобретения популяцию гемопоэтических клеток вводят за по меньшей мере примерно 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 3 месяца, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев или более до введения агента, содержащего антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с линиеспецифическим антигеном клеточной поверхности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, нацеливающий линиеспецифический антиген клеточной поверхности и популяцию гемопоэтических клеток, вводят по существу одновременно. В некоторых вариантах осуществления изобретения вводят агент, нацеливающий линиеспецифический антиген клеточной поверхности, и пациент оценивается в течение определенного периода времени, после чего вводят популяцию гемопоэтических клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения вводят популяцию гемопоэтических клеток, и пациент оценивается в течение определенного периода времени, после чего вводят агент, нацеливающий линиеспецифический антиген клеточной поверхности.

Также в пределах объема настоящего раскрытия находится множество введений (*например*, доз) агентов и/или популяций гемопоэтических клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты и/или популяции гемопоэтических клеток вводят субъекту один раз. В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты и/или популяции гемопоэтических клеток вводят субъекту более одного раза (*например*, по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или более раз). В некоторых вариантах осуществления

изобретения агенты и/или популяции гемопоэтических клеток вводят субъекту с постоянным интервалом, *например* каждые шесть месяцев.

В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект является субъектом-человеком, имеющим гемопоэтическое злокачественное новообразование. Используемое в данном документе гемопоэтическое злокачественное новообразование относится к злокачественной аномалии, вовлекающей гемопоэтические клетки (*например*, клетки крови, включая клетки-предшественники и стволовые клетки). Примеры гемопоэтических злокачественных новообразований включает, без ограничений, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, лейкоз или множественную миелому. Лейкозы включают острый миелоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфобластный лейкоз, и хронический лимфоидный лейкоз.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лейкоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML). AML характеризуется как гетерогенное, клональное, неопластическое заболевание, происходящее из трансформированных клеток, которые постепенно приобретают критические генетические изменения, нарушающие ключевые пути дифференцировки и регуляции роста. (Dohner et al., *NEJM*, (2015) 373:1136). Гликопротеин CD33 экспрессируется на большинстве миелоидных лейкозных клеток, а также на нормальных миелоидных и моноцитарных предшественниках и считается привлекательной мишенью для терапии AML (Laszlo et al., *Blood Rev.* (2014) 28(4):143-53). Хотя клинические испытания с использованием терапии на основе моноклональных антител против CD33 показали улучшение выживаемости у подгруппы пациентов с AML при комбинировании со стандартной химиотерапией, эти эффекты также сопровождалась проблемами с безопасностью и эффективностью.

Другие усилия, способствующие нацеливанию клеток AML, включали создание T-клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (CAR), которые избирательно нацеливали CD33 при AML. Buckley et al., *Curr. Hematol. Malig. Rep.* (2):65 (2015). Однако данные ограничены, и существуют неопределенности относительно того, насколько эффективным (уничтожаются ли все клетки-мишени) может быть этот подход в лечении пациента. Кроме того, поскольку клетки миелоидной линии незаменимы для жизни, истощение у субъекта клеток миелоидной линии может иметь пагубные последствия для выживания пациента. Настоящее раскрытие направлено, по меньшей мере частично, на решение таких проблем, связанных с лечением AML.

Альтернативно или дополнительно, описанные в данном документе способы могут использовать для лечения негемопоэтических раковых заболеваний, включая, без ограничения, рак легких, рак уха, носа и горла, рак толстой кишки, меланому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак груди, рак яичников, базальноклеточную карциному, рак желчевыводящих путей; рак мочевого пузыря; рак костей; рак груди; рак шейки матки; хориокарциному; рак толстой и прямой кишки; рак соединительной ткани; рак пищеварительной системы; рак эндометрия; рак пищевода; рак глаза; рак головы и шеи; рак желудка; интраэпителиальное новообразование; рак почки; рак гортани; рак печени; фиброму, нейробластому; рак полости рта (например, губы, языка, рта и глотки); рак яичников; рак поджелудочной железы; рак простаты; ретинобластому; рабдомиосаркому; рак прямой кишки; рак почек; рак дыхательной системы; саркому; рак кожи; рак желудка; рак яичек; рак щитовидной железы; рак матки; рак мочевыделительной системы, а также другие карциномы и саркомы.

Карциномы представляют собой раковые заболевания эпителиального происхождения. Карциномы, предназначенные для лечения способами по настоящему раскрытию, включают, но не ограничиваются ими, ацинарную карциному, ацинозную карциному, альвеолярную аденокарциному (также называемую аденокистозной карциномой, аденомиоэпителиомой, крибриформной карциномой и цилиндромой), аденоматозную карциному, аденокарциному, карциному коры надпочечников, альвеолярную карциному, альвеолярно-клеточную карциному (также называемая бронхиолярной карциномой, альвеолярно-клеточной опухолью и аденоматозом легких), базально-клеточную карциному, базоцеллюлярную карциному (также называемую базаломой или базиломой, и карциномой волосяного матрикса), базалоидную карциному, базоплоскоклеточную карциному, карциному молочной железы, бронхоальвеолярную карциному, бронхиолярную карциному, бронхогенную карциному, церебриформную карциному, холангиоцеллюлярную карциному (также называемую холангиомой и холангиокарциномой), хорионическую карциному, коллоидную карциному, комедокарциному, карциному тела, крибриформную карциному, карциному en cuirasse, карциному кожи, цилиндрическую карциному, цилиндроклеточную карциному, протоковую карциному, твердую карциному, эмбриональную карциному, энцефалоидную карциному, эпибульбарную карциному, эпидермоидную карциному, эпителиальную аденоидную карциному, карциному exulcere, фибриозную карциному, желатинообразную карциному, желатинозную карциному, гигантоклеточную карциному, гигантоцеллюлярную опухоль, железистую карциному, гранулозоклеточную карциному,

карциному волосяного матрикса, гематоидную карциному, гепатоцеллюлярную карциному (также называемую гепатомой, злокачественной гепатомой и гепатокарциномой), карциному из клеток Гюртле, гиалиновую карциному, гипернефроидную карциному, младенческую эмбриональную карциному, карциному *in situ*, внутриэпидермальную карциному, внутриэпителиальную карциному, карциному Кромпехера, карциному из клеток Кульчицкого, лентикулярную карциному, карциному лентикуляре, липоматозную карциному, лимфоэпителиальную карциному, маститоидную карциному, карциному медуллярре, медуллярную карциному, карцинома меланодес, меланотическую карциному, муцинозную карциному, карциному муципарум, мукоцеллюлярную карциному, мукоэпидермоидную карциному, карциному мукозум, мукозную карциному, карциному миксоматодес, назофарингеальную карциному, карциному нигрум, овсяноклеточную карциному, оссифицирующую карциному, остеоидную карциному, карциному яичника, папиллярную карциному, перипортальную карциному, преинвазивную карциному, карциному простаты, почечно-клеточную карциному почки (также называемую аденокарциномой почки и гипермефороидной карциномой), резервно-клеточную карциному, карциному саркоматодес, шайндерианову карциному, скиррозную карциному, карциному скроти, перстневидноклеточную карциному, недифференцированную карциному, мелкоклеточную карцинома, соланоидную карциному, сфероидноклеточную карциному, веретенноклеточную карциному, губчатую карциному, сквамозную карциному, сквамозно-клеточную карциному, струнную карциному, телеангиэктатическую карциному, карциному телеангиэктодес, переходноклеточную карциному, узловатую карциному, туберозную карциному, веррукозную карциному, ворсинчатую карциному. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения способы по настоящему раскрытию используются для лечения субъектов, страдающих раком молочной железы, шейки матки, яичника, предстательной железы, легкого, толстой и прямой кишок, поджелудочной железы, желудка или почки.

Саркомы представляют собой мезенхимальные новообразования, возникающие в костях и мягких тканях. Различают различные типы сарком, к которым относятся: липосаркомы (включая миксоидные липосаркомы и плейоморфные липосаркомы), лейомиосаркомы, рабдомиосаркомы, злокачественные опухоли оболочки периферического нерва (также называемые злокачественными шванномами, нейрофибросаркомами или нейрогенными саркомами), опухоли Юинга (включая костную саркому Юинга, внекостную (т. е., некостную) саркому Юинга и примитивную нейроэктодермальную опухоль [PNET]), синовиальная саркома, ангиосаркомы,

гемангиосаркомы, лимфангиосаркомы, саркома Капоши, гемангиоэндотелиома, фибросаркома, десмоидная опухоль (также называемая агрессивным фиброматозом), возвышающаяся дерматофибросаркома (DFSP), злокачественная фиброзная гистиоцитома (MFH), гемангиоперицитома, злокачественная мезенхимомы, альвеолярная саркома мягких тканей, эпителиоидная саркома, янноклеточная саркома, десмопластическая мелкоклеточная опухоль, гастроинтестинальная стромальная опухоль (GIST) (также известная как стромальная саркома ЖКТ), остеосаркома (также известная как остеогенная саркома) — скелетная и внескелетная, и хондросаркома.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, требующий лечения, может быть рефрактерным раком. Термин «рефрактерный рак», используемый в данном документе, представляет собой рак, который резистентный к стандартной назначаемой терапии. Эти виды рака могут первоначально реагировать на лечение (а затем рецидивировать), или они могут полностью не реагировать на лечение. Обычный стандарт лечения будет варьироваться в зависимости от типа рака и степени его прогрессирования у субъекта. Это может быть химиотерапия, или операция, или облучение, или их комбинация. Специалисты в данной области знают о таких стандартах терапии. Субъекты, получающие лечение в соответствии с настоящим раскрытием в связи с рефрактерным раком, в связи с этим уже подвергались другому лечению рака. Альтернативно, если рак, вероятно, является рефрактерным (*например*, с учетом анализа раковых клеток или истории болезни субъекта), то субъект может еще не подвергаться другому лечению. Примеры резистентных раковых заболеваний включают в себя, но не ограничиваются ими, лейкоз, меланомы, почечноклеточные карциномы, рак толстой кишки, рак печени (печеночный рак), рак поджелудочной железы, неходжкинская лимфома и рак легкого.

Любую из иммунных клеток, экспрессирующих химерные рецепторы, описанные в данном документе, могут вводить в фармацевтически приемлемом носителе или вспомогательном веществе в виде фармацевтической композиции.

Фраза «фармацевтически приемлемый», используемая в связи с композициями и/или клетками по настоящему раскрытию, относится к молекулярным объектам и другим ингредиентам таких композиций, которые являются физиологически переносимыми и обычно не вызывают нежелательных реакций при введении млекопитающему (*например*, человеку). Предпочтительно, используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регуляторным агентством Федерального правительства или правительством штата, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения для млекопитающих и,

более конкретно, для людей. «Приемлемый» означает, что носитель совместим с активным ингредиентом композиции (*например*, нуклеиновыми кислотами, векторами, клетками или терапевтическими антителами) и не влияет отрицательно на субъекта, которому вводят композицию(-и). Любая из фармацевтических композиций и/или клеток, получающих использование в настоящих способах, может содержать фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы в форме лиофилизированных образований или водных растворов.

Фармацевтически приемлемые носители, включая буферы, хорошо известны в данной области и могут включать фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты; полипептиды с низкой молекулярной массой; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; аминокислоты; гидрофобные полимеры; моносахариды; дисахариды; и другие углеводы; металлокомплексы; и/или неионные поверхностно-активные вещества. См., *например* Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. К. Е. Hoover.

Наборы для терапевтического применения

Наборы для применения агентов, нацеливающих линиеспецифический антиген клеточной поверхности, в комбинации с популяцией гемопоэтических клеток, которые являются дефектными по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности, также находятся в пределах объема настоящего раскрытия. Такие наборы могут включать в себя один или более контейнеров, содержащих первую фармацевтическую композицию, которая содержит любой агент, содержащий антигенсвязывающий фрагмент, которых связывает линиеспецифический антиген клеточной поверхности (*например*, иммунные клетки, экспрессирующие химерные рецепторы, описанные в данном документе), и фармацевтически приемлемый носитель, и вторую фармацевтическую композицию, которая содержит популяцию гемопоэтических клеток, которые дефектны по линиеспецифическому антигену клеточной поверхности (*например*, гемопоэтическую стволовую клетку) и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления изобретения набор содержит нРНК, которая связывает сайт, имеющий последовательность ATCCCTGGCACTCTAGAACC (SEQ ID NO: 50) или CCTCACTAGACTTGACCCAC (SEQ ID NO: 58). В некоторых вариантах осуществления изобретения нРНК содержит нуклеотидную последовательность CCUCACUAGACUUGACCCAC (SEQ ID NO: 70) или AUCCUGGCACUCUAGAACC (SEQ ID NO: 67).

В некоторых вариантах осуществления изобретения набор может содержать инструкции по применению любого из описанных в данном документе способов. Включенные инструкции могут содержать описание введения первой и второй фармацевтических композиций субъекту для достижения у субъекта предполагаемой активности. Набор может дополнительно содержать описание выбора субъекта, подходящего для лечения, на основе определения того, нуждается ли субъект в лечении. В некоторых вариантах осуществления изобретения инструкции содержат описание введения первой и второй фармацевтических композиций субъекту, нуждающемуся в лечении.

10 Инструкции, относящиеся к применению агентов, нацеливающих линиеспецифические антигены клеточной поверхности и первую и вторую фармацевтические композиции, описанные в данном документе, обычно содержат информацию о дозировке, режиме дозирования и пути введения предполагаемого лекарственного средства. Контейнеры могут быть стандартными дозами, упаковками со 15 множеством доз (*например*, многодозовыми упаковками) или частичными дозами. Инструкции, поставляемые в наборах по данному описанию, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или листке-вкладыше. Этикетка или листок-вкладыш указывают, что фармацевтические композиции применяются для лечения, задержки начала и/или облегчения заболевания или нарушения у субъекта.

20 Предлагаемые в данном документе наборы находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку и т. п., но не ограничивается этим. Также предусмотрены упаковки для применения в комбинации с конкретным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения или устройство для инфузии. Набор может иметь стерильный порт доступа (например, 25 контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций). Контейнер может также иметь порт для стерильного доступа. По меньшей мере один активный агент в фармацевтической композиции представляет собой варианты химерного рецептора, описанные в данном документе.

30 Наборы необязательно могут предоставлять дополнительные компоненты, такие как буферы, и интерпретирующую информацию. Обычно набор содержит контейнер и этикетку или листок-вкладыш(-и) на контейнере или связанные с ним. В некоторых вариантах осуществления в данном раскрытии предлагаются изделия, содержащие 35 содержимое описанных выше наборов.

Общие методики

В практическом применении настоящего раскрытия будут использоваться, если не указано иное, обычные методики молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые

5 находятся в пределах компетенции в данной области техники. Такие методики полностью описаны в литературе, например как *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed. 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I.

10 Freshney, ed. 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds. 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.): *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos,

15 eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds. 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis, et al., eds. 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practice approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal*

20 *antibodies: a practical approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995); *DNA Cloning: A practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds.(1985»;

25 *Transcription and Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984»»; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986»»; *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986»»; и В. Perbal, *A practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel *et al.* (eds.).

Без дальнейшего уточнения считается, что специалист в данной области техники может, основываясь на приведенном выше описании, использовать настоящее

30 раскрытие в его самом полном объеме. Следующие конкретные варианты осуществления изобретения, следовательно, должны толковаться исключительно как иллюстративные, а не ограничивающие каким-либо образом остальную часть раскрытия. Все публикации, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки для целей или предмета изобретения, упомянутых в данном документе.

ПРИМЕР 1. *In vitro* удаление CD33 в лейкозной клеточной линии человека

С целью тестирования способности системы CRISPR-Cas9 нацеливаться на CD33 *in vitro*, лейкозные клетки К-562 человека совместно трансфицировали с использованием Neon™ (Thermo Fisher Scientific) с Cas9-GFP (PX458, *S. pyogenes*) и направляющей РНК, содержащей РАМ-последовательность NGG (ФИГ. 4), причем направляющая РНК разработана для нацеливания геномной последовательности hCD33. Через 48 часов после трансфекции клетки, экспрессирующие Cas9, идентифицировали и выделяли с использованием сортировки FACS по GFP. Клетки затем инкубировали в течение 96 часов и тестировали на экспрессию CD33 методом проточной цитометрии (ФИГ. 5).
 5 Графики проточной цитометрии, полученные с использованием антитела против CD33, показывают экспрессию CD33 клетками К-562 до (верхний график) и после (нижний график) доставки вектора Cas9 и направляющей РНК. Как показано на ФИГ. 5, у 98% клеток отсутствовала экспрессия CD33 после трансфекции.

Этот пример демонстрирует эффективную делецию CD33 с использованием системы CRISPR-Cas9 в лейкозных клетках человека.
 15

ПРИМЕР 2. *In vitro* удаление CD45 в лейкозных клеточных линиях человека

Систему CRISPR-Cas9 использовали для нацеливания CD45RA *in vitro*. Вкратце, Т1В-67 макрофаг-подобные клетки саркомы из ретикулярных клеток мыши совместно трансфицировали с использованием реагента Neon™ (Thermo Fisher Scientific) с Cas9-GFP (PX458, *S. pyogenes*) и нРНК CRISPR (содержащими РАМ-последовательность «NGG»), нацеливающей геномную последовательность hCD45RA. Через 48 часов после трансфекции клетки, экспрессирующие систему CRISPR-Cas9 идентифицировали и выделяли с использованием сортировки FACS по GFP. Клетки затем инкубировали в течение 96 часов и тестировали на экспрессию CD45RA (ФИГ. 6).
 20 Графики проточной цитометрии, полученные с использованием антитела к CD45RA, показывают экспрессию CD45RA до (верхний график) и после (нижний график) доставки вектора Cas9 и направляющей РНК.

Подобно примеру 1, в котором экспрессия CD33 успешно снижалась в лейкозных клетках, результаты в этом примере указывают на эффективность нацеливания CD45RA с использованием системы CRISPR-Cas9.
 30

ПРИМЕР 3. Нацеливание линиеспецифического CD33 клеточной поверхности при остром миелоидном лейкозе (AML)

Настоящий пример охватывает нацеливание антигена CD33 при AML. Конкретные стадии примера отмечены в таблице 6.

Таблица 6. Схема плана эксперимента

I. Аутологичная CD33-нацеленная (CAR) Т-клеточная терапия

1. Создание CAR-конструкций против CD33
2. Выделение у пациента Т-клеток CD8⁺
3. Подготовка CAR-Т-клеток CD33
4. Реинфузия пациенту CAR-Т-клеток CD33

II. Трансплантат аутологичных гемопоэтических стволовых клеток с использованием клеток CD34⁺CD33⁻

1. Выделение гемопоэтических стволовых клеток
2. Плазида CRISPR-Cas9, нацеливающая CD33
3. Создание клеток CD34⁺CD33⁻ системы CRISPR-CAS
4. Реинфузия пациенту клеток CD34⁺CD33⁻

III. Продолжение лечения пациента с помощью антитела к CD33, присоединенного к токсину (иммунотоксину)

I. CD33-нацеленная Т-клеточная терапия с химерным антигенным рецептором (CAR)

A. Создание CAR-конструкций против CD33

Химерные антигенные рецепторы, нацеливающие CD33, описанные в данном документе, могут состоять из следующих компонентов в порядке 5'-3': лентивирусный скелет pHIV-Zsgreen (www.addgene.org/18121/), пептидный сигнал, scFv CD33, шарнирные, трансмембранные области молекулы CD28, внутриклеточный домен CD28 и сигнальный домен молекулы TCR- ζ .

Первоначально пептидный сигнал, легкую цепь против CD33 (SEQ ID NO: 1), гибкий линкер и тяжелую цепь против CD33 (SEQ ID. NO. 2) клонировали в сайт EcoRI pHIV-Zsgreen с оптимальной последовательностью Козак.

Последовательности нуклеиновой кислоты примеров химерных рецепторов, которые связывают CD33 с основной структурой легкая цепь–линкер–тяжелая цепь–шарнир–CD28/ICOS–CD3 ζ представлены ниже.

Часть 1: легкая цепь–линкер–тяжелая цепь (SEQ ID NO: 16): начальный сайт Козак показан жирным шрифтом. Пептидный сигнал L1 показан курсивом. Легкая цепь и тяжелая цепь против CD33, показанные жирным шрифтом и курсивом, разделены линкером.

ggtgtcgtgagcggccgctgaactg**GCCACCATGGACATGAGGGTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGC**
TCCTGCTGCTCTGGCTCTCAGGTGCCAGATGTGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCG
GCAGCCTGGCCGTGAGCCCCGGCAAGAGGGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCA
GAGCGTGTTCAGCAGCAGCCAGAAGA*ACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGATCC*
CCGGCCAGAGCCCCAGGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCCAGGGAGAGCGGCGT
GCCCGACAGGTTACCGGCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACC
ATCAGCAGCGTGACAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAG
CAGCAGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGGGGCAGCACCCAGC
GGCAGCGGCAAGCCCGGCAGCGGCGAGGGCAGCACCAAGGGCCAGGTGCAGCTG
CAGCAGCCCCGGCGCCGAGGTGGTGAAGCCCGGCCAGCGTGAAGATGAGCTGCA
AGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCC
GGCCAGGGCCTGGAGTGGGTGGGCGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCT
ACAACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGAGCAGCACCCAC
CGCCTACATGCAGCTGAGCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGC

***GCCAGGGAGGTGAGGCTGAGGTA CTTCGACGTGTGGGGCCAGGGCACCCCGTGA
CCGTGAGCAGC***

- Часть 2: шарнир–CD28/ICOS–CD3 ζ сайты фермента NotI рестрикции показаны
5 заглавными буквами. Сайт остановки трансляции показан жирным шрифтом.
Рестриционный сайт расщепления BamHI показан подчеркиванием.

Костимулирующий домен CD28 (SEQ ID NO: 17)

- 10 GCGGCCGCAattgaagttatgtatcctcctcttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaaac
acctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctttgggtgctggtggtggtggtggagtctggcttgctatagcttgctagt
aacagtggcctttattattttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtactacatgaacatgactccccgccgccccg
ggcccAcccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagttcagcaggagcgcga
gacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttggacaa
15 gagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaaga
taagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaaggcagcgcggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggctc
agtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgcTAAcgcccctctccctcccccccccta
a

- 20 Костимулирующий домен ICOS (SEQ ID NO: 18)

- GCGGCCGCActatcaattttgatcctcctctttaaagtaactcttacaggaggatatttgcatattatgaatcacaactttgttgcc
agctgaagttctggttaccatagatgtgcagcctttgttagtctgcattttgggatgcatactattgttgcttacaaaaagaagta
ttcatccagtgtgcacgaccctaacggtgaatacatgttcatgagagcagtgaacacagccaaaaaatctagactcacagatgtgacc
taagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacga
25 agagaggagtacgatgtttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaa
ggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcagcgcggaggggcaag
gggcacgatggcctttaccagggctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgcTA
Acgcccctctccctccccccccctaa

- 30 Слияние (гибрид) CD28 и костимулирующий домен ICOS (SEQ ID NO: 19)

- GCGGCCGCAattgaagttatgtatcctcctcttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaaac
acctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctttgggtgctggtggtggtggtggagtctggcttgctatagcttgctagt
aacagtggcctttattattttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtactacatgttcatgagagcagtgaacacagc
caaaaaatctagactcacagatgtgaccctaagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaacc
35 agctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggga

aagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggat
 gaaaggcgagcggcgagggggcaaggggcacgatggcctttaccaggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgccctt
 cacatgcaggcctgccccctgcTAAcgccccctctccctccccccccctaa

5 На следующем этапе шарнирная область, домен CD28 (SEQ ID NO: 3) и
 цитоплазматический компонент TCR- ζ клонируют в сайты NotI и BamHI pHIV-Zsgreen
 (уже содержащего пептидный сигнал и scFv CD33). Альтернативно, домен CD28 могут
 замещать доменом ICOS (SEQ ID NO: 4).

10 В дополнение к доменам CD28 и ICOS будет сконструирован и применен для
 создания дополнительных химерных рецепторов домен слияния (SEQ ID NO: 5),
 содержащий внутриклеточные сигнальные фрагменты CD28 и ICOS. Такая
 конфигурация, в которой химерный рецептор содержит антигенсвязывающий фрагмент,
 переменную область против CD33 легкой цепи против CD33, линкер, переменную
 область тяжелой цепи, гибридную область CD28/ICOS (включающую область TM из
 CD28) и сигнальный домен молекул TCR- ζ .

15 В данном документе предложены примеры аминокислотных последовательностей
 из компонентов, которые могут применять для создания химерных рецепторов, такие как
 домен CD28 (SEQ ID NO: 6), домен ICOS (SEQ ID NO: 7), гибридный домен CD28/ICOS
 (SEQ ID NO: 8) и TCR- ζ , предложены в данном документе. Альтернативно, могут
 создавать химерный рецептор (раздел В.)

20 **В. Альтернативный способ создания CAR-конструкций против CD33**

Схема примеров химерных рецепторов представлена на ФИГ. 7, изображения А-D.
 Химерный рецептор будут создавать с использованием внеклеточного гуманизованного
 scFv, распознающего антиген CD33, связывая его с внеклеточной шарнирной областью
 CD8, трансмембранным и цитоплазматическим сигнальным доменом и ζ -сигнальной
 25 цепью CD3 (ФИГ. 7, изображение В). ДНК, кодирующую химерный рецептор против
 CD33, будут создавать с использованием гуманизованного scFv (Essand et al., *J Intern
 Med.* (2013) 273(2):166). Альтернативы включают CAR-T-клетку, которая содержит OX-1
 или 41-BB вместо CD28 или гибридов CD28/OX1 или CD28/4-1-B-B (ФИГ. 7,
 изображения С и D).

30 Чтобы создать последовательность scFv против-CD33, кодирующие области
 тяжелой и легкой цепей переменных областей антитела против CD33, описанные выше
 (SEQ ID NO: 1 и 2), будут амплифицировать со специфическими праймерами и
 клонировать в вектор pHIV-Zsgreen для экспрессии в клетках. Чтобы оценить силу
 связывания scFv (одноцепочечных переменных фрагментов) с целевым антигеном, scFv

будет экспрессироваться в клетках Hek293T. Для этого цели вектор (pHIV-Zsgreen, содержащий кодирующие области) будет трансформирован в бактерии *E. coli* Top10F и будут получены плазмиды. Полученные экспрессионные векторы, кодирующие антитела scFv, будут вводить путем трансфекции в клетки Hek293T. После культивирования трансфицированных клеток в течение пяти дней супернатант будет удален, и антитела очищены.

Полученные антитела могут гуманизировать с использованием каркасных замен по протоколам, известным в данной области техники. См., например, один такой протокол, предоставленный компанией BioAtla (г. Сан-Диего), в котором библиотеки, кодирующие синтетические фрагменты CDR, полученные из шаблонного антитела, лигируют с фрагментами, кодирующими человеческую каркасную область, из пула человеческих каркасов, ограниченные эмбриональными последовательностями из функционально экспрессированных антител (bioatla.com/applications/express-humanization/).

Для улучшения аффинности связывания антигена могут выполнять созревание аффинности. Его могут достигать с помощью общих методик, известных в данной области, таких как фаговый дисплей (Schier R., *J. Mol. Biol* (1996), 263:551). Варианты могут подвергать скринингу на биологическую активность (*например*, аффинность связывания) с использованием, например, анализа Viacore. Чтобы идентифицировать остатки гипервариабельной области, которые могли бы быть хорошими кандидатами для модификации, могут выполнять аланиновый сканирующий мутагенез для идентификации остатков гипервариабельной области, значительно способствующих связыванию антигена. Кроме того, для улучшения аффинности антител могут использовать описанные комбинаторные библиотеки (Rajpal et al., *PNAS* (2005) 102(24): 8466). Альтернативно, компания BioAtla разработала платформу для быстрого и эффективного созревания аффинности антител, которая также может быть использована для целей оптимизации антител (bioatla.com/applications/functional-maturation/).

(C) Сборка конструкции CAR

Далее scFv против CD33 будут связывать с внеклеточной шарнирной областью CD8, трансмембранным и цитоплазматическим сигнальным доменом CD28 и ζ-сигнальной цепью CD3. Вкратце, праймеры, специфичные для последовательности scFv против CD33, будут использовать для амплификации scFv, как описано выше. Плазмида (pUN1-CD8) (www.invivogen.com/puno-cd8a), несущая полную кодирующую последовательность CD8 человека, будут применять для амплификации шарнирного и трансмембранного доменов CD8 (аминокислоты 135–205). Фрагмент CD3 ζ будут

амплифицировать из плазмиды pORF9-hCD247a Invivogen (http://www.invivogen.com/PDF/pORF9-hCD247a_10E26v06.pdf), несущей полную кодирующую последовательность CD3 ζ человека. Наконец, CD28 (аминокислоты 153-220, соответствующие ТМ и сигнальным доменам CD28) будут амплифицировать из кДНК, полученной с использованием РНК, собранной из активированных Т-клеток методом с реагентом тризол. Фрагменты, содержащие анти-CD33-scFv-CD8-шарнир+ТМ-CD28-CD3 ζ будут собирать с использованием ПЦР с удлинением через сплайс-перекрывание (splice overlap extension, SOE). Полученный фрагмент ПЦР затем будут клонировать в лентивирусный вектор pELPS. pELPS представляет собой производное лентивирусного вектора третьего поколения pRRL-SIN-CMV-eGFP-WPRE, в котором промотор CMV заменен на промотор EF-1 α , и центральный полипуриновый участок ВИЧ вставлен в направлении 5' промотора (Milone et al., *Mol Ther.* (2009) (8): 1453, Porter et al., *NEJM* (2011) (8):725). Все конструкции будут проверять секвенированием.

Альтернативно, будут создавать CAR, содержащие ICOS, CD27, 41BB или сигнальный домен OX-40 вместо домена CD28, вводить в Т-клетки и проверять на способность уничтожать CD33-положительные клетки (ФИГ. 7, изображение С). Предполагается также создание химерных рецепторов «третьего поколения» (ФИГ. 7, изображение D), которые объединяют множество сигнальных доменов, таких как CD3z-CD28-41BB или CD3z-CD28-OX40, для дальнейшего усиления активности (Sadelain et al., *Cancer Discov.*(2013) 4:388).

(D) Получение CAR-T-клеток против CD33

Первичные Т-клетки CD8⁺ человека будут выделять из периферической крови пациентов путем иммуномагнитного разделения (Miltenyi Biotec). Т-клетки будут культивировать в полной среде (RPMI 1640 с добавлением 10% инактивированной нагреванием FBS (эмбриональной бычьей сыворотки), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата, 10 мМ HEPES) и стимулировать гранулами с mAb против CD3 и против CD28 (Invitrogen), как описано ранее (Levine et al., *J. Immunol.* (1997) 159(12):5921).

Для создания вирусного вектора, способного трансдуцировать клетки-мишени и содержащего химерные рецепторы против CD33, будут использовать упаковочную клеточную линию. Для создания лентивирусных частиц созданные в разделе (1) CAR этого примера будут трансфицировать в иммортализованные нормальные фетальные почечные упаковочные клетки 293Т, их вместе с клетками будут культивировать в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы, содержащей 10% FBS, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Через 48-72 часа после трансфекции будут собирать супернатант, и рекомбинантный лентивирус концентрировать в DMEM без FBS.

Первичные Т-клетки CD8⁺ затем будут трансдуцировать при множественности инфекции (MOI) ~5-10 в присутствии полибрена. Через день будут добавлять человеческий рекомбинантный ИЛ-2 (R&D Systems) (50 МЕ/мл). Т-клетки будут культивировать в течение ~14 дней после стимуляции. Эффективность трансдукции первичных Т-клеток человека будут оценивать по экспрессии репортерного гена ZsGreen (Clontech, г. Маунтин-Вью, штат Калифорния, США).

Е. Инфузия CAR-T-клеток пациенту

Перед *в/в* инфузией пациенту CAR-T-клеток против CD33 клетки будут промывать фосфатно-солевым буфером и концентрировать. Для стадии промывания и концентрирования перед приготовлением препарата будут использовать клеточный процессор, такой как Haemonetics CellSaver (Haemonetics Corporation, г. Брейнтри, штат Массачусетс, США), который обеспечивает закрытую и стерильную систему. Готовые Т-клетки, экспрессирующие химерные рецепторы против CD33, будут готовить в виде препарата в 100 мл стерильного нормального физиологического раствора с добавкой сывороточного альбумина человека. Наконец, пациентам будут вводить инфузию с 1-10X10⁷ Т-клеток/кг в течение периода 1-3 суток (Maude et al., *NEJM* (2014) 371(16):1507). Количество вводимых инфузией Т-клеток, экспрессирующих химерные рецепторы против CD33, будет зависеть от многочисленных факторов, таких как состояние онкологического пациента, возраст пациента, предшествующее лечение и т. д.

Кроме того, в данном документе также предполагаются иммунные клетки, экспрессирующие химерные рецепторы, которые нацеливают CD45RA в дополнение к химерным рецепторам, которые нацеливают CD33 у пациентов с AML. Этого могут достигать двумя различными подходами: 1) созданием по отдельности иммунных клеток, экспрессирующих химерные рецепторы против CD33, и иммунных клеток, экспрессирующих химерные рецепторы против CD47RA, и отдельным введением пациенту обоих типов иммунных клеток, или 2) созданием иммунных клеток, нацеленных одновременно и на CD33, и на CD45RA (Kakarla et al., *Cancer* (2):151 (2014)).

II. Трансплантат аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) с использованием клеток CD34⁺CD33⁻

Понятно, что протоколы, касающиеся выделения стволовых клеток у пациентов, режимов кондиционирования, а также инфузии пациентам стволовых клеток сильно варьируются в зависимости от возраста пациента, его состояния, истории лечения и учреждения, в котором проводится лечение. Таким образом, описанный ниже протокол

является простым примером и является объектом обычной оптимизации специалистом со средней квалификацией в этой области.

5 ***А. Выделение гемопоэтических стволовых клеток с использованием мобилизации стволовых клеток периферической крови (PBSC) после адоптивного переноса CAR-T-клеток против CD33***

10 Пациента с AML будут стимулировать путем в/в введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) в количестве 10 мг/кг в сутки. Положительный отбор клеток CD34⁺ будут выполнять с использованием иммуномагнитных гранул и устройства для иммуномагнитного обогащения. Ожидается накопление минимум 2х 10⁶ клеток CD34⁺/кг массы тела с использованием клеточного сепаратора Fenwall CS 3000+ (Park et al., *Bone Marrow Transplantation* (2003) 32:889).

15 ***В. Режим кондиционирования пациентов***

15 Режим кондиционирования для аутологичного трансплантата стволовых клеток периферической крови (PBSCT) будут проводить с использованием этопозида (VP-16) + циклофосамида (CY) + общего облучения тела (TBI). Вкратце, режим будет состоять из этопозида (VP-16) при 1,8 г/м² в/в постоянная инфузия (п/в/в) в течение 26 ч в виде однократной дозы с последующим циклофосфамидом (CY) при 60 мг/кг в сутки в/в за 2 ч
20 в течение 3 суток, с последующим общим облучением тела (TBI) при 300 сГр в сутки в течение 3 суток.

Для расчета дозы будут использовать идеальную массу тела или фактическую массу тела, в зависимости от того, что меньше. Как упоминали ранее, при определении точного режима кондиционирования будут учитывать такие факторы, как состояние
25 онкологического пациента, возраст пациента, предшествующее лечение, а также тип учреждения, в котором проводится процедура.

30 ***С. Плазмидная конструкция системы CRISPR-Cas9, нацеливающейся на CD33***

30 Вектор lentiCRISPR v2, содержащий вставки Cas9 и резистентности к пурамицину, будут получать из Addgene (плазмида № 52961) (Sanjana et al., *Nat Methods* (2014) (8):783). Для клонирования CD33-направляющей последовательности одной направляющей РНК (онРНК) lentiCRISPR v2 будут разрезать и дефосфорилировать с помощью FastDigest BsmBI и FastAP (Fermentas) при 37 °С в течение 2 часов. Будут конструировать нРНК,
35 нацеливающую CD33, с помощью онлайн инструмента для оптимизированной разработки

на веб-сайте crispr.mit.edu. Альтернативно, нРНК будет иметь последовательность, изображенную на ФИГ. 12 (SEQ ID NO:11). Олигонуклеотиды нРНК CD33 будут получать из компании Integrated DNA Technologies (IDT), фосфорилировать с использованием полинуклеотидкиназы (Fermentas) при 37 °С в течение 30 минут и ренатурировать нагреванием до 95 °С в течение 5 минут и охлаждением до 25 °С при 1,5 °С/минуту. Лигазу T7 будут использовать для ренатурации олигонуклеотидов, после чего ренатурированные олигонуклеотиды будут лигировать в очищенный на геле вектор (Qiagen) при 25 °С в течение 5 минут. Получаемую плазмиду затем могут амплифицировать с использованием не содержащего эндотоксина набора midi-prep (Qiagen) (Sanjana et al., *Nat Methods* (2014)(8):783).

Альтернативно, могут использовать протокол двухвекторной системы (где нРНК и Cas экспрессируются из отдельных векторов), описанный ранее (Mandal et al., *Cell Stem Cell* (2014) 15(5):643). В этой статье Mandal et al. достигают эффективной абляции генов в гемопоэтических клетках человека с использованием системы CRISPR-Cas, экспрессируемой из невирусных векторов.

Вкратце, ген Cas9, оптимизированный по кодонам человека, содержащий С-концевой сигнал SV40 ядерной локализации, будут клонировать в экспрессионную плазмиду CAG с 2A-GFP. Для направления Cas9 на расщепление представляющих интерес последовательностей CD33 направляющую РНК (нРНК (SEQ ID. NO. 11)) будут отдельно экспрессировать из плазмиды, содержащей промотор U6 полимеразы III человека. Олигонуклеотиды последовательности нРНК будут получать из компании Integrated DNA Technologies (IDT), ренатурировать и вводить в плазмиду с использованием рестрикционных сайтов BbsI. В связи с тем, что для инициации транскрипции промотора U6 человека требуется основание G, а также требуется последовательность PAM (соседнего к протоспейсеру мотива), геном-мишень будет содержать нуклеотидную последовательность GN₂₀GG.

Помимо вливания пациентам инфузий с истощенными по CD33 гемопоэтическими стволовыми клетками HSC, будет разработан протокол, в котором пациентам впоследствии будут вливать инфузии с HSC, истощенными по CD45RA. Альтернативно, инвесторы будут создавать клетки CD34⁺CD33⁻CD45RA⁻ с использованием системы CRISPR-Cas9 для одновременного снижения активности генов как CD33, так и CD45RA. Примеры направляющих последовательностей РНК для CD45RA и CD33 показаны в таблицах 4 и 5).

D. Трансфекция клеток CD34⁺ HSC для получения клеток CD34⁺CD33⁻

Свежевыделенные, полученные из периферической крови клетки CD34⁺ (со стадии 4) будут высевать в количестве 1×10^6 клеток/мл на бессывороточную среду CellGro SCGM в присутствии фактора стволовых клеток (Stem Cell Factor, SCF) качества для клеточной культуры 300 нг/мл, FLT3-L 300 нг/мл, тромбопоэтина (TPO) 100 нг/мл и IL-3 60 нг/мл. После 24 часов предварительной стимуляции HSC CD34⁺ будут трансфицировать с помощью LentiCRISPR v2, содержащего Cas9 и нРНК CD33 с использованием набора Amaxa Human CD34 cell Nucleofector (U-008) (№ VPA-1003) (Mandal et al., *Cell Stem Cell* (2014) 15(5):643). Через 24-48 часов после трансфекции клетки CD34⁺ CD33⁻ отбирают с помощью 1,2 мкг/мл пурамицина. После селекции с пурамицином клетки CD34⁺CD33⁻ будут поддерживать в не содержащей пурамицин среде в течение пары суток.

E. Реинфузия пациенту клеток CD34⁺CD33⁻

Клетки CD34⁺, трансфицированные *ex vivo* с помощью CRISPR-Cas9-CD33 (клетки CD34⁺CD33⁻), незамедлительной реинфузируют через катетер Хикмана с использованием стандартного набора для введения в кровь с фильтром (Hacein-Bey Abina et al. *JAMA* (2015) 313(15):1550).

Как правило, пациенты, прошедшие вышеописанный протокол лечения, будут находиться под наблюдением на предмет повторного появления циркулирующих бластов и цитопений. Кроме того, в зависимости от механизма, лежащего в основе AML у конкретного пациента, успех лечения будет отслеживаться путем тестирования на повторное появление информативного молекулярного или цитогенетического маркера, или информативного паттерна проточной цитометрии. Например, повторное возникновение сигнала BCR-ABL при положительном по филадельфийской хромосоме AML будут выявляться с использованием метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с зондами для BCR (на хромосоме 22) и ABL (на хромосоме 9).

Для оценки успешной делеции CD33 посредством системы CRISPR-Cas9, у пациента будут выделять клетки CD34⁺ периферической крови (после трансплантата) и оценивать их на экспрессию CD33, например с использованием проточной цитометрии, вестерн-блоттинга или метода иммуногистохимии.

Как описано в настоящем документе, описанная в данном примере HSCT может быть как аутологичной, так и аллогенной, и подходят оба эти подхода и могут быть включены в способы, описанные в настоящем раскрытии.

III. Необязательная стадия: Продолжение лечения пациента с помощью антитела к CD33, присоединенного к токсину

A. Лечение пациентов с помощью CD33-иммунотоксина гемтузумаба озогамицина (GO)

5
10 Пациентов будут лечить с помощью 9 мг/м² антитела против CD33, гемтузумаба озогамицина (GO), в виде 2-часовой внутривенной инфузии в 2 дозах, разделенных на 2 недели (Larson et al., *Cancer* (2005), 104(7):1442-52). GO состоит из гуманизированного моноклонального антитела против CD33, которое конъюгировано с цитостатическим агентом, калихеамицином (ФИГ. 8).

15 Альтернативно, антитело против CD33 могут конъюгировать с различными токсинами, так чтобы создавать конъюгат с дифтерийным токсином, экзотоксином A *Pseudomonas* (PE) или А-цепью токсина рицина (КТ) (Wayne et al., *Кровь* (2014) 123(16): 2470). Сходным образом, антитела против CD45RA могут присоединять к токсину и включать в режим лечения.

ПРИМЕР 4. Т-клеточные и НК-клеточные линии, экспрессирующие химерный рецептор против CD33, индуцируют клеточную гибель клеток-мишеней, экспрессирующих CD33

20

Связывание химерных рецепторов с CD33

25 Химерные рецепторы, которые связывают CD33 (*например*, CART1, CART2, CART3), создавали с использованием традиционных технологий рекомбинантных ДНК и вставляли в вектор pHIV-Zsgreen (Addgene; г. Кеймбридж, штат Массачусетс, США). Векторы, содержащие химерные рецепторы, применяли для создания лентивирусных частиц, которые применяли для трансдукции различных типов клеток, например Т-клеточных линий (*например*, Т-клеток 293) и НК-клеточных линий (*например*, клеток NK92). Экспрессию химерных рецепторов выявляли вестерн-блоттингом (ФИГ. 9, изображение А) и проточной цитометрией (ФИГ. 9, изображение В).

30

35 Клетки, экспрессирующие химерные рецепторы, отбирали сортировкой флуоресцентно-активированных клеток (FACS) и оценивали на их способность к связыванию CD33. Вкратце, лизаты клеток 293Т, экспрессировавших химерные рецепторы, совместно инкубировали с CD33 или конъюгатом CD33-алофикоцианин (APC). Образцы подвергали белковому электрофорезу и дополнительно окрашивали с

помощью красителя Ponceau (ФИГ. 10, изображение А) или переносили на мембрану и действовали зондом с первичным антителом против CD3 ζ (ФИГ. 10, изображение В). В обоих случаях выявляли связывание между химерным рецептором и его мишенью, CD33.

Клетки K562, экспрессировавшие химерные рецепторы, также оценивали на связывание с CD33 методом проточной цитометрии с использованием CD33 в виде зонда (ФИГ. 10, изображение С). Наблюдали увеличение числа клеток, положительных по экспрессии химерного рецептора (CART1, CART2 или CART3) и связыванию CD33 по сравнению с клетками, содержащими пустой вектор-контроль, что указывает на связывание химерных рецепторов с CD33.

Цитотоксичность, индуцированная клетками, экспрессирующими химерные рецепторы

Клетки NK-92, экспрессирующие химерные рецепторы, функционально характеризовали на способность индуцировать цитотоксичность клеток-мишеней, презентующих CD33 на клеточной поверхности (*например*, K562 представляют собой клеточную линию хронического миелогенного лейкоза человека, которые являются CD33+). Для проведения анализов цитотоксичности эффекторные клетки (иммунные клетки, такие как клетки NK-92) инфицировали лентивирусными частицами, кодирующими химерные рецепторы, и размножали их. Через семь дней после заражения клетки, экспрессировавшие химерные рецепторы, отбирали с помощью анализа FACS путем отбора по флуоресцентным маркерам, также кодируемым вектором, кодирующим химерный рецептор (*например*, GFP+ или Red+). Отобранные клетки, экспрессировавшие химерные рецепторы, размножали в течение одной недели. Через четырнадцать дней после заражения проводили анализ цитотоксичности, включающий окрашивание клеток-мишеней (клеток, экспрессировавших на поверхности линиеспецифический антиген клеток-мишеней, CD33) с помощью карбоксифлуоресцеин-сукцинимидилового сложного эфира (CFSE) и подсчитывали как клетки-мишени, так и клетки, экспрессировавшие химерные рецепторы. Различные соотношения клеток-мишеней и клеток, экспрессировавших химерные рецепторы, совместно инкубировали в круглодонных 96-луночных планшетах в течение 4,5 часов, после чего добавляли 7-аминоактиномицин D (7-AAD) для окрашивания нежизнеспособных клеток. Выполняли проточную цитометрию для подсчета популяции жизнеспособных и нежизнеспособных клеток-мишеней. Как показано на ФИГ. 11, изображения А и В, клетки NK92, экспрессировавшие химерные рецепторы CART1, CART2 или CART3, индуцировали существенную величину клеточной гибели клеток-мишеней K562 при каждом оцененном соотношении клеток.

Для определения того, что гибель клеток K562 зависит от специфического нацеливания химерного рецептора на CD33, клетки K562 генетически модифицировали для дефектности по CD33 с использованием системы CRISPR/Cas. Вкратце, оптимизированную по кодонам человека эндонуклеазу Cas9 и нРНК, нацеливающую часть IgC-домена CD33, экспрессировали в клетках K562, получаемых в популяциях CD33-дефектных клетках K562. Клетки размножали и совместно инкубировали с клетками NK92, экспрессирующими химерные рецепторы, и выполняли анализ цитотоксичности, как описано выше. Как показано на изображении А ФИГ. 12, объединенные CD33-дефектные клетки K562 показали небольшое восстановление по клеточной гибели при совместном инкубировании с клетками NK92, экспрессирующими химерные рецепторы. Тем не менее, при выделении, размножении и применении для выполнения анализов цитотоксичности одиночных клонов CD33-дефектных клеток K562 наблюдали более значимое восстановление при цитотоксичности (ФИГ. 12, изображение В).

15

Экспрессия химерных рецепторов в первичных Т-клетках

Первичные Т-клеточные популяции выделяли из РМВС, полученных от доноров, методом FACS путем положительного отбора клеток CD4+, CD8+ или CD4+/CD8+, в результате чего были получены высокочистые популяции (ФИГ. 13, изображения А и В). Каждую из популяций первичных Т-клеток (клеток CD4+, CD8+ или CD4+/CD8+) трансдуцировали лентивирусным вектором, содержащим химерные рецепторы (*например*, CART1 и CART8), и полученные первичные Т-клетки, экспрессирующие химерные рецепторы, использовали для проведения анализов цитотоксичности, как описано выше. Совместная инкубация популяции Т-клеток CD4+, экспрессирующих химерные рецепторы, с K562 (1000 клеток-мишеней K562), не приводила к цитотоксичности клеток K562 (ФИГ. 14, изображение А). Напротив, в анализе цитотоксичности с использованием клеток CD8+ или CD4+/CD8+, экспрессирующих химерные рецепторы, и 1000 клеток-мишеней K562, клетки CD8+ или CD4+/CD8+ были способны индуцировать гибель клеток K562 при низком соотношении клеток (ФИГ. 14, изображение В).

30

Генетическая инженерия гемопоэтических стволовых клеток человека

Конструировали несколько нРНК для гибридизации с IgC-доменом CD33 (см., например, таблицу 4, SEQ ID NO: 11 или 28-31). Каждую из нРНК экспрессировали в клетках K562 вместе с эндонуклеазой Cas9. Экспрессию CD33 оценивали методом проточной цитометрии (ФИГ. 15). Как показано для Crispr 3 (SEQ ID NO: 28) и Crispr5

35

(SEQ ID NO: 29), значимое восстановление по CD33 обнаруживали в клетках, экспрессирующих CD33-нацеливающую систему CRISPR/Cas, по сравнению с контрольными клетками, экспрессирующими CD33.

CD33-дефектные гемопоэтические стволовые клетки также оценивали по различным характеристикам, включая пролиферацию, эритропоэтическую дифференцировку и образование колоний. Вкратце, CD33-дефектные гемопоэтические стволовые клетки и контрольные клетки индуцировали для дифференцировки, воздействуя на клетки гемином, и оценивали по CD71, маркер эритроидных предшественников, методом проточной цитометрии в различные моменты времени (ФИГ. 16, изображения А и В). CD33-дефектные гемопоэтические стволовые клетки подвергались эритропоэтической дифференцировке, и проточные цитометрические профили оказались похожими на контрольные клетки (CD33+). Клетки также подвергали анализу МТТ для измерения метаболической активности CD33-дефектных гемопоэтических стволовых клеток. Как показано на ФИГ. 16, изображение С, CD33-дефектные гемопоэтические стволовые клетки проявлялись сравнимо с контрольными клетками. Наконец, способность клеток к пролиферации и образованию колоний клеток наблюдали с помощью микроскопического анализа на образование колоний. Снова CD33-дефектные гемопоэтические стволовые клетки были способны образовывать колонии в той же степени, что и контрольные клетки (ФИГ. 18). Эти результаты показывают, что делеция CRISPR/Cas части CD33 не оказывает значимого влияния на способность клеток к пролиферации, дифференцировке или образованию колоний.

ПРИМЕР 5. Ген-редактированные стволовые клетки способны к CD33-направленной иммунной терапии миелоидных злокачественных новообразований

Антиген-направленные иммунотерапии острого миелоидного лейкоза (AML), такие как Т-клетки с химерными антигенными рецепторами (CAR-T) или конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), связаны с тяжелой токсичностью из-за отсутствия уникальных нацеливаемых антигенов, по которым возможно отличать лейкозные клетки от нормальных миелоидных клеток или миелоидных предшественников. В данном документе представлен новый подход к лечению AML путем нацеливания линиеспецифического миелоидного антигена CD33. Настоящий подход сочетает CD33-нацеленные CAR-T-клетки и/или ADC, гемтузумаб озогамидин, с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (HSC), которые были сконструированы для абляции экспрессии CD33 с использованием методов геномной инженерии. Показана высокоэффективная генетическая абляция антигена CD33 с использованием технологии

CRISPR/Cas9 в стволовых клетках / клетках-предшественниках человека (HSPC), и представлены доказательства того, что делеция CD33 в HSPC не нарушает их способность к приживлению и восстановлению популяции гемопоэтической системы со множеством линий *in vivo*. Полногеномное секвенирование и анализ секвенирования РНК не выявил определяемого нецелевого мутагенеза и потерю функциональных путей p53. С использованием клеточной линии AML человека (HL-60) моделировали костный мозг после ремиссии с минимальной остаточной болезнью, и было показано, что трансплантация CD33-аблированных HSPC с помощью CD33-нацеленной иммунотерапией приводит к устранению лейкоза без миелосупрессии, о чем свидетельствует приживление и восстановление потомков множества линий CD33-аблированных HSPC. Таким образом, настоящее исследование вносит вклад в развитие нацеленной иммунотерапии и может легко воспроизводиться для других злокачественных опухолей.

Острый миелоидный лейкоз представляет собой заболевание с неудовлетворенной потребностью в эффективных методах терапии, особенно у пациентов после ремиссии. Иммунотерапия, направленная против линиеспецифического антигена (LSA), такого как CD33, показывает целевые эффекты, но ограничена токсичностью, поскольку нормальные миелоидные клетки и гемопоэтические предшественники также экспрессируют CD33. В данном документе показано, что генетическая абляция CD33 в HSPC, при использовании методов CRISPR, позволяет проводить иммунотерапию против лейкозов с использованием CAR-T или антителотерапии против CD33. Смоделирован костный мозг человека после ремиссии с минимальным лейкозным заболеванием у мышей и показано эффективное удаление AML и восстановление трансплантата человека после удаления по CD33. Это исследование представляет собой новый подход к лечению миелоидных лейкозов, и он может распространяться на другие раковые заболевания и другие антигены.

Материалы и методы

Клеточная линия и первичные клетки человека

Иммортализованная остромиелоидная клеточная линия человека HL-60 получена из ATCC и культивировалась в IMDMEM с 20% фетальной бычьей сыворотки и 1% пенициллина-стрептомицина. Чтобы отследить приживление и развитие при лейкемии с течением времени, клетки HL-60 трансдуцировали лентивирусными частицами, экспрессирующими флуоресцентный белок dTomato под промотором EF1 α . Лентивирусный вектор и частицы получены компанией Vectalys (г. Тулуза, Франция).

Стволовые клетки CD34⁺ костного мозга или пуповинной крови человека приобретены у компании StemExpress (г. Фолсом, штат Калифорния, США) и поддерживались в StemSpan SFEM II (STEMCELL Technologies inc), содержащей 1% пенициллина стрептомицина, 100 нг/мл TPO, 100 нг/мл SCF, 100 нг/мл IL6 и 100 нг/мл FLT3L и UM171 0,35 нМ (Xcessbio, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США). Все цитокины человека приобретены у компании Biolegend (г. Сан-Диего, штат Калифорния, США).

Т-клетки человека очищали из свежих лейкопаков периферической крови нормальных доноров, приобретенных в Нью-Йоркском центре крови. Вкратце, лейкопак разводили 2-4 объемами фосфатно-солевого буфера (1X), с добавлением 2 mM ЭДТА, хранили при 4 °C. Затем 35 мл разведенного лейкопака осторожно наслаивали на 15 мл раствора Ficoll-Paque™ Premium (GE) и центрифугировали при 400 g, 30 мин при 25 °C, на роторе с качающимися стаканами. Затем слой мононуклеарных клеток переносили в новую пробирку, разбавляли 1:1 с помощью PBS (1X), содержащего 2 mM ЭДТА, и центрифугировали при 400 g, 15 мин при 25 °C. Затем эритроциты из осадка удаляли 1X лизисным буфером ACK (Gibco), инкубировали 5-8 минут при комнатной температуре, промывали PBS (1X), содержащим 2 mM ЭДТА, и снова центрифугированы при 400 g, 10 мин при 25 °C. Затем Т-клетки CD4⁺ и CD8⁺ положительно отбирали из осадка мононуклеарных клеток с помощью микрогранул Miltenyi Biotec CD4⁺ и CD8⁺, следуя протоколам производителя. Т-клетки CD4⁺ и CD8⁺ активировали в тот же день с использованием динагранул CD3/CD28 в соотношении гранул к клеткам 1:1 (Gibco) и размножали отдельно в среде Gibco OpTmizer™ CTST™ T-Cell Expansion SFM, содержащей IL7 10 нг/мл и IL15 5 нг/мл.

Конструкции CAR, продукция лентивируса и трансдукция

Химерный антигенный рецептор против CD33 создавали путем клонирования легкой и тяжелой цепей гуманизированного scFv против CD33 человека (клон My96), слитых в рамке считывания, с шарнирным доменом CD8 альфа, трансмембранным доменом CD8, сигнальным доменом 4-1BB и внутриклеточным доменом CD3зета в лентивирусную плазмиду pHIV-Zsgreen, подарок от Bryan Welm и Zena Werb (плаزمиды Addgene № 18121) (Welm et al. Cell Stem Cell. 2008;2(1):90-102). Все фрагменты кДНК оптимизированы по кодонам и синтезированы компанией GeneArt (г. Регенсбург, Германия). Лентивирусные частицы получены компанией Vectalys (г. Тулуза, Франция). Через 24 часа после активации Т-клетки CD4⁺ трансдуцировали лентивирусными частицами с MOI=30 и параллельно с Т-клетками CD8⁺ с MOI=40.

CRISPR/Cas9-опосредованное геномное нацеливание CD33

Стволовые клетки CD34⁺ костного мозга или пуповинной крови человека поддерживались в StemSpan SFEM II (STEMCELL Technologies inc), содержащей 1% пенициллина стрептомицина, и следующим набором цитокинов человека 100 нг/мл TPO, 5 100 нг/мл SCF, 100 нг/мл IL6 и 100 нг/мл FLT3L и UM171 0,35 нМ (Xcessbio, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США). Все цитокины человека приобретены у компании Biolegend (г. Сан-Диего, штат Калифорния, США).

TrueCut Cas9-белок V2 приобретен у компании Invitrogen. Химически модифицированные онРНК, нацеливающие CD33, разрабатывали с использованием 10 инструмента для конструирования Synthego CRISPR Gene KO и приобретали у компании Synthego. Смешивали 3 мкг TrueCut Cas9-белка и 1,5 мкг онРНК для 200 000 клеток CD34⁺ в буфере P3 (Lonza, набор Amaha P3 Primary Cell 4D-Nucleofector) и инкубировали в течение 10 мин при 37 °С. Затем клетки промывали PBS, ресуспендировали в буфере P3, смешивали с RNP-комплексом Cas9/онРНК и затем проводили электропорацию с 15 помощью 4D-Nucleofector. После электропорации клетки культивировали при 37 °С до проведения анализа.

Эффективность делеции оценивали через 7 дней после электропорации с использованием следующих антител от Biolegend: hCD34-PerCp/Cy5.5 и hCD33-FITC.

20 Полногеномное секвенирование и секвенирование РНК

После электропорации только с Cas9 или RNP-комплексом Cas9/онРНК клетки CD34⁺ поддерживали *in vitro* в течение 10 дней и выделяли их ДНК или РНК, как указано далее. ДНК очищали с помощью мининабора для ДНК QIAAmp, следуя протоколу 25 производителя, затем элюировали 30 мл и измеряли концентрацию ДНК с использованием Nanodrop и анализа Qubit dsDNA BR. РНК очищали с помощью микронабора miRNeasy, следуя протоколу изготовителя, затем элюировали 18 мкл. Для измерения концентрации и качества проводился анализ с использованием чипа Nanodrop и Bioanalyzer Pico.

Для полногеномного секвенирования использовали набор для подготовки 30 библиотек ДНК NEBNext® Ultra™ II для анализа Illumina, кластеризации и реагентов для секвенирования. Вкратце, геномную ДНК фрагментировали акустической фрагментацией, очищали и репарировали концы. Лигировали адаптеры и делали библиотеки ДНК. Библиотеки ДНК также количественно оценивали методом ПЦР в реальном времени (Applied Biosystems, г. Карлсбад, штат Калифорния, США), кластеризовали на двух 35 полосках проточной ячейки и загружали в прибор Illumina HiSeq в соответствии с инструкциями производителя. Образцы секвенировали с использованием конфигурации

2x 150 парных концов (PE). Анализ изображений и распознавание оснований проводили программой HiSeq Control Software (HCS) на приборе HiSeq. Последовательности ДНК обрабатывали с помощью программы Illumina HiSeq Analysis Software v2.1 (HAS 2.1) с использованием параметров по умолчанию.

5 Для секвенирования РНК выполняли синтез и амплификацию кДНК с использованием набора SMART-Seq v4 Ultra Low Input для секвенирования (Clontech, г. Маунтин-Вью, штат Калифорния, США). Библиотеку для секвенирования получали с использованием Nextera XT (Illumina). Образцы секвенировали с использованием конфигурации 2x150 парных концов (PE). После исследования качества необработанных
10 данных усеченные чтения сопоставляли с эталонным геномом *Homo sapiens*, доступным на ENSEMBL с использованием программы STAR aligner v.2.5.2b. По результатам этой стадии создавали файлы BAM. Количество уникальных совпадений генов рассчитывали с помощью функции Counts из пакета Subread v.1.5.2. Подсчитывали только те уникальные чтения, которые попадали в области экзонов. После извлечения количества совпадений
15 генов использовали таблицу количества совпадений генов для дифференциального анализа экспрессии нижележащих элементов с использованием пакета edgeR в составе пакета SARTools (Varet et al. PLoS One. 2016;11(6):e0157022). Гены считались значимо различно экспрессированными, если р-значение было >0,05.

20 Проточная цитометрия и сортировка

In vitro

После трансдукции CAR-T-клетки размножали до 15 дней, затем сортировали по GFP⁺ с использованием сортировщика Biorad S3e (мертвые клетки исключали с использованием йодида пропидия) и смешивали 1:1 для экспериментов *in vitro* и *in vivo*.
25 Экспрессию CAR и их способность распознавать и связывать CD33 оценивали инкубированием CAR-T-клеток с биотинилированным белком CD33 человека (ACRO biosystem) в течение 20 мин при 4 °C и затем окрашивали с помощью конъюгированного с фторохромом стрептавидином.

Стволовые клетки CD34⁺ человека анализировали от 5 до 7 дней после
30 электропорации с использованием следующих антител от Biolegend: hCD34-PerCp/Cy5.5 и hCD33-FITC.

In Vivo

Приживление и восстановление популяции кроветворной системы с течением времени оценивали путем анализа периферической крови, аспирации костного мозга,
35 цельного костного мозга (от умерщвленных мышей) с использованием соответствующих

антител от Biolegend (г. Сан-Диего, штат Калифорния, США) или BD Biosciences (г. Сан-Хосе, штат Калифорния, США): Ter119-PeCy5, Ly5-BV711, H2kd-BV711, hCD45-BV510, hCD3-Pacific Blue, hCD123-BV605, hCD33-APC, hCD14-APC/Cy7, hCD10-BUV395, hCD19-BV650, CD34-BV421, CD90-PeCy7, hCD38-BUV661 и hCD45RA-BUV737. CAR-T-клетки стабильно экспрессируют флуоресцентный белок zsGreen, лейкозные клетки стабильно экспрессируют dTomato, а мертвые клетки исключались с использованием йодида пропидия. Лейкозные клетки отбирали в гейты по Ter119⁻dtomato⁺. Происходящие из введенных инъекцией клеток CD34⁺ клетки человека отбирали в гейты по Ter119⁻dtomato⁻ Ly5⁻/H2kd⁻ и CD45⁺CART⁻ человека. Все данные получали на проточном цитометрическом анализаторе BioRad ZE5 в высокопроизводительном режиме, и проводили анализ с помощью FlowJo 10.4.2. Одновременно прогрессирование лейкоза также оценивали флуоресцентной визуализацией с использованием системы оптической визуализации PerkinElmer IVIS Spectrum. Изображения получали и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа оптической визуализации Living Image 4.4.

Анализ цитотоксичности in vitro

Сортированные по эффекторам CAR-T-клетки, стабильно экспрессирующие zsGreen, смешивали в различных соотношениях со следующими клетками-мишенями HL-60, стабильно экспрессирующими dTomato, и/или клетками CD34⁺CD33^{ΔT}, окрашенными Celltrace blue, и/или CD34⁺CD33^{Δel}, окрашенными Celltrace Violet (Invitrogen). Через от 16 до 24 часов после инкубации с использованием 7AAD или Sytox Red в качестве красителя для определения жизнеспособности, получали данные с помощью анализатора для проточной цитометрии BioRad ZE5 в высокопроизводительном режиме для оценки цитотоксичности. После вычитания спонтанного лизиса в отрицательном контроле специфическая по клеткам CART33 цитотоксичность (%) рассчитывалась как клетки, положительные как по CFSE, так и по 7-AAD или Sytox Red с использованием следующей формулы: ((% положительных клеток среди CART33) – (% положительных клетки среди контрольных Т-клеток))/(100 – ((% положительных клеток среди контрольных Т-клеток)) x 100.

Эксперименты in vivo

Кондиционировали мышей NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl} Tg(CMV-IL3,CSF2,KITLG)1Eav/MloySzJ (NSG-SGM3) (The Jackson Laboratory, г. Бар Харбор, штат Мэн, США) с сублетальным облучением (1,2 Гр) всего тела (TBI). Стволовые клетки

костного мозга или пуповинной крови человека $CD34^+CD33^{Дел}$ ($5 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$) вместе с $5 \cdot 10^5$ клеток HL-60 dTomato- внутривенно вводили инъекцией мышам в течение 8-24 часов после ТБИ. Позже, через одну-две недели, мышей лечили с помощью внутривенно введенных от 2 до $3 \cdot 10^6$ антител против CD33 или контрольных CAR-T-клеток (предварительно смешанных CD4:CD8=1:1), или 6 мкг GO (гемтузумаба озагамицина) или PBS.

Приживление и восстановление популяции кроветворной системы с течением времени оценивали путем анализа периферической крови, аспирации костного мозга, цельного костного мозга (от умерщвленных мышей) с использованием соответствующих антител от Biolegend (г. Сан-Диего, штат Калифорния, США) или BD Biosciences (г. Сан-Хосе, штат Калифорния, США): Ter119-PerCy5, Ly5-BV711, H2kd-BV711, hCD45-BV510, hCD3-Pacific Blue, hCD123-BV605, hCD33-APC, hCD14-APC/Cy7, hCD10-BUV395, hCD19-BV650, CD34-BV421, CD90-PerCy7, hCD38-BUV661 и hCD45RA-BUV737. Мертвые клетки исключали с помощью йодида пропидия. Происходящие из введенных инъекцией клеток $CD34^+$ клетки человека отбирали в гейты по Ter119⁻, Ly5⁻/H2kd⁻ $CD45^+$ человека.

Все эксперименты проводились в соответствии с протоколами, одобренными Институциональным комитетом по уходу и использованию животных Колумбийского университета.

Статистические данные

Все статистические данные получали с использованием программы Graphpad Prism 7. Для непрерывных переменных проводился непарный двухсторонний t-тест. Различия между средними значения считались значимыми при р-значении $<0,05$, в противном случае — не значимыми (ns; $p>0,05$).

Результаты

CRISPR/Cas9 опосредовали генетическую абляцию антигена CD33

CD33-экспрессирующие HL-60 применяли для моделирования миелоидного лейкоза, а первичные клетки $CD34^+$, либо из пуповинной крови (СВ), либо костного мозга (ВМ) взрослого человека, использовали в виде донорских гемопоэтических стволовых клеток-предшественников (HSPC). Поверхностную экспрессию CD33 подтверждали как на клетках HL-60, так и на клетках $CD34^+$, с использованием проточной цитометрии (Фиг. 19В), как описано ранее (Taussig et al. Blood. 2005;106(13):4086-4092; Haubner et al. Leukemia. 2018;33(1):64-74; Wisniewski et al. Blood Cancer J. 2011;1(9):e36; Krupka et al.

Blood. 2014;123(3):356-365). Использовали CRISPR/Cas9, недавно разработанную универсальную технологию РНК-направленного редактирования ДНК (Haubner et al. Leukemia. 2018;33(1):64-74), для генетического редактирования геномных локусов CD33 для абляции их экспрессии. Направляющие последовательности разрабатывали для нацеливания на геномные локусы экзона 3 (Фиг. 19С, на которой показана спейсерная последовательность онРНК 811 SEQ ID NO: 58, Фиг. 25А, на которой показана спейсерная последовательность SEQ ID NO: 29, и Фиг. 25В, на которой показана спейсерная последовательность онРНК 846 SEQ ID NO: 50), поскольку экзон 3 является общим для всех транскриптов CD33 и имеет незначительное сходство или не имеет его с псевдогенами семейства Siglec, представителем которого является CD33. Тестировали системы доставки на основе плазмиды, лентивируса и рибонуклеопротеина (RNP) для проверки эффективности нескольких направляющих молекул в клеточных линиях и первичных клетках, и обнаружили, что система RNP в комбинации с химически модифицированными направляющими является наиболее эффективной в первичных клетках (Фиг. 19В и 19D). При оптимальных условиях обнаружена потеря экспрессии CD33 на более чем 80% в клетках HSPC CD34⁺, в дальнейшем называемые CD33^{Дел}, которая измерена (Фиг. 19В и 19D) на проточном цитометре с использованием клона НМ34 против CD33, который распознает эпитоп, расположенный в домене С2, обычном для всех изоформ CD33. Это снижение экспрессии CD33 сопровождалось наличием инсерций/делеций (инделов) в предполагаемом сайте разрезания Cas9 на ДНК, как измерено секвенированием ДНК по Сэнгеру (Фиг. 19Е, нижняя хроматограмма). Тестировали также две другие онРНК, нацеливающие экзон 3, и показана такая же эффективность (Фиг. 25А и 25В). Как и ожидалось, электропорация одного Cas9 в отсутствие онРНК не индуцировала никаких инделов в этом целевом сайте (Фиг. 19Е, верхняя хроматограмма). Клетки CD33^{Дел} сохраняли высокую экспрессию CD34 и CD90 (Фиг. 19D, нижнее изображение). Согласовано наблюдали высокую делеционную эффективность в нескольких независимых экспериментах (Фиг. 19F), с понижением средней экспрессии CD33 на 85% в клетках CD33^{ДТ} до менее 10% экспрессии CD33 через от 5 до 7 дней после электропорации с помощью RNP. Кроме того, В-клетки, в которых отсутствовала экспрессия CD33, использовали в качестве отрицательного контроля для подтверждения потери экспрессии после Cas9-опосредованной делеции. Оставшиеся 10% наблюдаемой экспрессии CD33, вероятно, принадлежат клеткам, которые не подвергались редактированию (дикий тип для обоих аллелей) или частично отредактированы (только один аллель с инделами).

HSPC CD34⁺ CD33^{Дел} показывают приживление и дифференцировка многих линий *in vivo*

Поскольку настоящий подход может включать трансплантацию стволовых клеток с редактированием по гену CD33 (CD33^{Дел}) в качестве платформы для CAR-T-нацеливания на антиген CD33 (CART33) и доставки ADC (GO), важно проверить способность клеток CD33^{Дел} приживляться и способствовать миелопоэзу и лимфопоэзу. Тестировали клетки CD34⁺, происходящие как из костного мозга, так и из пуповинной крови (Фиг. 20). HSPC CD33^{Дел} вводили инъекцией сублетально облученным мышам NSG-SGM3 посредством инъекции в хвостовую вену, и анализировали костный мозг и кровь (Фиг. 20А). У мышей, которым вводили инъекцией клетки, полученные из костного мозга, анализ периферической крови через 7 недель после трансплантации показал наличие человеческих клеток CD45⁺ и зрелых клеток миелоидного (клетки CD14⁺) и лимфоидного (клетки CD19⁺) происхождения (Фиг. 20В). Результаты анализа аспирата костного мозга через 15 недель (Фиг. 26А) и цельного костного мозга от умерщвленных мышей через 21 неделю (Фиг. 20С), обобщенные на Фиг. 26В, показали химеризм с устойчивым поступлением человеческих CD45⁺ клеток с течением времени. Во всех исследованных тканях наблюдалось приживление множества линий с присутствием предшественников и зрелых клеток как миелоидного (моноциты), так и лимфоидного (В-клетки) происхождения. Все клетки оставались CD33-отрицательными (Фиг. 26А и 26С). Значимых различий в приживлении множества линий клеток CD33^{Дел} по сравнению с клетками дикого типа не наблюдалось.

Параллельно аналогичную стратегию применяли с клетками CD34⁺, происходящими из пуповинной крови, и были получены аналогичные результаты. Приживление множества линий наблюдали в периферической крови через 9 недель (Фиг. 20D), в аспирате костного мозга через 16 недель (Фиг. 26С) и в цельном костном мозге через 21 неделю после трансплантации (Фиг. 20Е). Приведенные выше результаты свидетельствуют о том, что CD33 не является необходимым для приживления клеток CD34⁺ ни пуповинной крови (СВ), ни костного мозга (ВМ) или для устойчивого восстановления популяции полной гемопоэтической системы человека в животных моделях.

Клетки CD33^{Дел} компетентны для миелоидной дифференцировки и функционирования

Поскольку целью данного подхода является его перенос в клинику, оценивали функциональную способность миелоидных клеток CD33^{Дел} *in vitro* и *in vivo*. Во-первых,

разнообразие миелоидных линий анализировали на CD34+CD33^{дел} по сравнению с гуманизированными CD34+CD33ДТ мышами, и не было обнаружено заметной разницы среди миелоидных субпопуляций. Тестировали *in vitro* способность моноцит-дифференцированных CD34+CD33ДТ и CD34+CD33дел к фагоцитозу биочастиц *E coli*.

5 Значимой разницы замечено не было. Анализировали также LPS-индуцированную продукцию цитокинов моноцитами/макрофагами у мышей NSGS, которым трансплантировали клетки CD34+CD33ДТ или CD34+CD33дел, и было замечено, что уровни TNF α , IL6 и IL8 в плазме после индукции были сопоставимы. Наконец, чтобы оценить фагоцитарную функцию клеток с делецией по CD33 *in vivo*, анализировали перитонеальная полость гуманизированных мышей через два часа после в/б введения биочастиц *E coli*. Анализ проточной цитометрии показал подобное фагоцитарное поглощение субпопуляцией hCD45+hCD11b+hCD14-hCD16-, как у CD34+CD33ДТ, так и CD34+CD33дел гуманизированных мышей. Эти данные показывают интактное функционирование CD33дел-миелоидных клеток.

15

В клетках с редактированием генов не наблюдали выявляемого нецелевого мутагенеза или потери функциональных путей p53

Чтобы оценить, вносят ли две направляющие молекулы, использованные в данном исследовании, инделы в нецелевые сайты в клетках HSP, оценивали инделы по данным полногеномного секвенирования клеток HSP CD34⁺ пуповинной крови человека, которым вводили электропорацией RNP-комплекс Cas9/онПНК (CD33^{дел}) по сравнению с клетками, которым вводили электропорацией только белок Cas9 (CD33^{ДТ}). Получено более 629 миллионов чтений, прошедших фильтр, с качеством оснований более Q30 у более 93% чтений (Фиг. 28). Средняя глубина покрытия составляла более 26X. Для выявления 25 одонуклеотидных вариантов (SNV) и небольших инделов, чтения были выравнивали по эталонному геному человека hg38.

Обобщенные данные по вариантам, обнаруженным в обоих образцах, представлены на Фиг. 28. Наблюдали устойчивую целевую активность, при этом инделы в >90% чтений выравнивались с ожидаемыми сайтами разрезания chr19:51225811 и 30 chr19:51225846 (Фиг. 21A). Важно отметить, что все инделы были расположены в пределах ожидаемых сайтов разрезания двух использованных онПНК. Несколько небольших инделов, которые наблюдали за пределами целевой области во всем локусе CD33, не были уникальными для клеток, подвергнутых электропорации CD33^{дел}, а также присутствовали в клетках, которым вводили электропорацией только Cas9. Далее данные 35 были проверяли на наличие инделов в предсказанных нецелевых сайтах, которые

показали высокую степень сходства, имея до 4 несовпадений с использованными онРНК (Фиг. 21В, 29 и 30). Снова ни в одном из исследованных нецелевых локусов не было обнаружено инделов (Фиг. 29 и 30). Инделы также исследовали в локусах *TP53* и ни один не был уникальным для клеток CD33^{Дел}.

5 Чтобы оценить, вызывает ли потеря экспрессии CD33 изменения в экспрессии других генов, сравнивали профили экспрессии генов в клетках с удаленным CD33 (n=5) и контрольных (n=5) клетках CD34⁺, полученных от четырех разных доноров. Профиль экспрессии генов для каждого образца получали с помощью секвенирования РНК, и проводили сравнение между группами с помощью программы edgeR. Между двумя
10 группами наблюдали сопоставимые профили экспрессии генов с коэффициентом корреляции Пирсона 0,9948 (Фиг. 21С), и не наблюдали значимых различий на основе р-скорректированного значения (Фиг. 31). Четырнадцать генов обнаружены значительно различающимися на основе р-значения, и наиболее значимым отличием было снижение регуляции CD33 в образцах CD33^{Дел} по сравнению с контролем (Фиг. 21D и 31). Эти
15 результаты подтверждают, что отсутствие CD33 в клетках CD34⁺ *in vitro* не значительно влияет на экспрессию нижележащих генов. Среди 13 генов, которые показали изменение экспрессии на основе р-значения, не было выявлено усиления для какого-либо одного пути или клеточного процесса. Следует отметить, что сигнатуры экспрессии генов не свидетельствовали об активации пути TP53 или других путей повреждения ДНК, которые
20 могли бы нарушить функционирование HSC или снизить их долгосрочный потенциал. Поэтому можно сделать вывод, что абляция CD33 в клетках пуповинной крови и HSC взрослого человека с использованием описанных в данном документе технологий редактирования генов, как оказывается, не нарушает их будущее функционирование.

Эти данные также были проверены вручную на наличие инделов в чтениях,
25 сопоставленных с экзоном 3 CD33 и всеми кодирующими экзонами транскрипта *TP53* по данным секвенирования РНК с использованием программы integrated genomic viewer (IGV). Как ожидалось, были инделы в >95% чтениях в CD33-экзоне 3 (Фиг. 27). В *TP53* было обнаружено несколько чтений с инделами, но они находились в пределах повторяющихся последовательностей и присутствовали также в контрольных образцах,
30 что свидетельствует об артефактах секвенирования. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что опосредованное CRISPR/Cas9 геномное редактирование в локусе CD33 с использованием направляющих молекул, примененных в данном исследовании, не приводит к обнаружению выявляемых нецелевых инделов в системе стволовых клеток.

Экспрессия CD33-специфических CAR в Т-клетках

CAR классифицируются на различные поколения в зависимости от количества костимулирующих доменов. Разработали CAR второго поколения (Фиг. 22А), включающего одноцепочечную вариабельную область против CD33 (клон Му96) в паре с трансмембранным доменом CD28, костимулирующим доменом 4-1BB (CD137) и дзета-цепью CD3 из TCR CD3 в качестве внутриклеточного домена. кДНК CAR клонировали в лентивирусный вектор pHIV-zsGreen под контролем промотора EF1- α , обеспечивающего бицистронную экспрессию с ZS-green. Периферическую кровь, полученную от нормальных доноров, фракционировали для получения МНПК и трансдуцировали лентивирусными частицами, несущими либо только вектор, либо конструкцию CAR (Фиг. 22В). Эффективность трансдукции клеток CD4 и CD8 среди МНПК не была одинаковой, так как наблюдалась более высокая трансдукция клеток CD4 по сравнению с CD8, и подобные наблюдения также отмечены в других исследованиях (Blaeschke et al. Cancer Immunol Immunother. 2018;67(7):1053-1066). Учитывая неравную трансдукцию клеток CD4 и CD8 в МНПК, и для получения более определенного состава клеток CD4 и CD8, очищенные клетки CD4 и CD8 отдельно трансдуцировали, сортировали на основе экспрессии GFP от нижележащего элемента IRES, и смешивали в эквимолярном соотношении. Экспрессию CAR подтверждали путем измерения поверхностной экспрессии и связывания CAR с очищенным биотинилированным белком CD33, конъюгированным со стрептавидин-флуорохромом. Наблюдали устойчивую экспрессию CAR и его связывание с молекулой CD33 (Фиг. 22В).

CAR-экспрессирующие Т-клетки показывают CD33-зависимую цитотоксичность *in vitro*

Цитотоксичность клеток CART33 сначала оценивали на мишенях с переменной экспрессией CD33. Подтверждено интенсивное уничтожение CD33-миелоидных лейкозных клеток HL-60, и наблюдали более слабое уничтожение стволовых клеток CD33^{ДТ}, которые экспрессируют CD33 на пониженном уровне. Примечательно, что отсутствие экспрессии CD33 (из-за опосредованной Cas9/онРНК делеции) защищало клетки CD34⁺ от уничтожения, поскольку не наблюдали цитотоксичности CART33 при инкубации с клетками CD33^{Дел} CD34⁺. Этот первый эксперимент (Фиг. 22С) также подтвердил корреляцию между уровнем цитотоксичности CART33 и уровнем экспрессии CD33 на клетках-мишенях, т. е. цитотоксичность CART33 пропорциональна уровню экспрессии CD33 на клетках-мишенях.

Затем был разработан анализ тройной культуры для оценки уничтожения клеток CART33 при совместном инкубировании с мишенями с переменной экспрессией CD33. Когда клетки HL-60 CD33^{ДТ} и клетки CD34⁺CD33^{ДТ} совместно инкубировали с CART33, наблюдали корреляционный уровень цитотоксичности клеток CART33 для обоих типов 5 клеток (Фиг. 22D), но когда клетки HL-60 CD33^{ДТ} и клетки CD34⁺CD33^{Дел} совместно инкубировали с клетками CART33, уничтожались только клетки HL-60 (Фиг. 22E). Сходным образом, совместная инкубация этих трех типов клеток CD34⁺CD33^{ДТ}, CD34⁺CD33^{Дел} и клеток CART33 (Фиг. 22F) демонстрировали только уничтожение CD33^{ДТ} CD34⁺ на уровне, пропорциональном их экспрессии CD33. Кроме того, 10 цитотоксичность CART33 проверяли на другой остромиелоидной клеточной линии, KG1, и обнаружили аналогичную CD33-зависимую цитотоксичность CART33 *in vitro*.

Иммунотерапия с антителами против CD33 демонстрирует CD33-зависимое 15 устранение лейкоза в мышинной модели ксенотрансплантата, полученного из клеточной линии (CDX)

Для экспериментов *in vivo* разработана стратегия, представляющая терапевтическую ситуацию у человека в контексте минимальной остаточной болезни (Фиг. 23A). В этой модели лейкоз сначала инициировали путем введения 500 000 клеток HL-60 сублетально облученным мышам. Мышам одновременно инъецировали 500 000 20 клеток CD33^{Дел} CD34⁺ для имитации модели рецидивирующего AML. Предварительные эксперименты свидетельствуют, что недельного периода было достаточно для хоминга и приживания клеток AML, так как 100% мышей стали лейкозными еще через 2 недели. Эти данные повторяются для костного мозга после ремиссии, в котором клетки AML могут все еще оставаться, хотя клинически не обнаруживаются. Через неделю после 25 совместной инъекции лейкозных клеток и стволовых клеток CD34⁺ мышей разделяли на различные группы и лечили агентами, как описано (Фиг. 23A). Лейкозную нагрузку и приживание клеток CD34⁺ отслеживали на протяжении времени с использованием визуализация и проточной цитометрии (Фиг. 23B–23F). К неделе 3 в аспирате костного мозга мышей, которые получали PBS и контрольные CAR-T-клетки (т. е. T-клетки, 30 трансдуцированными только вектором, без CAR-T-конструкций), наблюдали большую опухолевую нагрузку, а к неделям 3 и 4 все мыши в этих двух группах погибли от заболевания (Фиг. 23A). У двух мышей, получавших контрольные T-клетки, отметили относительно низкую лейкозную нагрузку через 3 недели, но она прогрессировало до очень высокой лейкозной нагрузки в ВМ в момент смертельного исхода. Напротив, в 35 течение срока 12 недель лейкозные клетки CD33^{ДТ} не были обнаружены в аспирате

костного мозга (Фиг. 23В) или при визуализации через 3,5 недели или 8 недель (см. Фиг. 23С-23Е) у мышей, получавших лечение клетками CART33, анти-CD33 ADC GO или комбинацию GO и CART33. Эти результаты показывают, что и CART33, и GO являются активными агентами против CD33-экспрессирующего лейкоза в данной модели.

5 **HSPC CD34⁺CD33^{Дел} демонстрируют приживание и дифференцировку по множеству линий в данной модели терапии**

Одновременно проводили мониторинг мышей на приживание множества линий клеток CD34⁺CD33^{Дел} в описанной выше модели терапии. Наблюдали приживание, что 10 продемонстрировано наличием клеток CD45⁺ человека, которые являются CAR-T- и CD33-отрицательными в аспирате костного мозга всех групп (Фиг. 23F), что позволяет предположить, что клетки CD34⁺CD33^{Дел} также могут приживляться в данной модели терапии. Интересно отметить, что на неделе 6 наблюдали спад процентного содержания CD33^{Дел}-клеток CD45⁺ человека по сравнению с исходным уровнем на неделе 3 в группах, 15 получавших CART33 (CART33+PBS и CART33+GO), но эти уровни восстановились до исходных уровней к неделе 9 и сохранялись до последней точки исследования на неделе 12. Относительно низкая приживаемость и последующий спад в двух группах мышей могут отражать связанный с лечением стресс (включая антилейкозный ответ CAR-T-клеток в костном мозге), который был более выражен в группе CAR-T и сохранялся 20 дольше, чем в группе GO. Альтернативно, использование различных доноров клеток CD34⁺ и Т-клеток могло вызывать аллогенный ответ, который мог бы объяснить задержку восстановления популяции, наблюдаемую у мышей, которым инъецировали клетки CART33. Примечательно, что это явление было обратимым, поскольку уровни приживания восстанавливались в течение 8 недель.

25 Мультипотенциальная природа приживленных клеток была далее исследована путем анализа миелопоэза и лимфопоэза (Фиг. 24А). Обнаружены CD33-отрицательные миелоидные и лимфоидные предшественники, а также зрелые миелоидные и лимфоидные клетки во все проанализированные моменты времени (Фиг. 24А). В то время как с течением времени наблюдали полное восстановление популяции кроветворной системы у 30 всех получавших лечение мышей, у мышей, которым вводили инъекцией CAR-T-клетки, наблюдали задержку восстановления популяции лимфоидных клеток. Это может быть результатом аллогенной реакции, так как известно, что лимфоидные клетки-предшественники более чувствительны к аллогенно-специфическому воздействию.

Одновременно, чтобы продемонстрировать специфичность CART33 и GO в 35 отношении CD34⁺CD33^{ДТ}-первичных HSPC, сублетально облученным мышам NSG-SGM3

совместно вводили 500 000 клеток HL-60 и 500 000 клеток CD34⁺CD33^{DT} (Фиг. 24B).

Через неделю после этого группу мышей лечили клетками CART33 и отбирали аспирацией ВМ на неделе 3, в тот же день другой группе инъекцировали GO и анализировали аспират их ВМ через 4 дня. Как и в терапевтической модели, после 5 лечения подтверждено полное устранение лейкоза (Фиг. 24C). Кроме того, наблюдали полную абляцию клеток CD33^{DT} (Фиг. 24D). Поэтому клетки CD33^{DT} остаются чувствительными к терапиям GO и CART33, в то время как CD33 аблированные клетки нечувствительны.

10 Обсуждение

Успех любой антигензависимой иммунной терапии с использованием таких агентов, как CAR-T или mAB, зависит от наличия уникального антигена на поверхности раковой клетки, а не на нормальных клетках или других клетках организма. К сожалению, при раковых заболеваниях такие антигены встречаются редко. Один возможный выход 15 заключается в том, что путем абляции LSA с использованием методов геномной инженерии в стволовых клетках, можно создавать стволовые клетки / клетки-предшественники, устойчивые к антигензависимой иммунной терапии, тем самым позволяя проводить максимальную иммунотерапию. После демонстрации того, что такие антиген-истощенные клетки функционально подобны клеткам дикого типа, они могут 20 использоваться для замещения больных клеток. При таком подходе важен тщательный выбор линиеспецифического антигена, который не является необходимым для нормального функционирования этой линии. В альтернативном подходе, если линиеспецифического антигена (LSA) является незаменимым, вместо полной абляции экспрессии LSA можно использовать технологию генного редактирования для изменения 25 эпитопа, распознаваемого антигензависимым агентом иммунной терапии для LSA, при сохранении функции LSA (так называемое «функционально избыточное переключение эпитопа» или FRES).

В настоящем исследовании было показано, что сочетание стволовых клеток, лишенных линиеспецифического антигена CD33, с аллогенными сконструированными Т- 30 клетками или ADC, позволяет добиться абляции лейкоза и полного восстановления гемопоэтической популяции. Использовали острый миелоидный лейкоз, заболевание с неудовлетворенными потребностями в сфере его терапии, и было продемонстрировано, что такой подход осуществим. Поскольку CD33 является LSA, и нацеливание CD33 при AML с использованием либо CAR-T, либо CD33 mAB, приводит к тяжелой 35 миелосупрессии и лимфоистощению из-за удаления стволовых клеток / клеток-

предшественников, а также клеток миелоидной линии, предлагаемый подход к лечению AML заключается в перестройке гемопоэтической системы клетками, лишенными CD33. Подход на основе CRISPR использовали для нарушения экспрессии CD33 в стволовых клетках донора, клетках CD34⁺ либо пуповинной крови, либо костного мозга, чтобы придать им «резистентность» к атаке CAR-T-клеток.

Недавно две группы провели аналогичные наблюдения и независимо сообщили о подходе, описанном в данном исследовании (Kim et al. Cell. 2018;173(6):1439-1453 e1419; Humbert et al. Leukemia. 2019;33(3):762-808). Настоящие данные усиливают наблюдения, сделанные в этих исследованиях, а также добавляют новые знания, используя дополнительные подходы. В отличие от исследования Kim et al., в котором мышам сначала инъецировали клетки CD34⁺ с отредактированным геном CD33, чтобы обеспечить полное приживание до введения лейкозных клеток и лечения, настоящий подход более точно имитирует ситуацию рецидива AML с минимальной остаточной болезнью, поскольку лейкозные клетки и стволовые клетки с отредактированным геном инъецируют совместно, с последующей терапией CAR-T-клетками или ADC. Более того, благодаря строгому отбору CD33-направляющих РНК с высокой целевой и низкой нецелевой активностью, в HSC наблюдалась чрезвычайно эффективная абляция экспрессии CD33 без каких-либо нецелевых инделов в других генах, таким образом позволяя быть уверенным в безопасности этого подхода в исследованиях на людях (Kim et al. Cell. 2018;173(6):1439-1453 e1419). Действительно, ни в одном из исследованных генов и псевдогенов семейства Siglec не было обнаружено инделов. Kim et al. наблюдали нецелевую активность в *SIGLEC22P*, включая делецию фрагмента размером 14 кб, наиболее вероятно из-за 100% гомологии с *SIGLEC22P* онРНК, разработанной для CD33 (Kim et al. Cell. 2018;173(6):1439-1453 e1419). Выбор расположения в экзоне 3 и подтверждение отсутствия гомологии выбранной онРНК с другими генами, возможно, позволили добиться специфичности абляции только CD33. Отсутствие инделов или других геномных перестроек в гене *TP53* (как проанализировано с использованием полногеномного секвенирования), а также отсутствие каких-либо deregulированных генов, связанных с путем p53 или самим p53, позволяет предположить, что разработанный в данном документе подход может обеспечивать эффективное редактирование генома с высокой специфичностью без ущерба для функционирования HSC. Наконец, использование RNP Cas9 (который только временно присутствует в HSC во время манипуляций с ними *ex vivo*), в отличие от опосредованной вирусами экспрессии Cas9, которая является конститутивной и продолжается в HSC *in vivo*, позволяет избежать будущих проблем с имеющимся иммунитетом против Cas9, который, как было установлено, присутствует у

>50% населения (Charlesworth et al. Nat Med. 2019;25(2):249-254; Crudele et al. Nat Commun 2018;9(1):3497).

Кроме того, в отличие от Kim et al., настоящий подход включает аллогенную ВМТ с CD33-редактированными HSC (из пуповинной крови или костного мозга взрослого человека) с последующим лечением ADC или CAR-T-лечением Т-клетками, полученными от аллогенного донора. Этот подход более практичен в клинических условиях. Пациенты с гематологическими злокачественными опухолями, прошедшие интенсивное предварительное лечение цитотоксической химиотерапией, часто дают низкие выходы аутологичных Т-клеток, что ограничивает эффективность и результативность лечения аутологичными CAR-T. Эта проблема обходится путем использования аллогенной ВМТ и аллогенных Т-клеток, для которых выход и качество не являются проблемой. Более важно, что при использовании ADC (но не CAR-T) для воздействия на болезнь, показано, что гуморальная терапия может действовать совместно с CAR-T-клетками или в качестве альтернативы им, что еще больше расширяет данный подход к противолейкозной терапии с использованием гуморальных подходов.

Отмечается также, что лекарственное средство GO (состоящее из клона Р67.6 антитела против CD33) распознает эпитоп, расположенный в экзоне 2. У людей обнаружены две изоформы CD33. Более распространенной изоформой является полноразмерный белок, *включающий* экзон 2, чувствительный к GO; менее распространенной является изоформа, в которой отсутствует экзон 2. Около 30% населения несет гомозиготный однонуклеотидный полиморфизм (SNP, T/T), приводящий к исключительной экспрессии менее распространенного варианта CD33, в котором отсутствует экзон 2. Эта популяция также может рассматриваться в качестве потенциального пула доноров HSCT в комбинации с CD33-нацеленной иммунотерапией, описанной в данной работе, тем самым устраняя необходимость в Cas-9 направленной абляции. Однако это может резко ограничивать пул доноров, что делает данный подход практически неосуществимым в исследованиях на людях. В связи с этим Humbert et al. (Humbert et al. Leukemia. 2019;33(3):762-808), использовали подход CRISPR/Cas9 для нацеливания на фланкирующие интроны с помощью двух различных онРНК для удаления экзона 2. Неясно, имеет ли избирательное удаление V-домена какое-либо преимущество перед разрушением CD33, поскольку приживление или функциональные дефекты не наблюдались ни у мышей, ни у обезьян (*Rhesus macaques*) после удаления всего CD33 (Kim et al. Cell. 2018;173(6):1439-1453 e1419). Кроме того, использование нескольких направляющих молекул увеличивает количество потенциальных нецелевых элементов, а

эффективность направляющих молекул будет ограничена наименее эффективной направляющей в данном пуле.

В настоящем исследовании делеция CD33 в человеческих CD34⁺ BM и CB не привела к каким-либо заметным побочным эффектам. Более чем через 21 неделю после трансплантации у мышей NSG-SGM3 не наблюдали никаких аномальных фенотипов. Отсутствие наблюдаемого фенотипа, связанного с делецией CD33, может быть объяснено функциональной избыточностью или компенсацией среди представителей Siglecs.

Несмотря на увеличивающееся количество клинических испытаний с участием модифицированных иммунных клеток, лишь немногие из них привели к улучшению исходов для пациентов, в основном из-за целевой/нецелевой тканевой токсичности для нормальных тканей. В то время как CAR-T представляет собой современный подход, долгосрочные последствия которого не так хорошо изучены, использование mAB и ADC является рутинным в лечении рака и, в целом, безопасным. Показано, что комбинирование клеток CART и/или ADC, такими как GO, со сконструированными стволовыми клетками защищает нормальные ткани от целевой/нецелевой тканевой токсичности и может приводить к полной ремиссии и полному гемопоэтическому восстановлению в животной модели. Несмотря на доказанные преимущества, практически у всех пациентов, получавших лечение GO, происходит значительное истощение нормальных клеток миелоидной линии, что может приводить к потенциально летальной фебрильной нейтропении и аномальным кровотечениям из-за GO-индуцированной миелосупрессии (Amadori et al. J Clin Oncol. 2016;34(9):972-979). Эти серьезные нежелательные явления ограничивают применение GO кратковременными воздействиями во время индукционной химиотерапии и, по существу, запрещают его длительное применение. Данное исследование также предполагает, что комбинация более низких доз GO с инфузией CART33 или без нее может стать принципиально новым подходом к лечению пациентов с AML. Наконец, недавнее повторное одобрение GO и возобновление текущих клинических испытаний новых реагентов, направленных на CD33 (включая новые анти-CD33 CAR-T, анти-CD33 ADC и CD33-биспецифические активаторы Т-клеток или BiTE), делают этот подход переносимым в клинические условия в ближайшем будущем.

Разработали также легко применяемую линейную схему для тестирования новых потенциальных мишеней, обладающих свойствами, которые делают CD33 привлекательной мишенью, т. е. функционально избыточным линиеспецифическим маркером, который строго экспрессируется гемопоэтическими клетками, а также экспрессируется раковыми клетками (например, CD123, CLL-1 или CD244). Этот антиген становится «раково-специфическим» путем CRISPR-опосредованной абляции антигена из

HSC (Haubner et al. *Leukemia*. 2018;33(1):64-74). Эта стратегия также могут воспроизводить в солидных опухолях, в которых функциональный органоид может создаваться из эмбриональных или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, которые редактируются для абляции экспрессии, или когда первичный орган уже удален (например, чтобы нацелить антиген нормальной линии предстательной железы у пациента после радикальной простатэктомии). Наконец, предлагается возможность «модификации эпитопа» тканеспецифического антигена с помощью способов редактирования оснований ДНК. «Модификация эпитопа» может давать возможность белку сохранять свою функцию, но переключать небольшую антигенную детерминанту. В этой стратегии стволовые клетки сохраняют функциональный белок, но больше не обладают сайтом связывания для иммунной терапии, тогда как раковые клетки, несущие немодифицированный белок, остаются уникально чувствительными к иммунной терапии.

Пример 6. Гентузумаб озогамицин (GO)-нацеленная иммунотерапия, удаляющая первичные клетки острого миелоидного лейкоза (AML) и сохраняющие клетки CD33^{Дел}

Клетки CD34⁺CD33^{Дел} создавали путем приведения в контакт популяции клеток CD34⁺ с онРНК 811 из нРНК (имеющую направляющую область 5' CCUCACUAGACUUGACCCAC 3'; SEQ ID NO: 70) и онРНК 846 (имеющую направляющую область 5' AUCCUGGCACUCUAGAACC 3'; SEQ ID NO: 67). Для оценки приживления клеток CD34⁺CD33^{Дел} и восстановления популяции гемопоэтических клеток при лечении GO, вводили инъекции 0,5 x 10⁶ первичных человеческих клеток AML мышам NSG-SGM3 (NSGS) внутривенно через хвостовую вену в первый день. Через два месяца после инъекции клеток AML оценивали нагрузку AML (минимальная остаточная болезнь) методом проточной цитометрии аспирата костного мозга (BM). Затем когорту разделяли на две сравнимые группы (**Фиг. 32А**, график: до лечения): контрольная группа (круги), в которой мыши не будут получать лечение, и получающая лечение группа (треугольники), в которой мыши будут получать хроническую дозу GO. Лейкозные клетки отбирали в гейты по Ter119⁻H2kd/Ly5⁻hCD45⁺hCD33⁺cKit с использованием следующих антител: Ter119 Ресу5, Ly5/H2kd BV711, hCD45 BV510, hCD33 APC, cKit BV650. После оценки минимальной остаточной болезни мышам из получавшей лечение группы делали первую инъекцию 1 мкг GO. Через десять дней после первой инъекции GO обеим группам мышей (без лечения и с лечением) пересаживали 0,5 x 10⁶ клеток CD34⁺CD33^{Дел}. Через десять дней после трансплантации клеток CD34⁺CD33^{Дел}, получавшая лечение группа начала получать хроническую дозу GO (1 мкг GO вводили

инъекцией каждые 10 дней). Через три недели после трансплантации $CD34^+CD33^{Дел}$ аспираты ВМ обеих групп мышей анализировали методом проточной цитометрии для определения нагрузки AML и оценки приживления клеток $CD34^+CD33^{Дел}$. У контрольных мышей уровни AML превышали 70%, а у получавших лечение мышей уровень AML был ниже 5%. У контрольных мышей процентное содержание клеток $hCD33^{Дел}$ было ниже 20%, тогда как у получивших лечение мышей процент клеток $hCD33^{Дел}$ был выше 70%, что свидетельствует об успешном приживлении. (**Фиг. 32В, верхний график**). Далее способность к восстановлению гемопоэтической популяции инъецированных клеток $CD34^+CD33^{Дел}$ оценивали путем анализа миелоидных/лимфоидных клеток предшественников и зрелых клеток методом проточной цитометрии, как показано на **Фиг. 32В, продолжение**). Уровни клеток $CD123^+$, клеток $CD14^+$, клеток $CD10^+$ и клеток $CD19^+$ в пределах популяции $hCD45^+CD33^{Дел}$ (клетки отбирали в гейты по $Ter119^+$, $Ly5^+H2kd^+$, $hCD45^+$, $hCD33^-$) не различались значимо контрольной и получавшей лечение когортами. Как показано на **Фиг. 32С**, верхнее левое изображение, ни одна контрольная мышь не пережила 150 дней, тогда как все получавшие лечение мыши пережили по меньшей мере 150 дней. Нагрузка AML была сопоставима в ВМ, селезенке и периферической крови контрольных мышей на момент смерти (нижнее левое изображение). Более того, экспрессия CD33 была наиболее заметна в ВМ и селезенке, как показано по отобранным в гейт клеткам $CD33^+$ из каждого соответствующего органа или ткани (правое изображение).

Пример 7. Создание клеток $CD34^+CD33^{Дел}CLL1^{Дел}$

Клетки с двойной делецией $CD34^+CD33^{Дел}CLL1^{Дел}$ создавали трансфекцией клеток $CD34^+$ с различными комбинациями нРНК, включая: онРНК 811 (имеющую спейсерную последовательность 5' CCUCACUAGACUUGACCCAC 3' против CD33; SEQ ID NO: 70), онРНК 846 (имеющую спейсерную последовательность 5' AUCCCUGGCACUCUAGAACC 3' против CD33; SEQ ID NO: 67), нРНК CLL-1, имеющую спейсерную последовательность 5' GUUGUAGAGAAUAUUUCUC 3' (SEQ ID NO: 115) и вторую нРНК CLL-1, имеющую направляющую область 5' GGAGAGGUUCCUGAUCUUGU 3' (SEQ ID NO: 116). В день 1 клетки трансфицировали онРНК с использованием нуклеофекции, чтобы получить после этого CRISPR/Cas9-опосредованную абляцию целевых генов. Через четыре дня методом проточной цитометрии оценивали экспрессию CD33 и CLL1. На день 5 $CD34^{+DT}$, $CD34^+CD33^{Дел}$, $CD34^+CLL1^{Дел}$ или $CD34^+CD33^{Дел}CLL1^{Дел}$ клетки внутривенно инъецировали мышам

NSGS. Как показано на Фиг. 33А, уровни CD33 и/или CLL1 успешно истощались по отдельности и в комбинации с использованием этих нРНК. Мутации в нужных локусах подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру (данные не показаны).

Через четыре недели после инъекции аспираты костного мозга (BM)

5 инъекцированных мышей анализировали методом проточной цитометрии для определения присутствия CD33 и/или CLL1 в клетках CD34⁺ отобранных в гейты по Ter119⁻, Ly5⁻/H2kd⁻, hCD45⁺ (Фиг. 33В). Клетки с одиночной и двойной делецией успешно обнаружены в образцах костного мозга. Кроме того, клетки CD123⁺, CD14⁺, CD10⁺ и CD19⁺ были обнаружены в популяции hCD45⁺ как в образцах цельного костного мозга
10 (Фиг. 33С), так и в образцах селезенки (Фиг. 33D). Этот анализ показывает, что истощение CD33 и/или CLL1 не нарушало приживание гемопоэтических клеток множества линий.

Мишень	Направляющая последовательность	Сайт разрезания	Экзон	SEQ ID NO:
CD33	CCUCACUAGACUUGACCCAC	51 225 811	3	70
CD33	AUCCCUUGGCACUCUAGAACC	51 225 846	3	67
CLL1	GUUGUAGAGAAAUAUUUCUC	9 979 406	3	115
CLL1	GGAGAGGUUCCUGAUCUUGU	9 979 450	3	116

15 ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Все признаки, раскрытые в данном описании, могут быть объединены в любой комбинации. Каждый признак, раскрытый в данном описании, может быть заменен альтернативным признаком, служащим той же, эквивалентной или аналогичной цели. Таким образом, если четко не указано иное, каждый раскрытый признак является
20 только примером общей серии эквивалентных или аналогичных признаков.

Из приведенного выше описания специалист в данной области техники может легко установить существенные характеристики настоящего изобретения, не отступая от его сущности и объема, может внести различные изменения и модификации изобретения, чтобы адаптировать его к различным применениям и условиям. Таким
25 образом, другие варианты осуществления также находятся в пределах формулы изобретения.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Несмотря на то, что несколько патентоспособных вариантов осуществления были описаны и проиллюстрированы в данном документе, специалисты средней квалификации в данной области техники легко определяют множество других способов и/или структур для обеспечения функции и/или получения результатов, и/или одного или более преимуществ, описанных в настоящем документе, и каждый из таких вариантов и/или модификаций считается находящимся в пределах объема патентоспособных вариантов осуществления, описанных в настоящем документе. В более общем смысле специалистам в данной области техники будет понятно, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в данном документе, предназначены для иллюстрации и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, для которых используются идеи изобретения. Специалисты в данной области техники узнают или смогут установить, используя всего лишь обычные эксперименты, многие эквиваленты конкретных патентоспособных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Следовательно, следует понимать, что вышеупомянутые варианты осуществления представлены только в качестве примера и что в рамках прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов патентоспособные варианты осуществления изобретения могут быть реализованы иначе, чем конкретно описано и заявлено. Патентоспособные варианты осуществления настоящего изобретения направлены на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанный в данном документе. Кроме того, любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы взаимно не противоречат друг другу, включается в объем настоящего изобретения.

Все определения, как они определены и используются в данном документе, следует понимать как контролирующие определения словаря, определения в документах, включенных посредством ссылки, и/или общепринятые значения определенных терминов.

Все ссылки, патенты и патентные заявки, раскрытые в данном документе, включены посредством ссылки в отношении объекта изобретения, для которого каждый из них цитируется, что в некоторых случаях может охватывать весь документ.

Упоминания единственного числа, применяемые в данном документе, в описании и формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как означающие «по меньшей мере один».

Фразу «и/или», употребляемую в данном документе в описании и в формуле изобретения, следует понимать как означающую «любой из или оба вместе» для элементов, соединенных таким образом, т. е. элементов, которые в одних случаях

присутствуют вместе, а в других — отдельно. Множественные элементы, перечисленные с помощью «и/или», должны толковаться одинаково, т. е. «один или более» из элементов, соединенных таким образом. Необязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных фразой «и/или», независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на «А и/или В» при использовании в сочетании с неограничивающей формулировкой, такой как «содержащий», может относиться в одном варианте осуществления только к А (необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления только к В (необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления как к А, так и к В (необязательно включая другие элементы); и т. п.

Используемый в данном документе в описании и в формуле изобретения термин «или» следует понимать как имеющий то же значение, что и «и/или», как определено выше. Например, при разделении элементов в списке «или» или «и/или» следует интерпретировать как включающее, т. е. включение по меньшей мере одного, но также и более одного, из количества или списка элементов, и, необязательно, дополнительных элементов, не внесенных в список. Только термины, явно указывающие на обратное, такие как «только один из» или «ровно один из» или, при использовании в формуле изобретения, «состоящий из» будут относиться к включению ровно одного элемента из количества или списка элементов. Как правило, термин «или», используемый в данном документе, должен интерпретироваться только как указывающий на исключительные альтернативы (т. е. «один или другой, но не оба»), когда ему предшествуют условия исключительности, такие как «либо», «один из», «только один из» или «ровно один из». «Состоящий по существу из», при использовании в формуле изобретения, имеет свое обычное значение, используемое в области патентного права.

Используемая в данном документе в описании и формуле изобретения фраза «по меньшей мере один» в отношении списка из одного или более элементов должна пониматься как означающая по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или более элементов в списке элементов, но не обязательно включая по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно перечисленного в списке элементов, и не исключая любые комбинации элементов в списке элементов. Это определение также допускает, что могут необязательно присутствовать другие элементы помимо элементов, специально указанных в списке элементов, к которым относится фраза «по меньшей мере один», независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера «по меньшей мере

один из А и В» (или эквивалентно «по меньшей мере один из А или В», или эквивалентно «по меньшей мере один из А и/или В») может относиться в одном варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, А, при отсутствии В (и необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, В, при отсутствии А (и необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, А, и по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, В (и необязательно включающему другие элементы); и т. п.

10 Также следует понимать, что, если явно не указано иное, в любых заявленных в данном документе способах, которые включают более одной стадии или действия, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничивается порядком, в котором стадии или действия способа указаны.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация представляет собой сайт, на который нацелена нРНК, которая содержит нуклеотидную последовательность CCUCACUAGACUUGACCCAC (SEQ ID NO: 70), и при этом генетическая мутация приводит к пониженному уровню экспрессии CD33 по сравнению с аналогичной клеткой дикого типа.
2. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по п. 1, которая экспрессирует менее 20% CD33, экспрессируемого аналогом дикого типа.
3. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по п. 2, которая не экспрессирует CD33.
4. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 1-3, которая является CD34+.
5. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из пп. 1-4, которая получена из клеток костного мозга или мононуклеаров периферической крови субъекта.
6. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по п. 5, причем субъект представляет собой пациента-человека с гемопоэтическим злокачественным новообразованием.
7. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по п. 5, причем субъект представляет собой здорового донора-человека.
8. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник по любому из пп. 1-7, которая не содержит мутацию в любом предполагаемом нецелевом сайте, например в любом сайте, из перечисленных на Фиг. 30.

9. Клеточная популяция, содержащая множество генетически сконструированных гемопоэтических клеток или клеток-предшественников по любому из пп. 1-8.
10. Способ получения генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, включающий:
 - (i) предоставление гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника, и
 - (ii) внедрение в клетку (а) направляющей РНК (нРНК), которая содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 70; и (б) эндонуклеазы Cas9, тем самым получая генетически сконструированную гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественника.
11. Способ по п. 10, в котором генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник экспрессирует менее 20% CD33, экспрессируемого аналогом дикого типа.
12. Способ по п. 11, в котором генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник не экспрессирует CD33.
13. Способ по любому из пп. 10-12, в котором (а) и (б) кодируются на одном векторе, который внедряют в клетку.
14. Способ по п. 13, в котором вектор представляет собой вирусный вектор.
15. Способ по любому из пп. 10-12, в котором (а) и (б) внедряют в клетку в виде предварительно созданного рибонуклеопротеинового комплекса.
16. Способ по п. 15, в котором рибонуклеопротеиновый комплекс внедряют в клетку посредством электропорации.
17. Способ по любому из пп. 10-12, в котором эндонуклеазу Cas9 внедряют в клетку путем доставки в клетку молекулы мРНК, кодирующей эндонуклеазу Cas9.
18. Способ по любому из пп. 10-17, в котором нРНК представляет собой одномолекулярную направляющую РНК (онРНК).

19. Способ по п. 18, в котором нРНК представляет собой химически модифицированную онРНК.
20. Способ по любому из пп. 10-19, в котором гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник представляет собой CD34+.
21. Способ по любому из пп. 10-20, в котором гемопоэтическая стволовая клетка и/или клетка-предшественник походит из клеток костного мозга или мононуклеаров периферической крови (МНПК) субъекта.
22. Способ по п. 21, в котором субъект имеет гемопоэтическое нарушение.
23. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка или клетка-предшественник, которая получена способом по любому из пп. 12-22.
24. Способ лечения гемопоэтического нарушения, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества генетически сконструированной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника по любому из пп. 1-8 и 23, или клеточной популяции по п. 9.
25. Способ по п. 24, в котором гемопоэтическое нарушение представляет собой гемопоэтическое злокачественное новообразование.
26. Способ по п. 24 или п. 25, дополнительно включающий введение субъекту эффективного количества агента, который нацеливается на CD33, и причем агент содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33.
27. Способ по п. 26, в котором агент, который нацеливается на CD33, представляет собой иммунную клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33.
28. Способ по 27, в котором иммунная клетка представляет собой Т-клетку.

29. Способ по любому из пп. 24-28, в котором иммунные клетки, генетически сконструированная гемопоэтическая клетка или клетка-предшественник, или обе, являются аллогенными.
30. Способ по любому из пп. 24-29, в котором иммунные клетки, генетически сконструированная гемопоэтическая клетка или клетка-предшественник, или обе, являются аутологичными.
31. Способ по любому из пп. 27-30, в котором антигенсвязывающий фрагмент в химерном рецепторе представляет собой одноцепочечный фрагмент (scFv) антитела, который специфически связывает CD33 человека.
32. Способ по любому из пп. 24-31, в котором субъект представляет собой пациента-человека с лимфомой Ходжкина, неходжкинской лимфомой, лейкозом или множественной миеломой.
33. Способ по п. 32, в котором субъект представляет собой пациента-человека с лейкозом, который представляет собой острый миелоидный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфобластный лейкоз.
34. Направляющая рибонуклеиновая кислота (нРНК), содержащая спейсерную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:70.
35. нРНК по п. 34, причем нРНК представляет собой одномолекулярную нРНК (онРНК).
36. нРНК по п. 34 или п. 35, причем нРНК является химически модифицированной.
37. нРНК по любому из пп. 34-36, причем спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 70.
38. нРНК по любому одному из пп. 34-37, которая не направляет генетическое редактирование на любой предполагаемый нецелевой сайт в клетке-мишени, например не

направляет в клетке-мишени генетическое редактирование на любой сайт, указанный на Фиг. 30.

39. Генетически сконструированная гемопоэтическая стволовая клетка или клетка-предшественник, которая содержит генетическую мутацию в экзоне 3 эндогенного гена CD33, причем генетическая мутация представляет собой сайт, на который нацелена нРНК, которая содержит нуклеотидную последовательность AUCCCUGGCACUCUAGAACC (SEQ ID NO: 67).

40. Направляющая рибонуклеиновая кислота (нРНК), содержащая спейсерную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 67.

Линиеспецифические антигены

Тип 0
Антиген является линиеспецифическим,
но
а) Антиген требуется для выживания
б) ИЛИ тип клеток, несущий антиген, требуется для выживания
в) Пример: Легкие, глиальные клетки или CD31 (эндотелиальные клетки)
Это плохие мишени для CAR-T-терапии

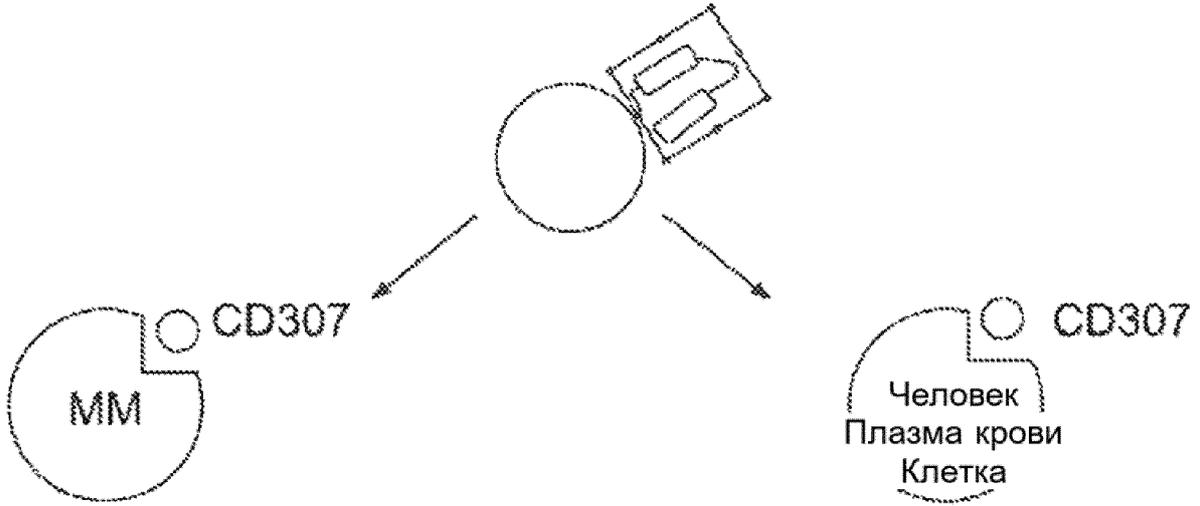
Тип 1
Антиген является линиеспецифическим,
но
а) антиген **не** требуется для выживания
б) тип клеток, несущий антиген, не требуется для выживания
Пример: CD307, экспрессируется в миеломных клетках и плазмацитах
Это хорошие мишени для CAR-T-терапии

Тип 3
Антиген является линиеспецифическим (или опухолеспецифическим),
но
а) антиген **не** требуется для выживания
б) тип клеток, несущий антиген, не требуется для выживания
Пример: LMP2 образует EBV, экспрессируемый в EBV-производных опухолях
Это хорошие мишени для CAR-T-терапии

Тип 2*
Антиген является линиеспецифическим,
но
а) антиген **не** требуется для выживания
б) тип клеток, несущий антиген, не требуется для выживания
в) Но АНТИГЕН МОЖЕТ ИЗМЕНЯТЬСЯ CRISP в НОРМАЛЬНОЙ КЛЕТКЕ ИЛИ СТВОЛОВОЙ КЛЕТКЕ
Пример: CD33, экспрессируется в клетках AML, миелоидных клетках и стволовых клетках. Это хорошие мишени для CAR-T-терапии, если их комбинировать с CRISPR-опосредованной делеции антигена в нормальных клетках

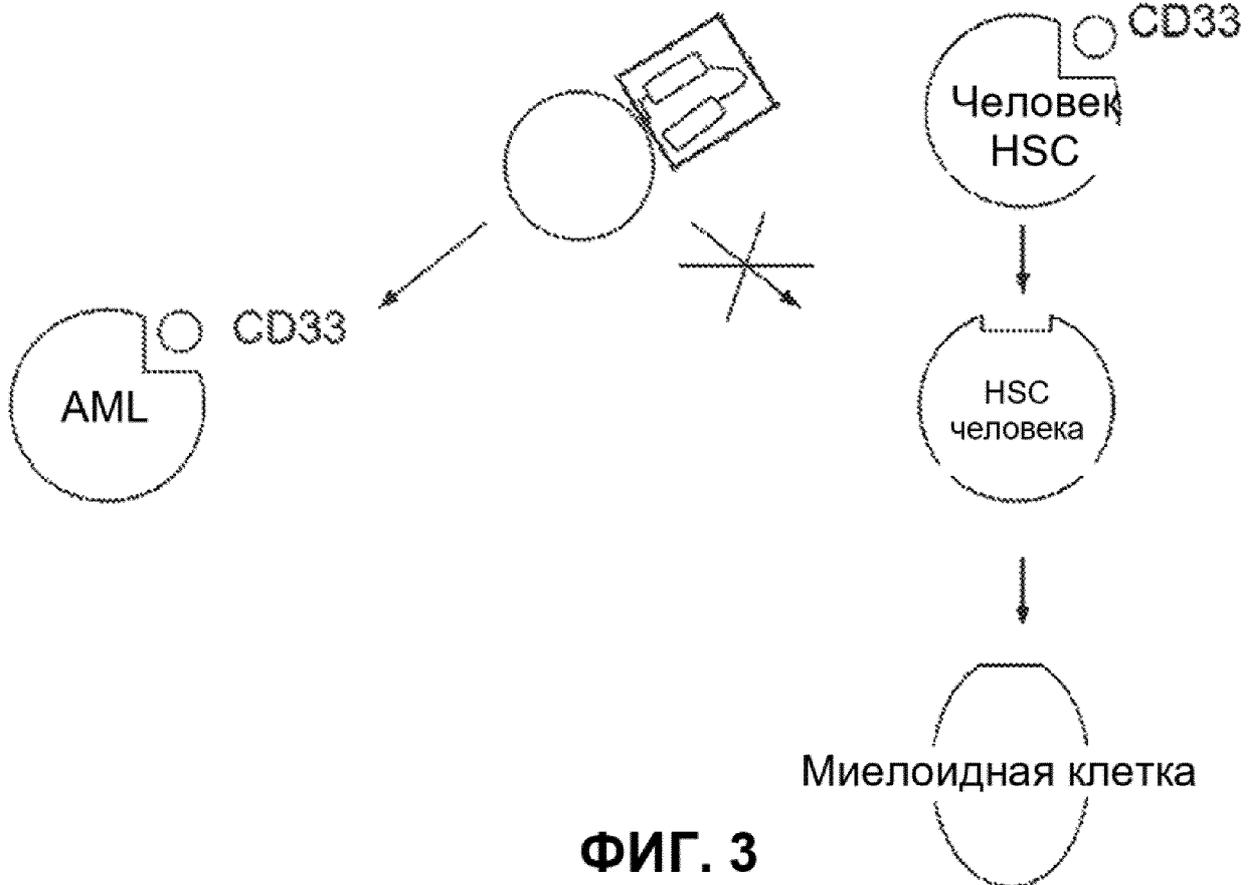
ФИГ. 1

CART против CD307

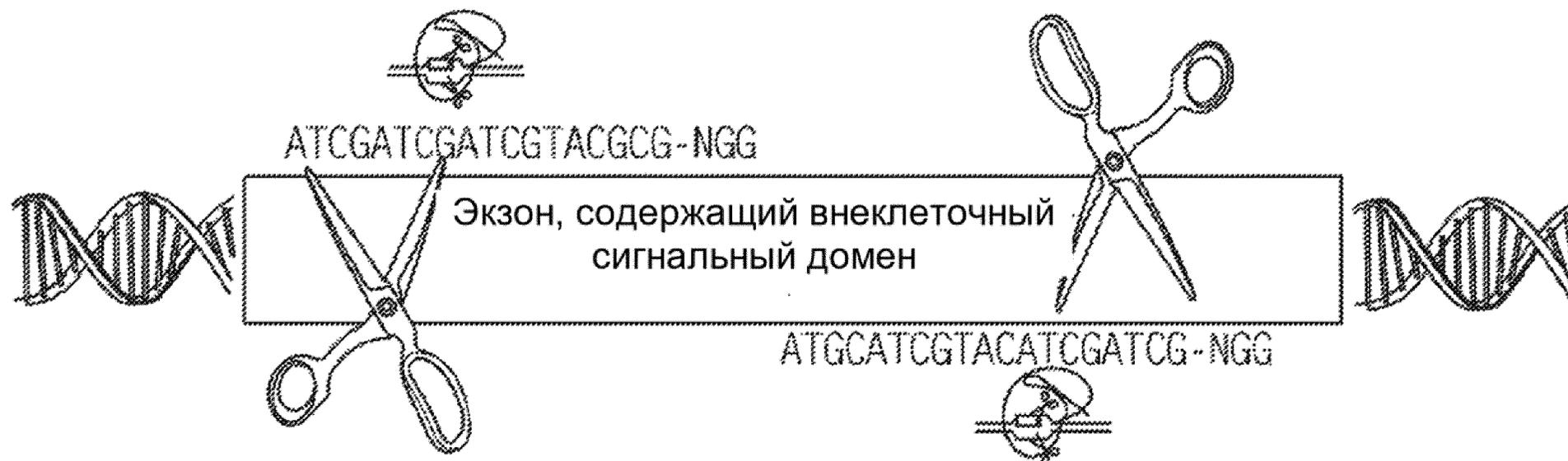


ФИГ. 2

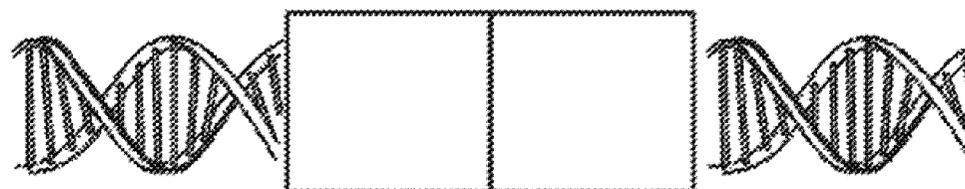
CART против CD33



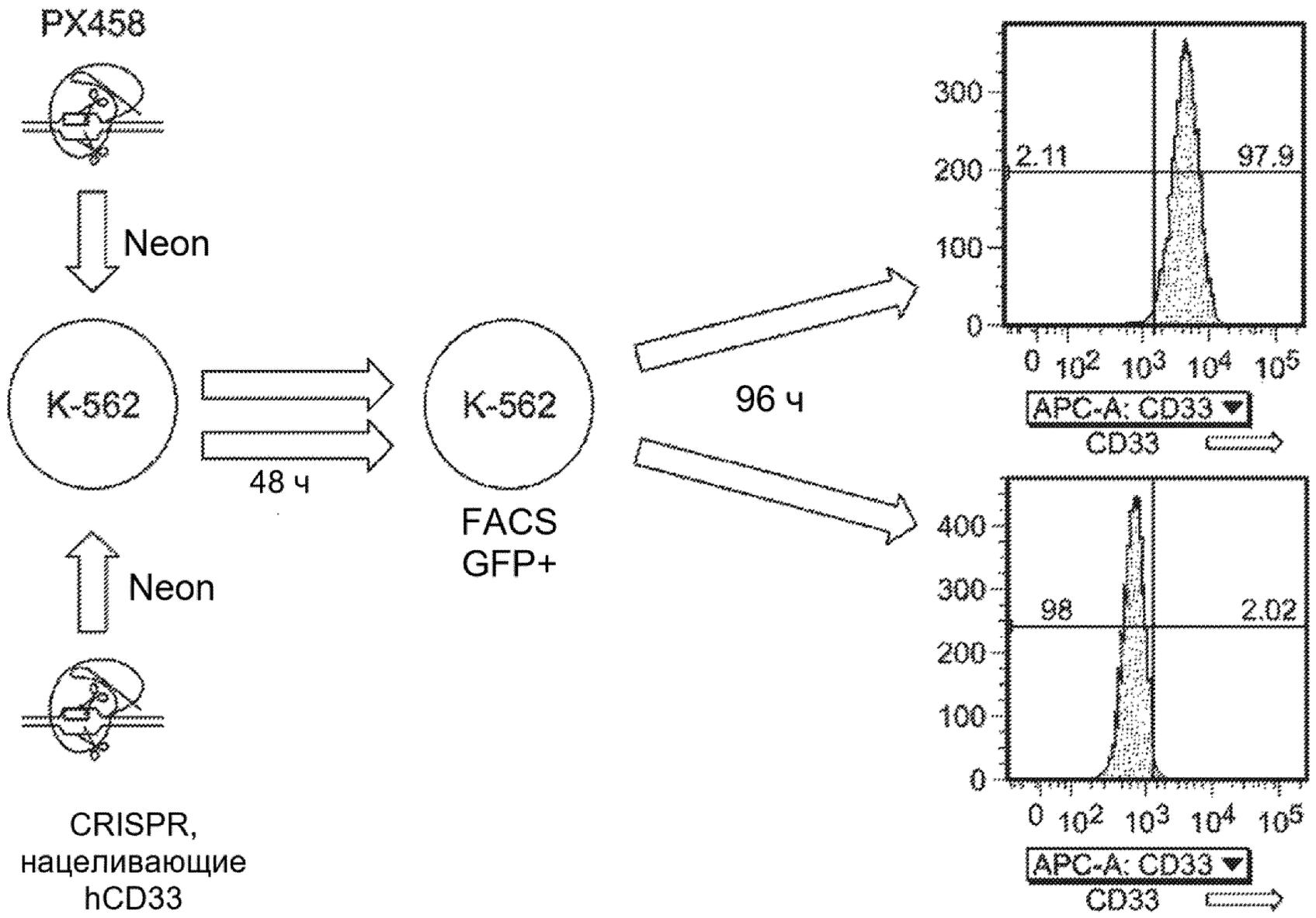
ФИГ. 3



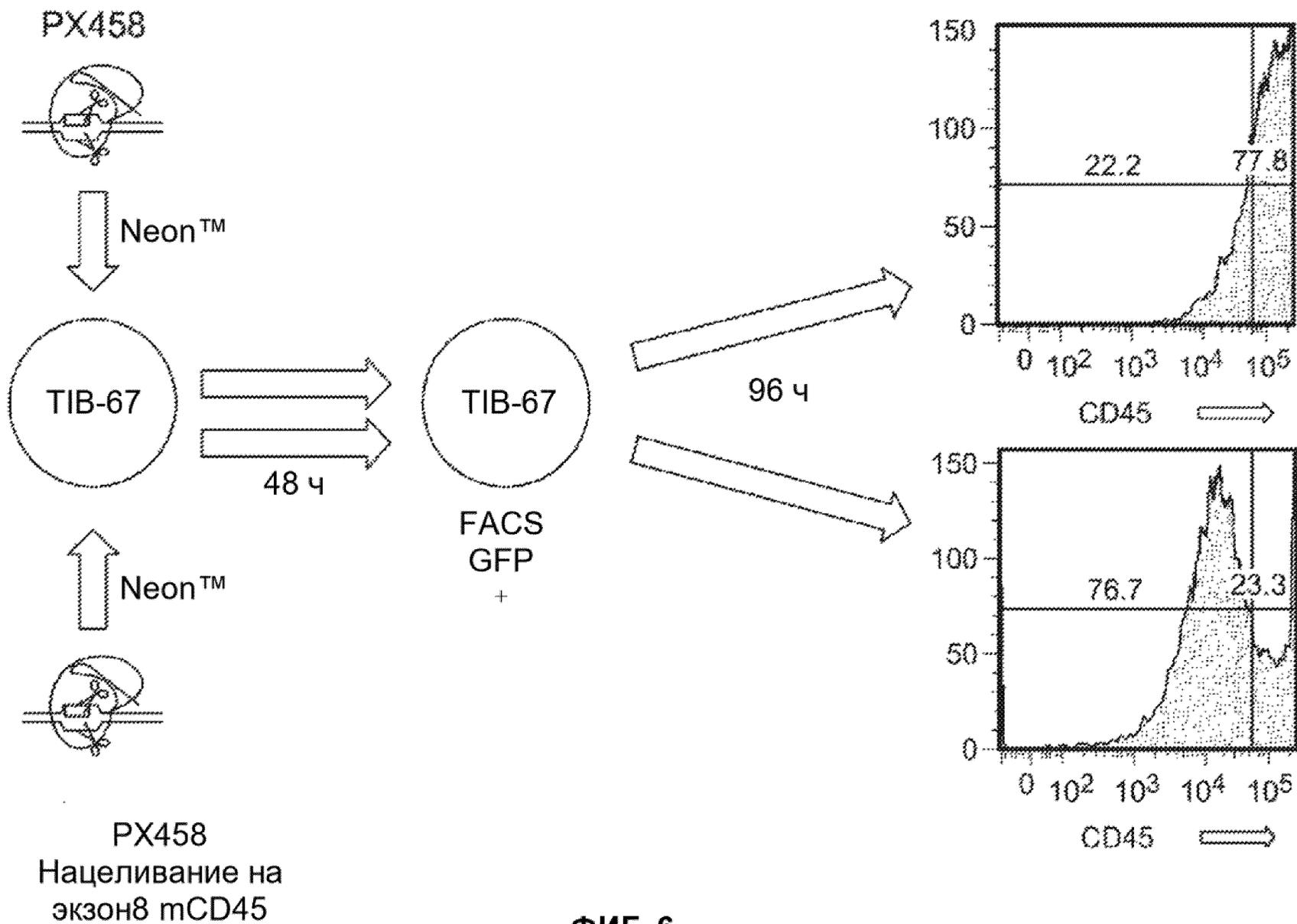
Функционально неактивное усечение



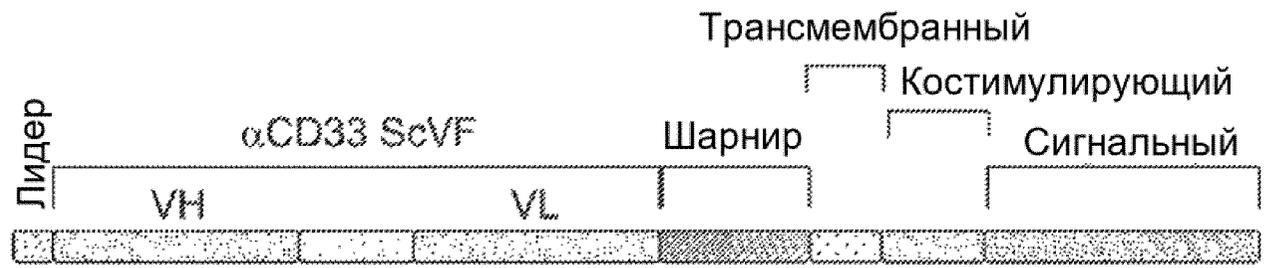
ФИГ. 4



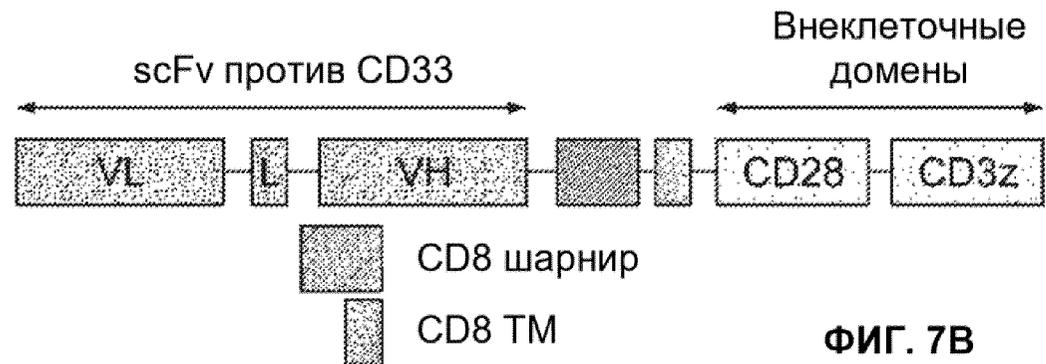
ФИГ. 5



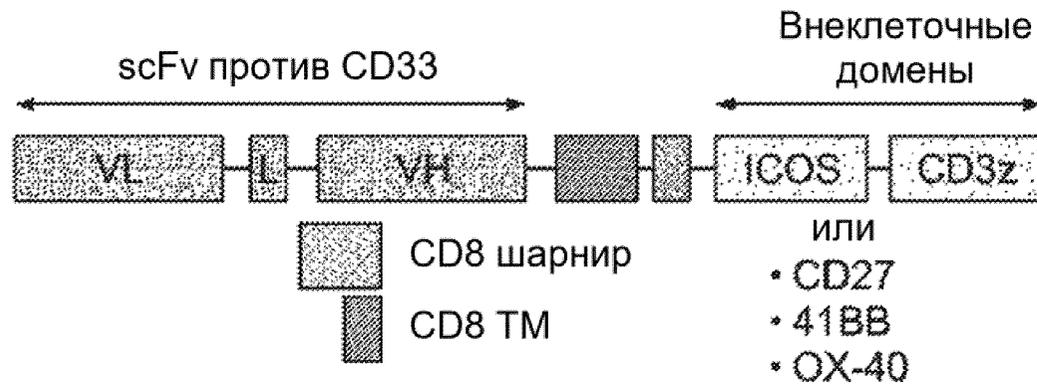
ФИГ. 6



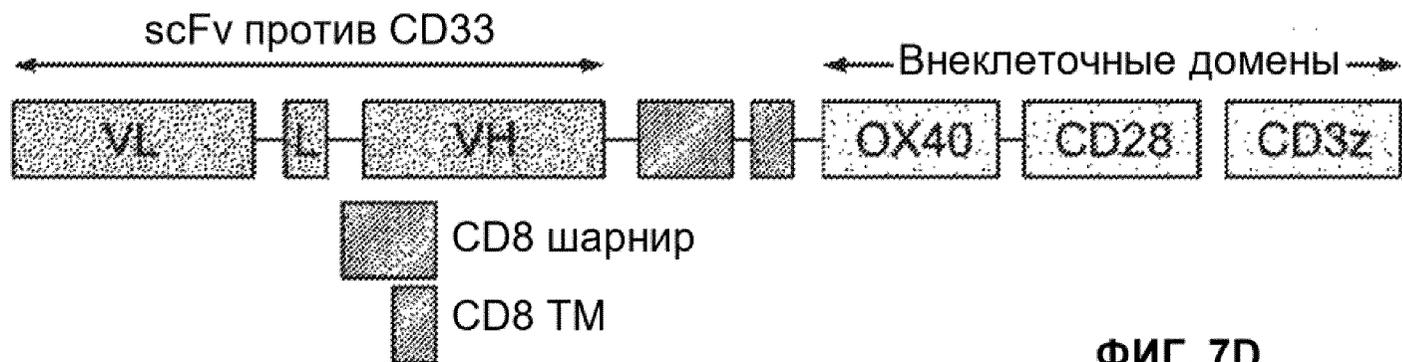
ФИГ. 7А



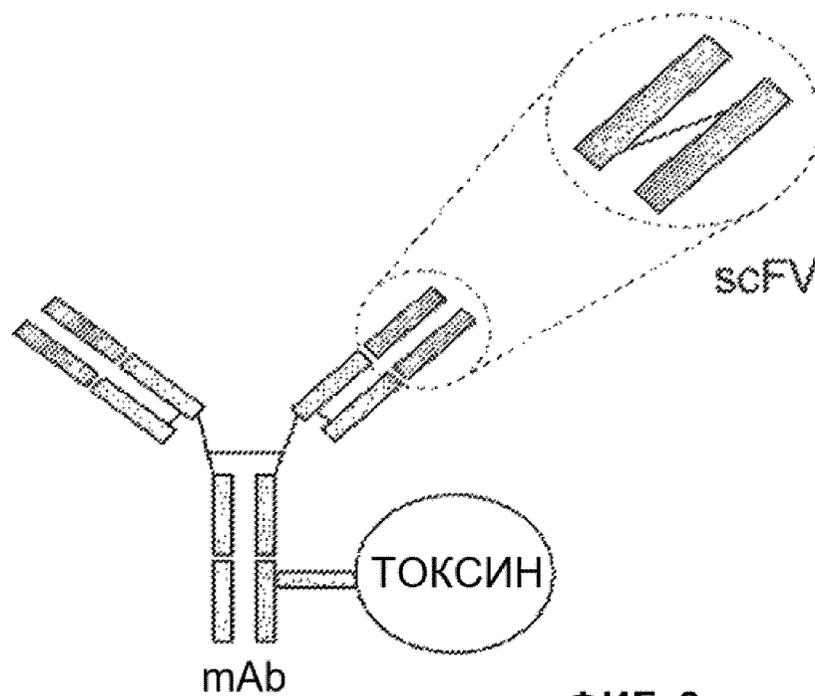
ФИГ. 7В



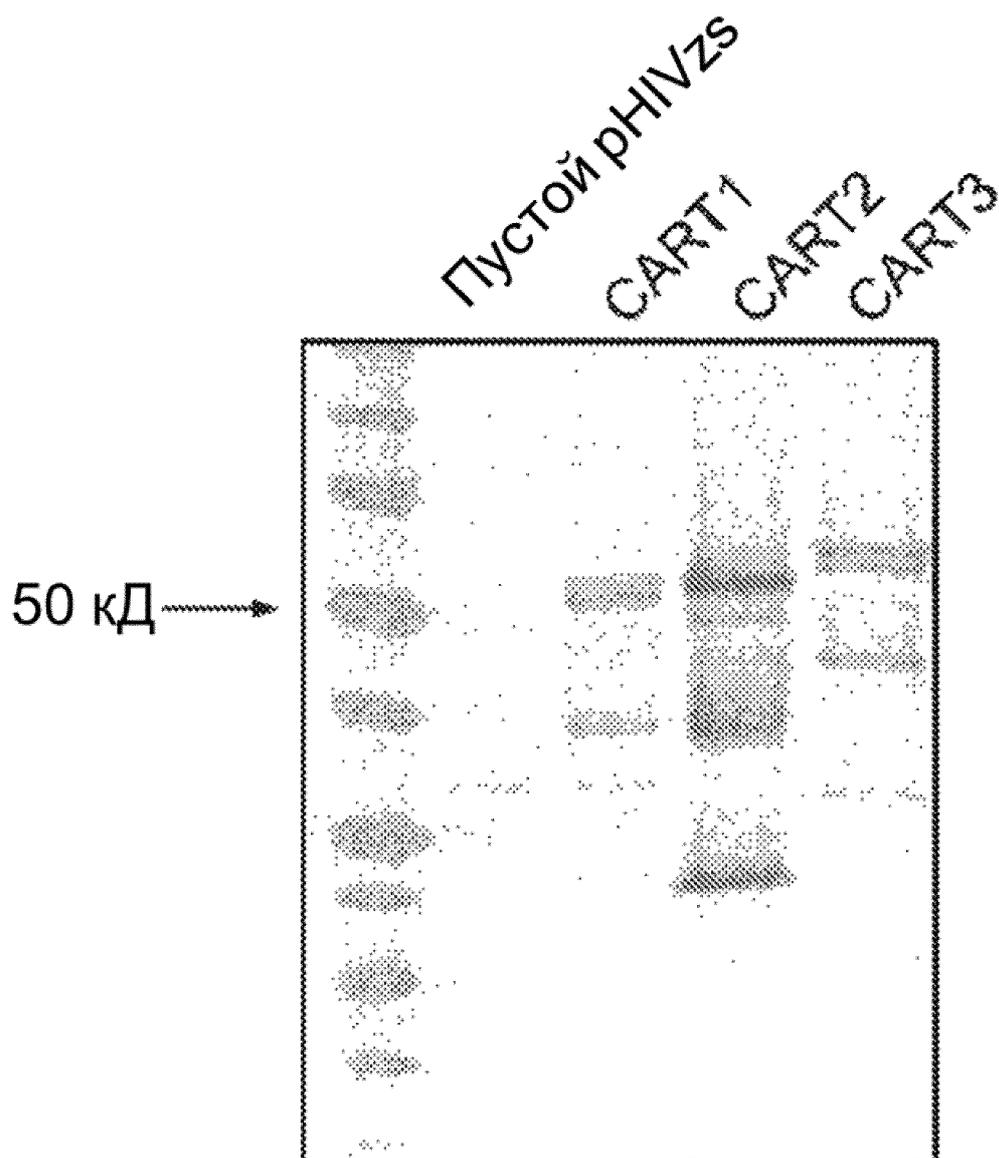
ФИГ. 7С



ФИГ. 7D



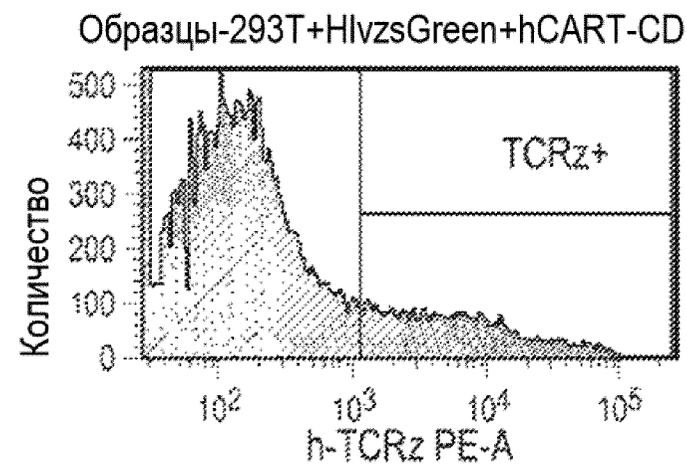
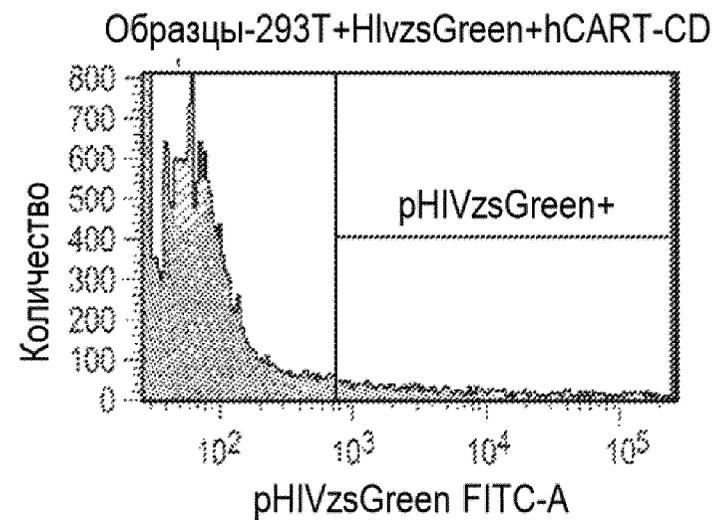
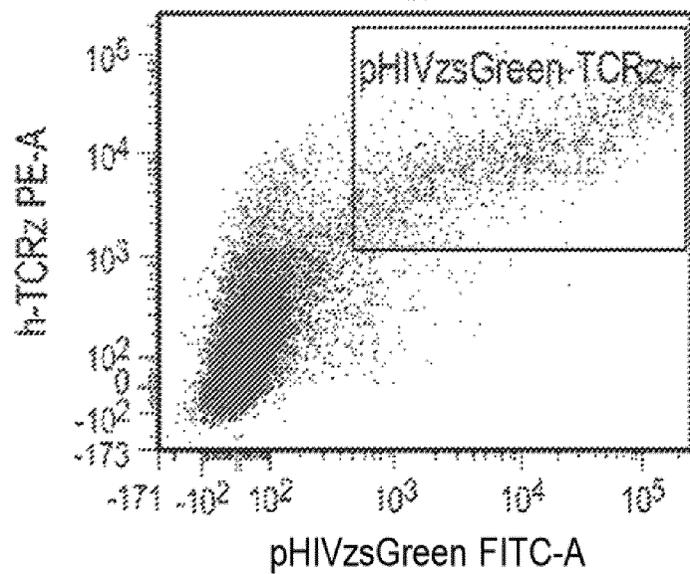
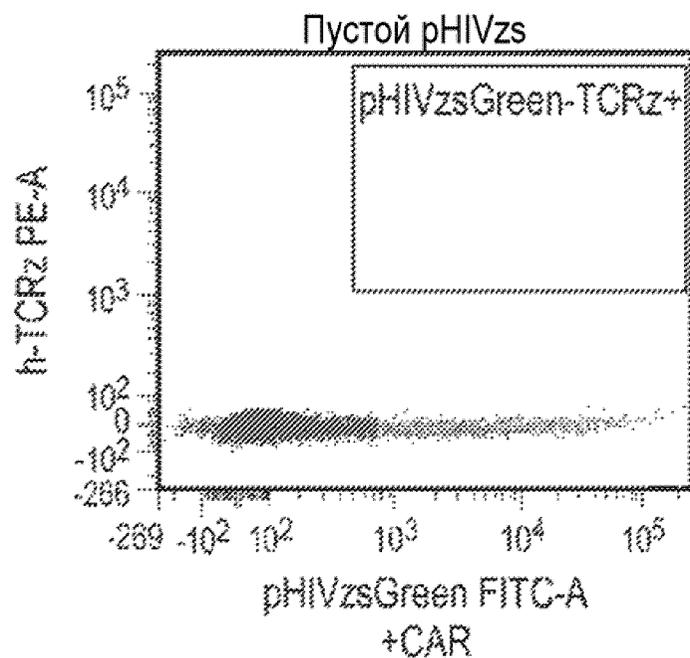
ФИГ. 8



Окрашивание анти-CD3zTCRz, аб
Эпитоп: С-конц. CD3z

Конструкция	MW кДа
CART1	55.3АААА
CART2	56.3
CART3	61

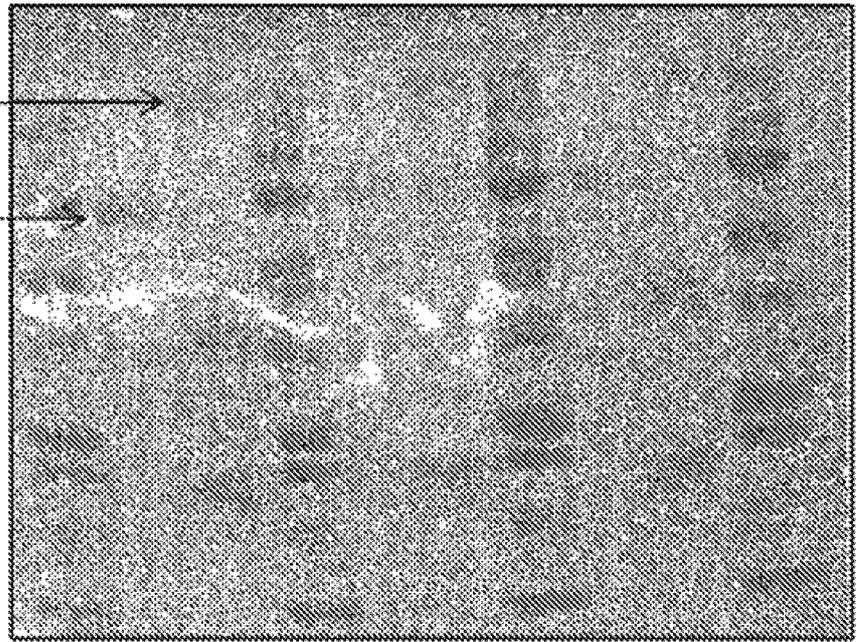
ФИГ. 9А



ФИГ. 9В

мол. CD33+
конъюгат APC

молекула CD33



1 2 3 4 5 6

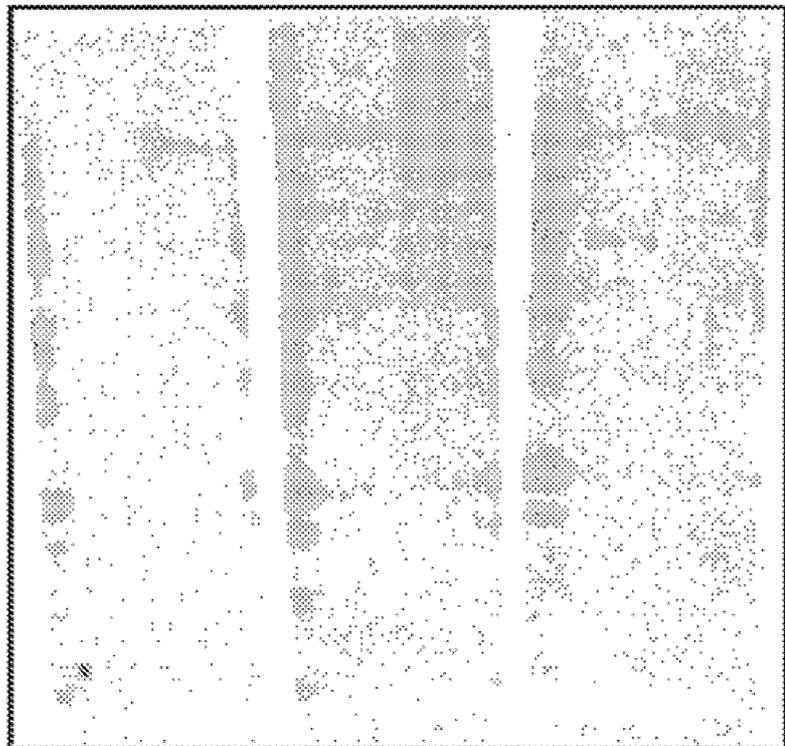
ФИГ. 10А

+лизат
293Т

HIVzsG

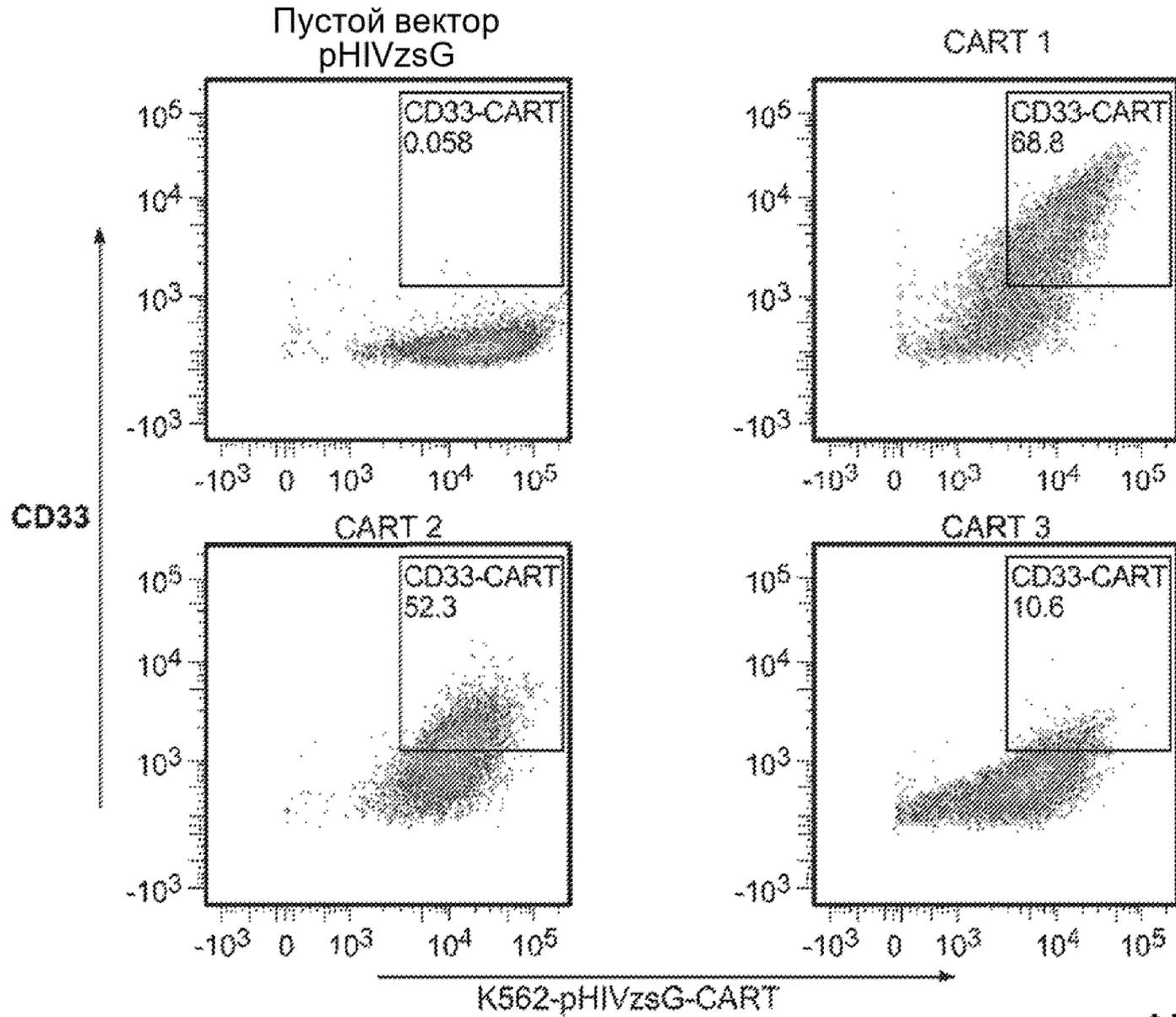
CART2

CART3



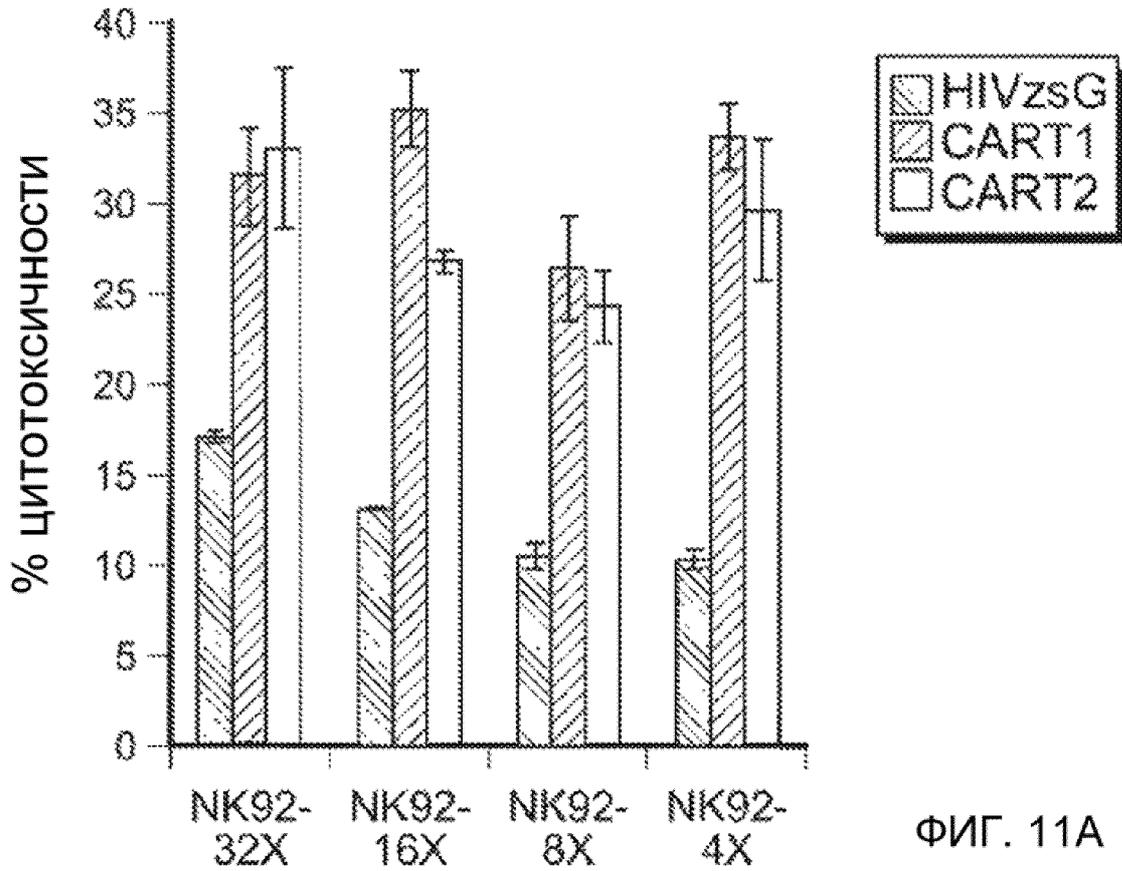
1 2 3 4 5 6

ФИГ. 10В

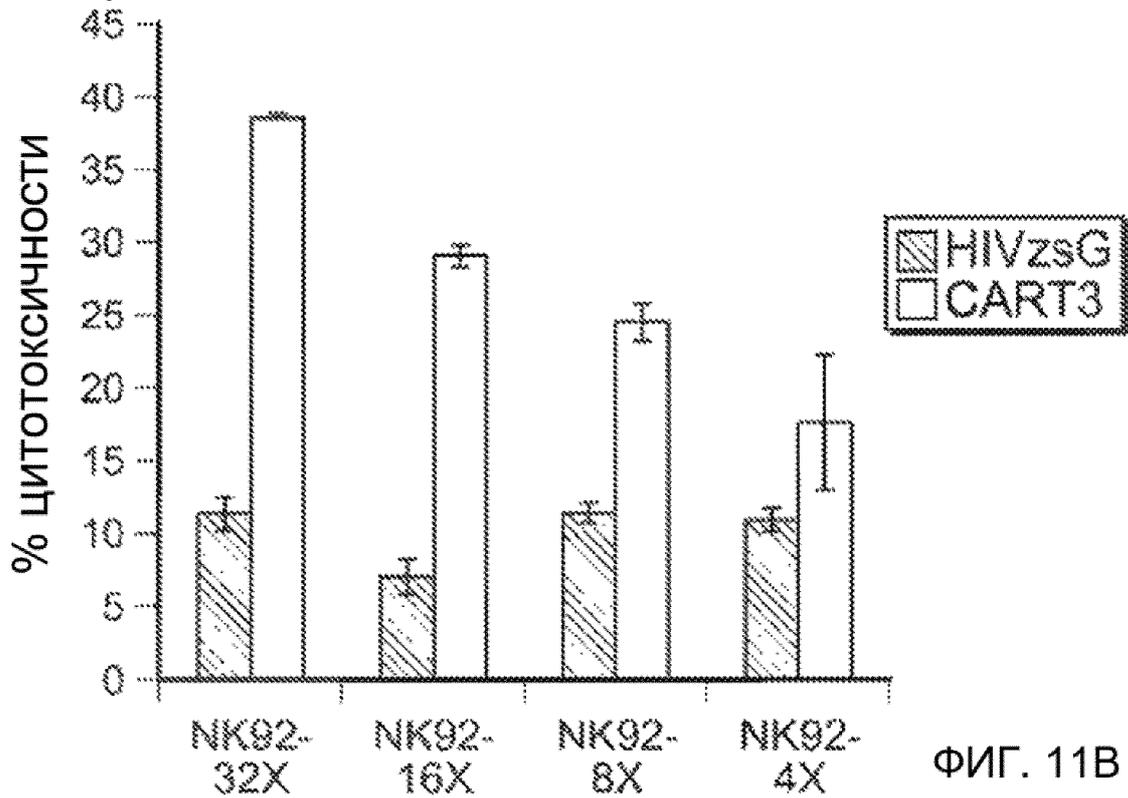


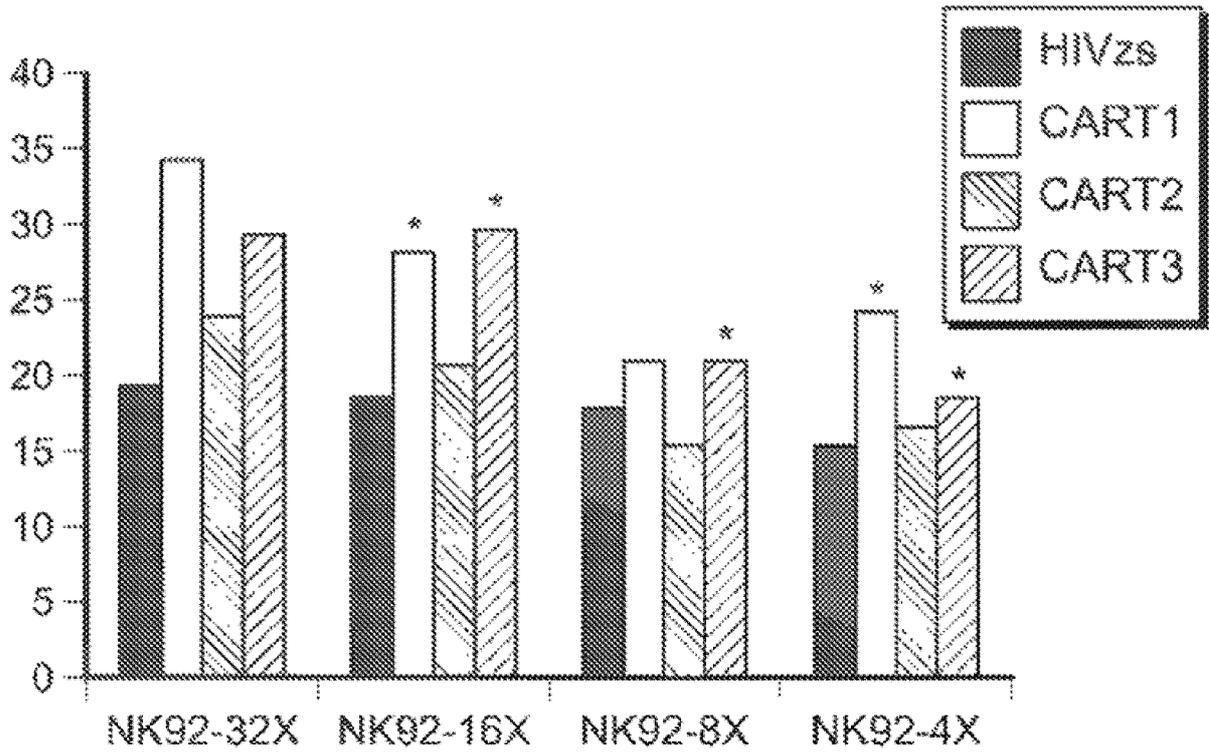
ФИГ. 10С

Цитотоксичность CAR-NK92 на клетках K562

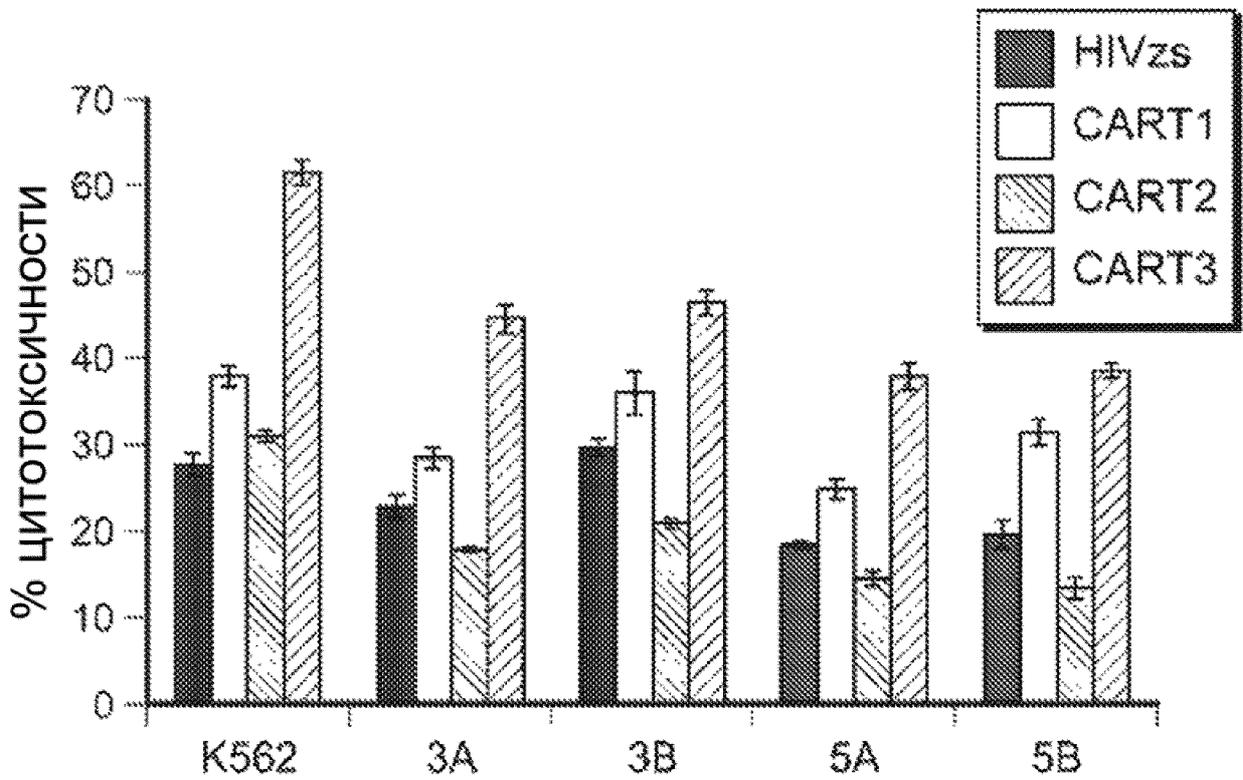


Цитотоксичность CAR-NK92 на клетках K562



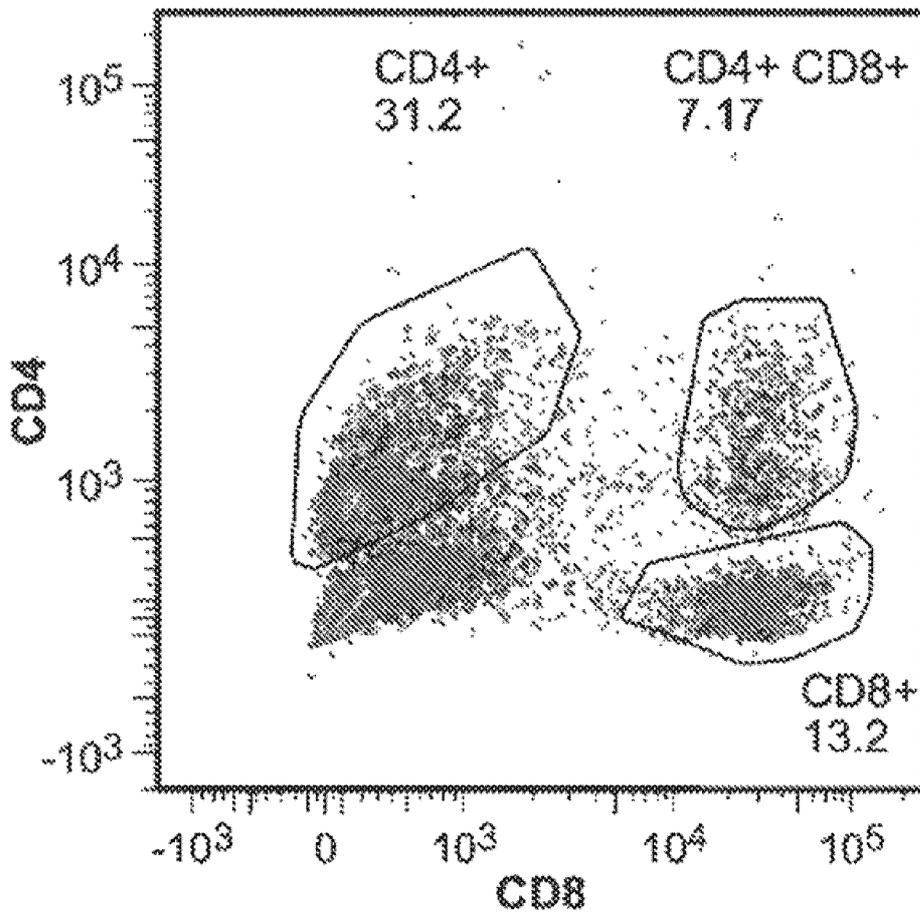


ФИГ. 12А

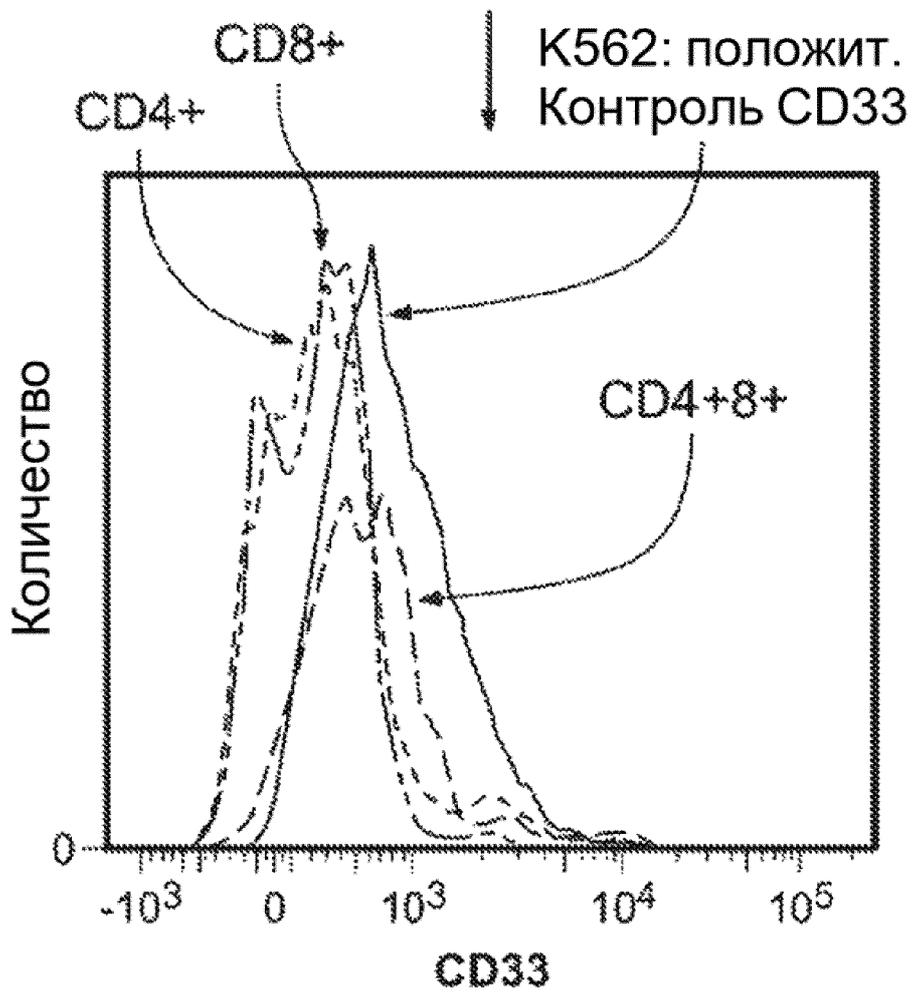


Один клон K562, обраб. Crisp CD33

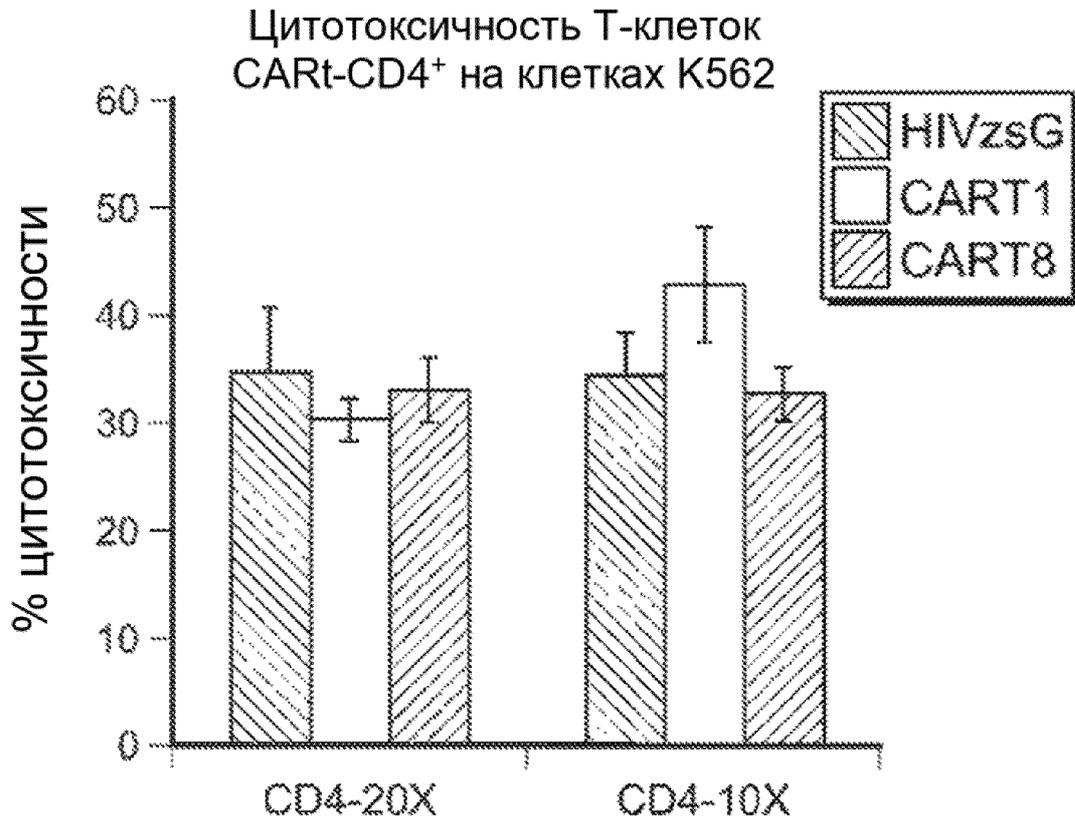
ФИГ. 12В



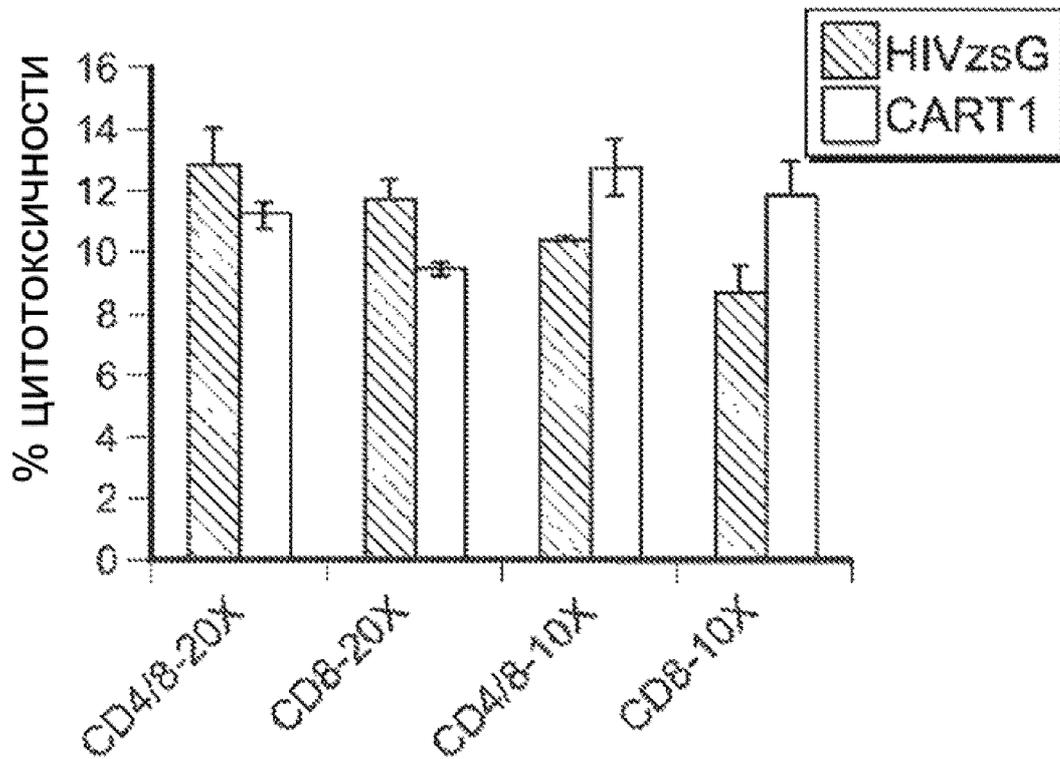
ФИГ. 13А



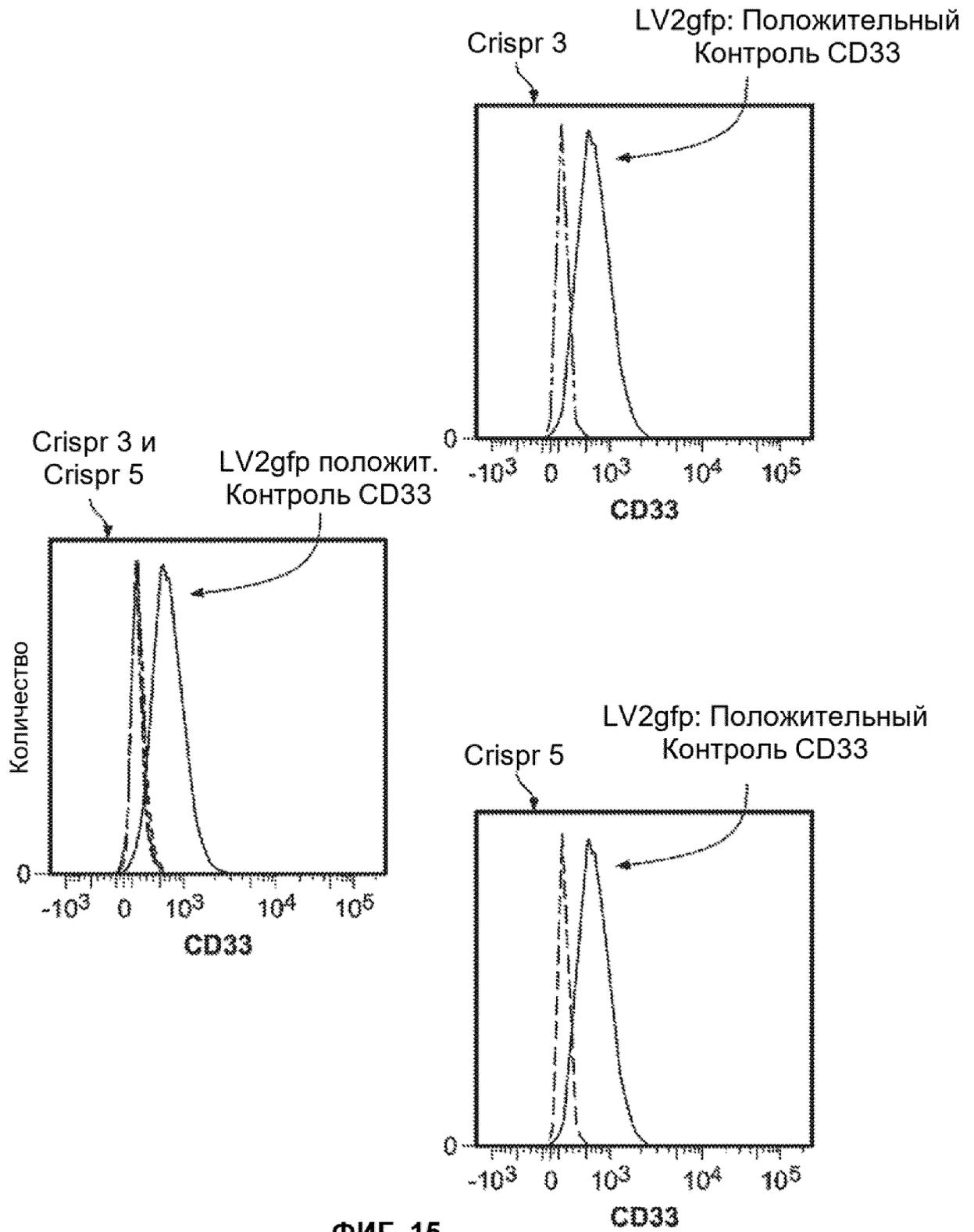
ФИГ. 13В



ФИГ. 14А

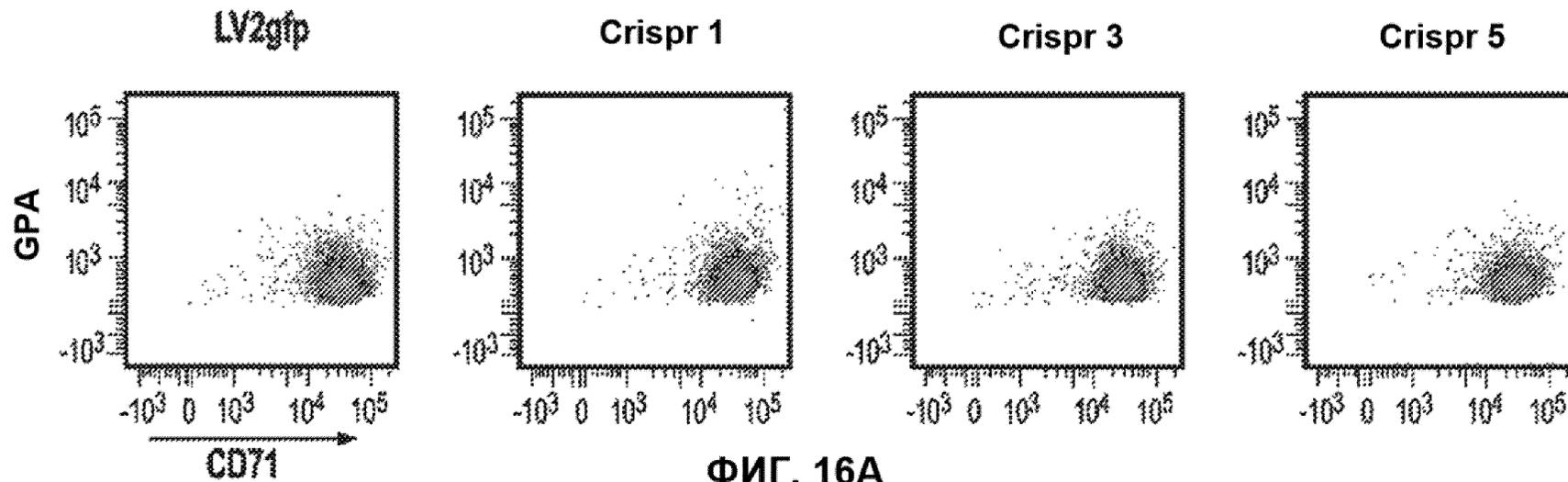


ФИГ. 14В

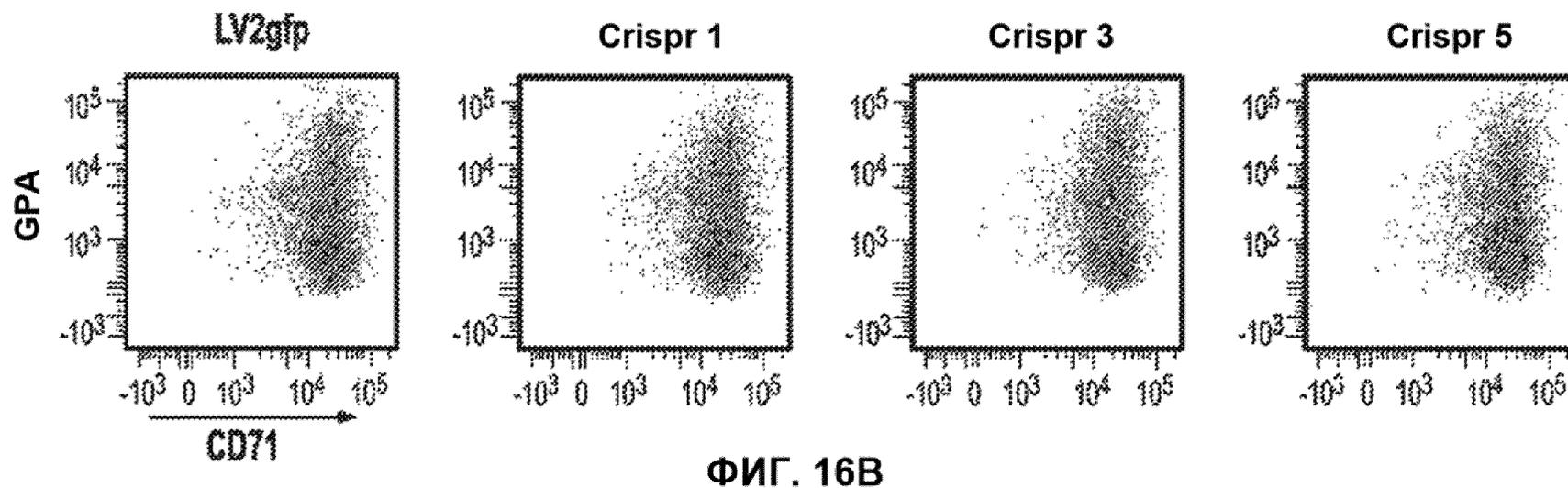


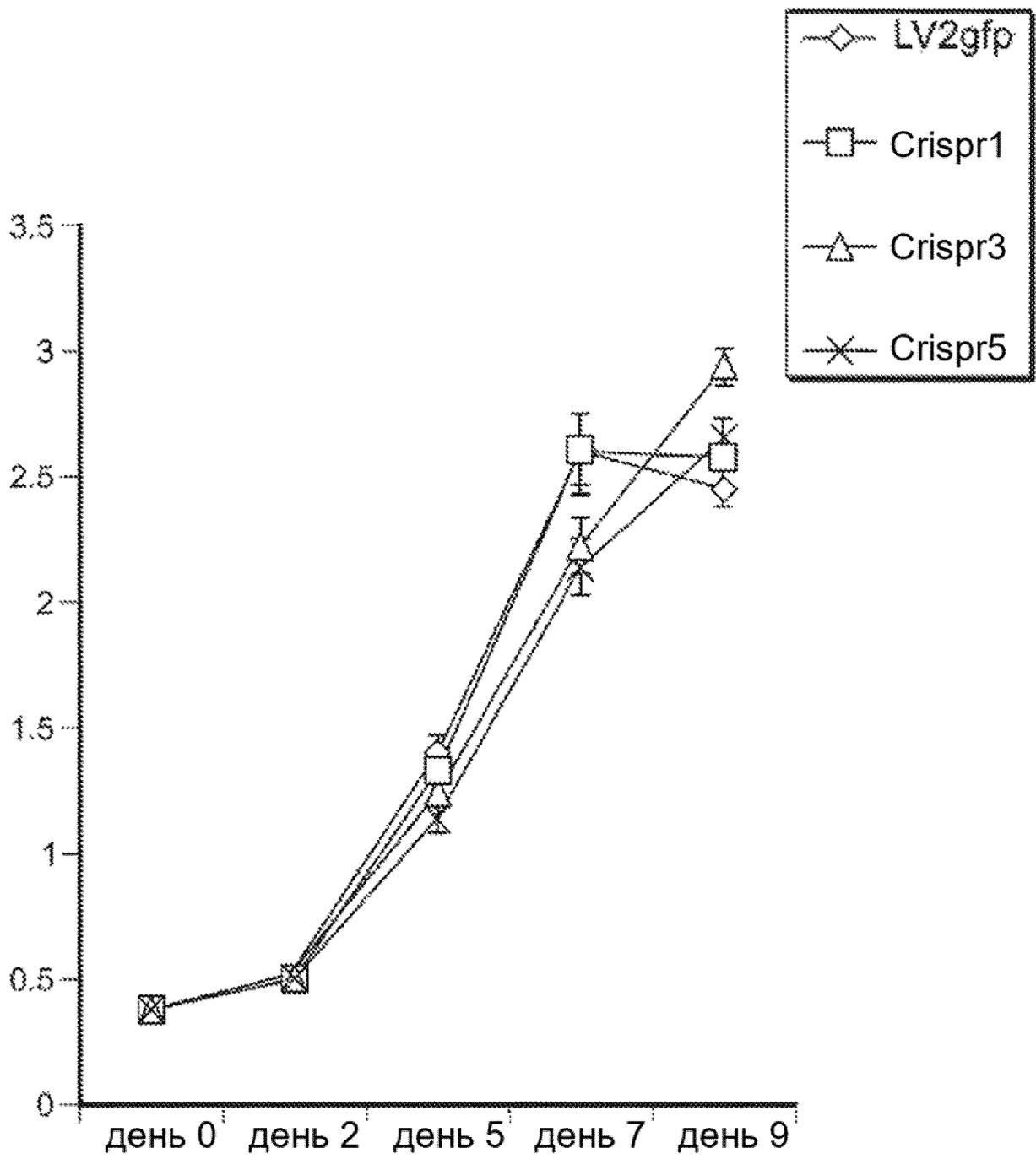
ФИГ. 15

Сутки 1: +50 мкМ гемина

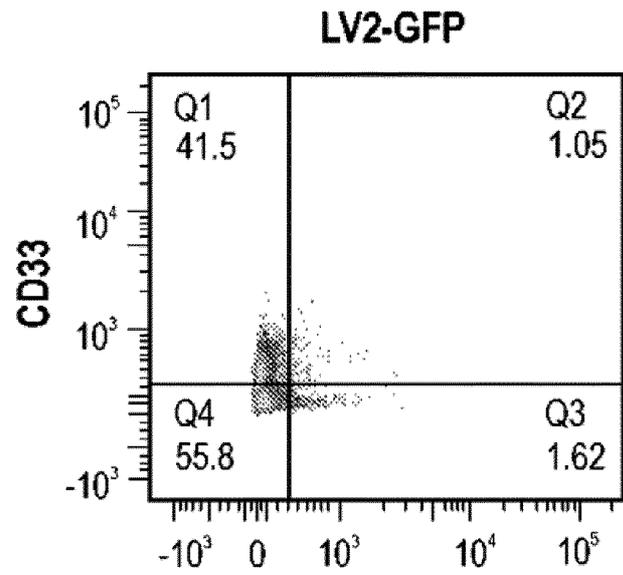
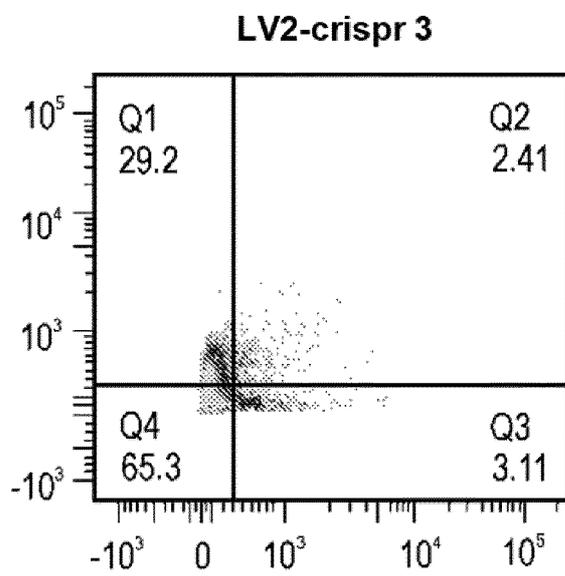
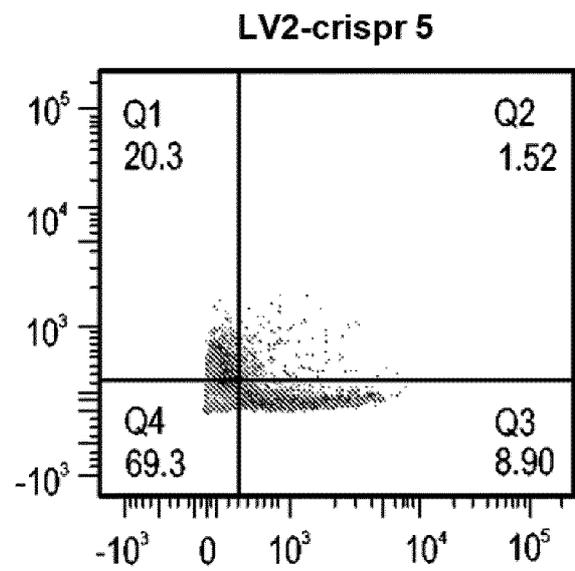


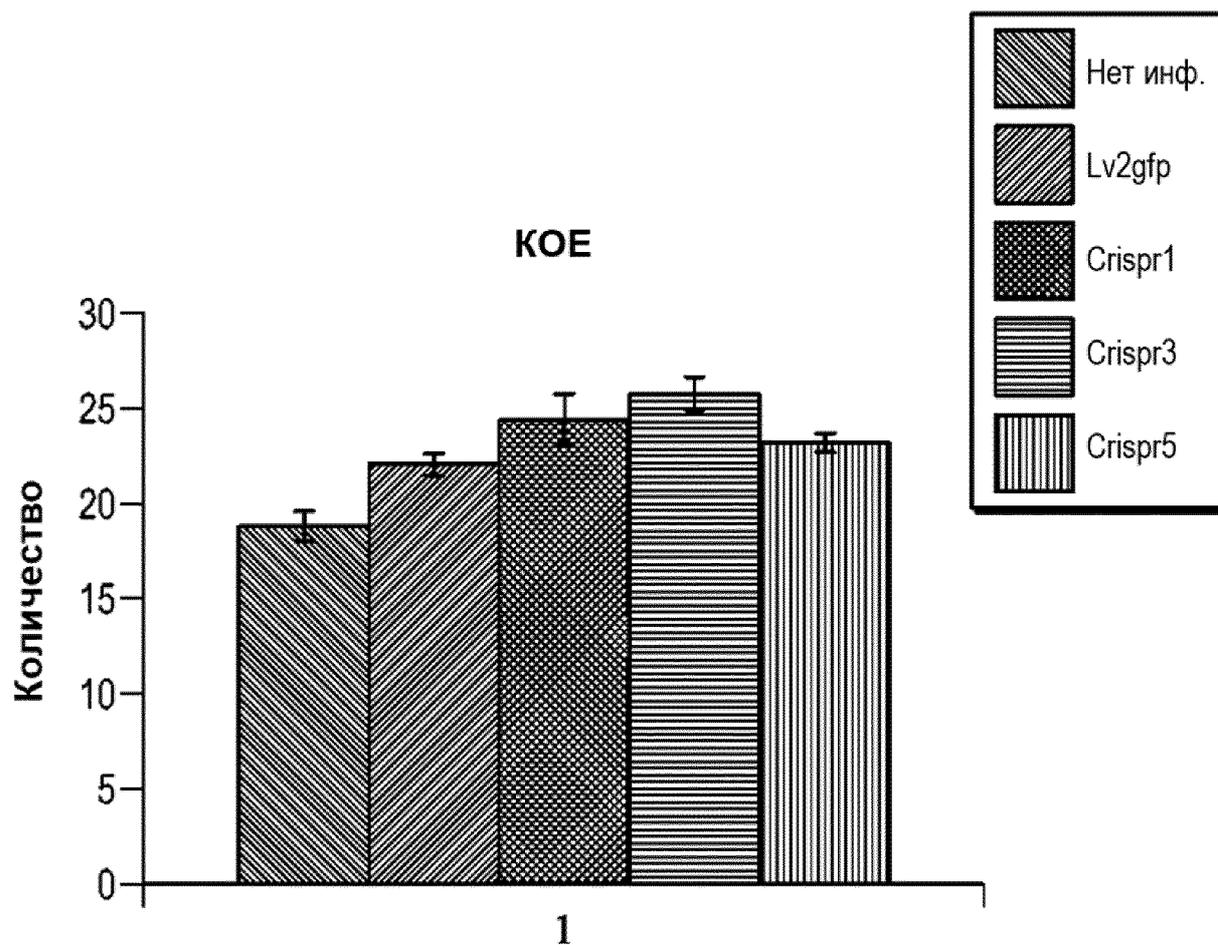
День 9



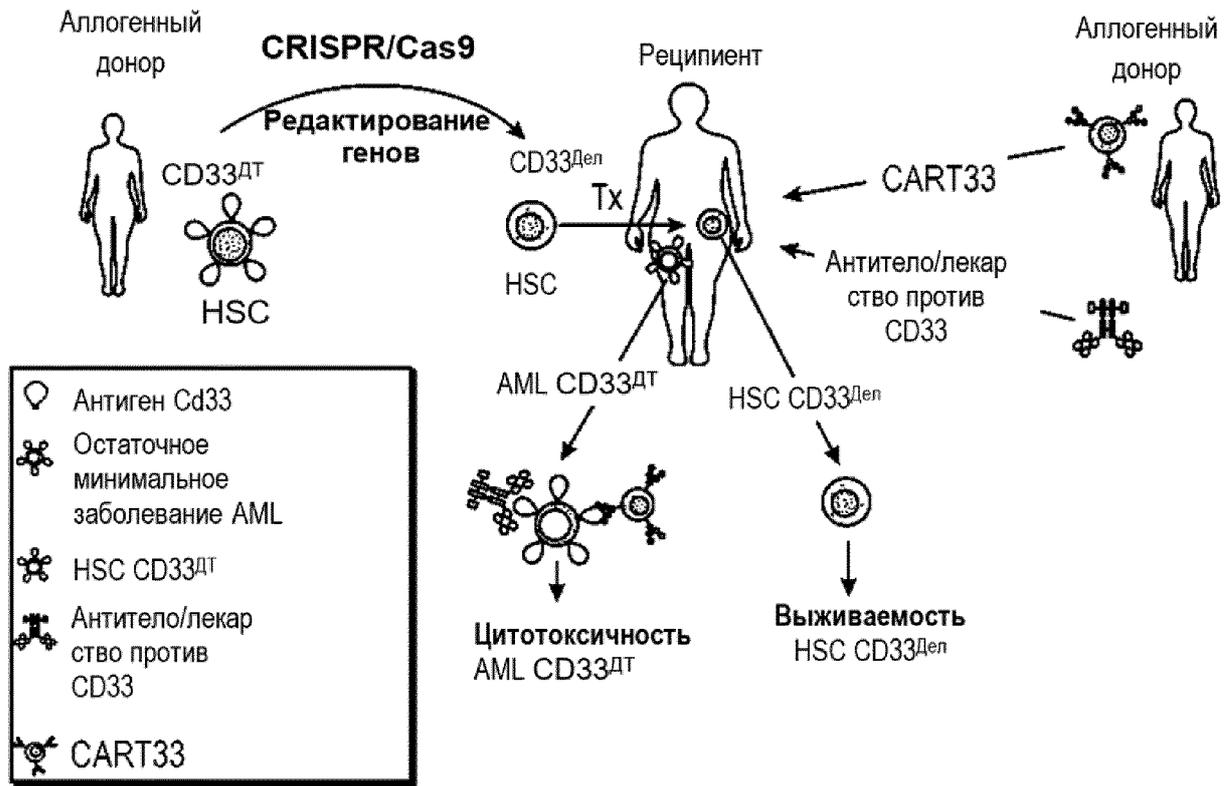


ФИГ. 16С

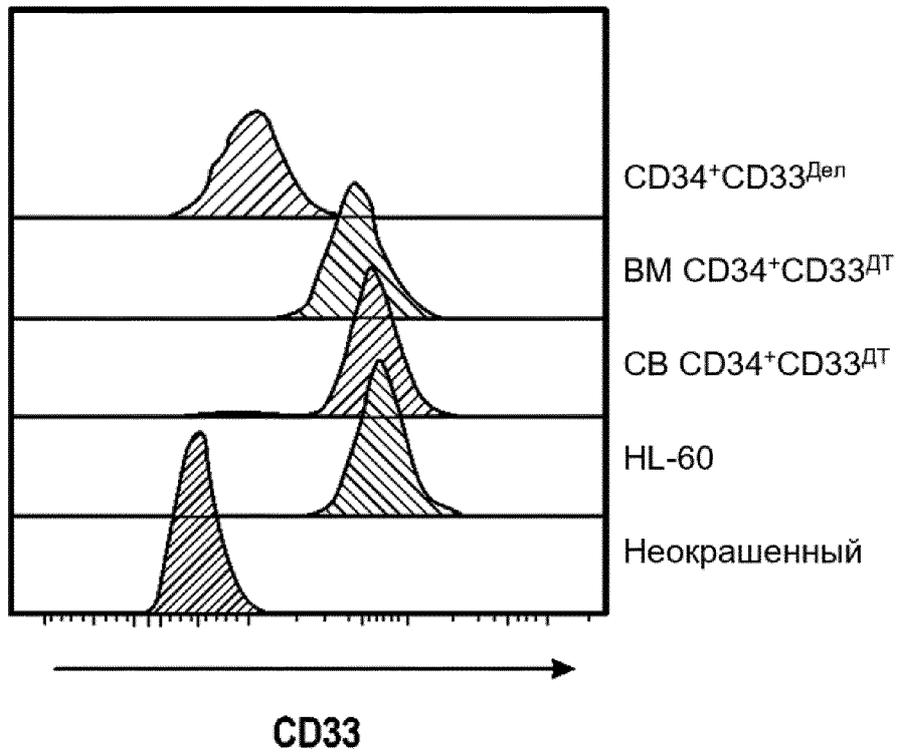
**ФИГ. 17А****ФИГ. 17В****ФИГ. 17С**



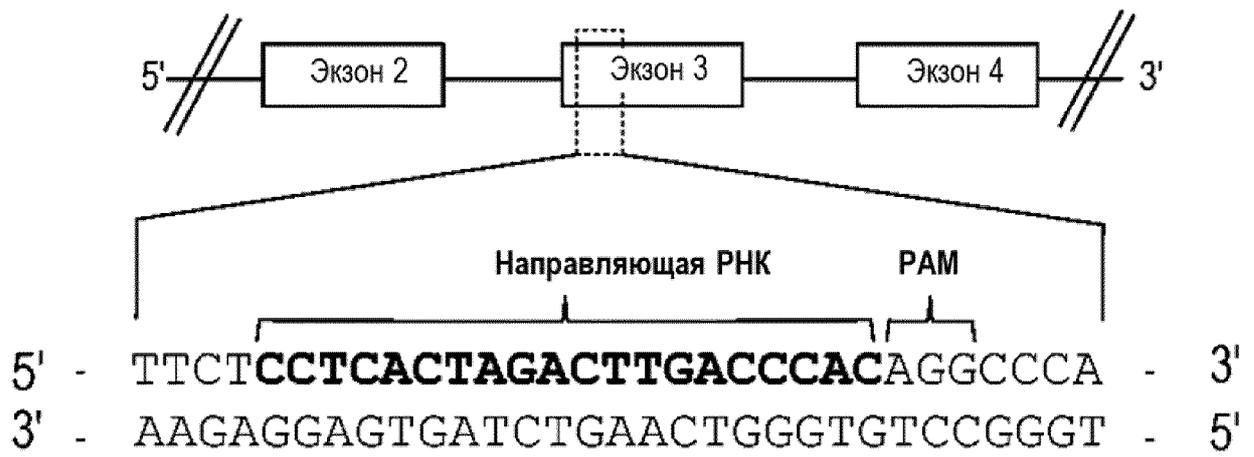
ФИГ. 18



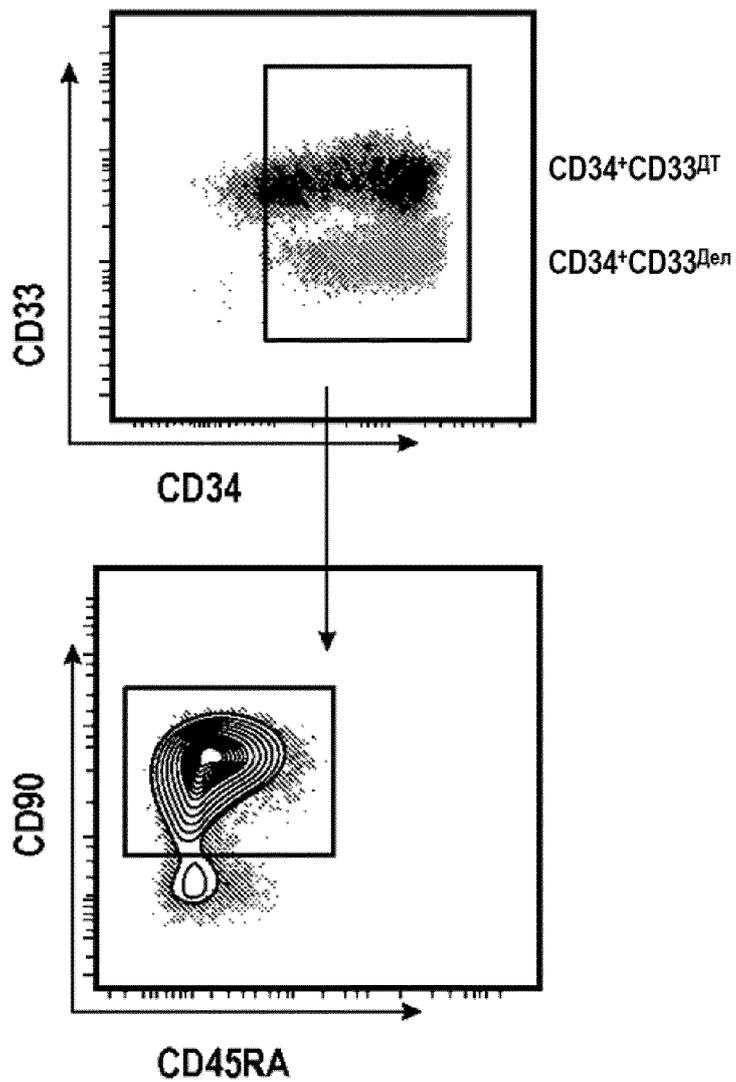
ФИГ. 19А



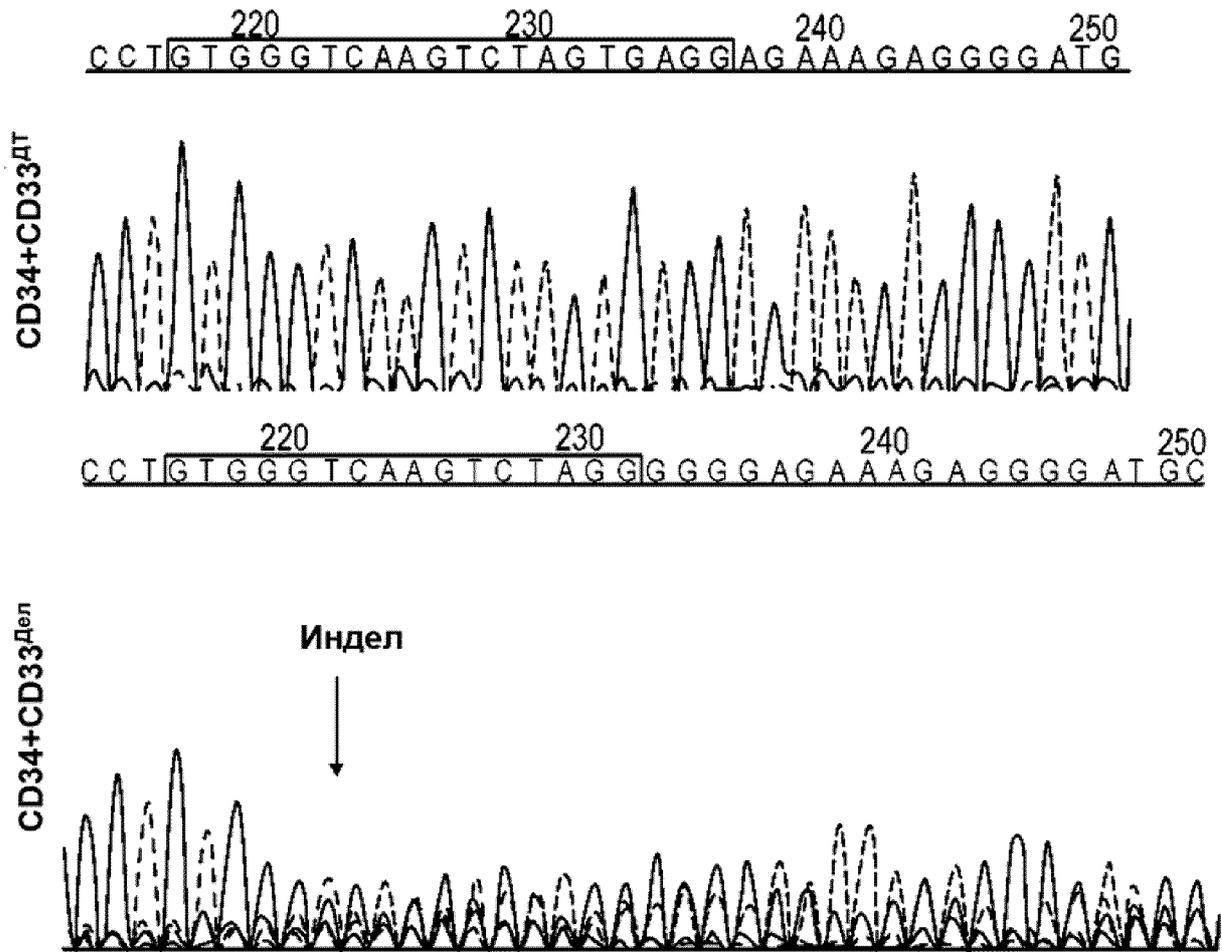
ФИГ. 19В



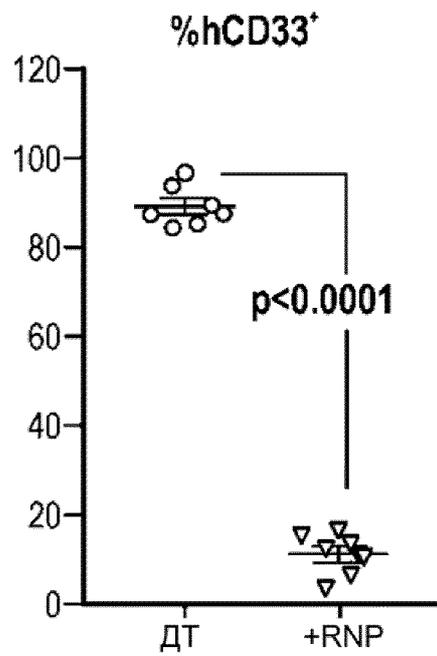
ФИГ. 19С



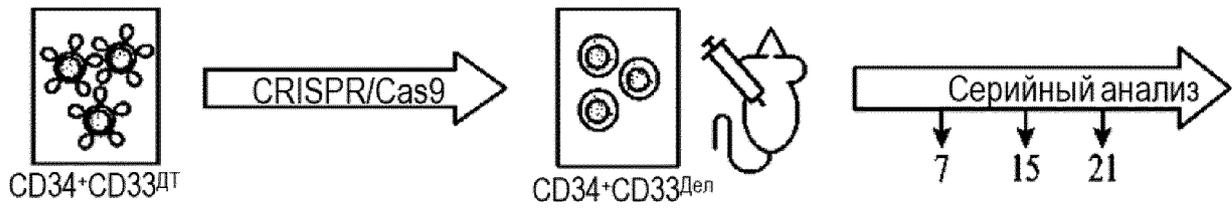
ФИГ. 19D



ФИГ. 19Е



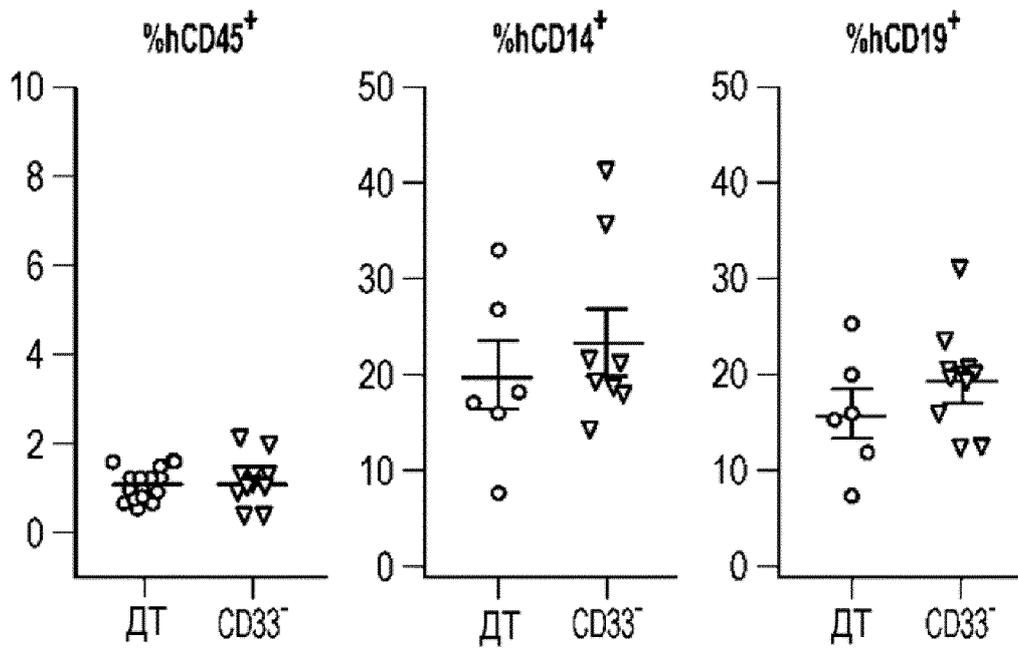
ФИГ. 19F



© Клетки CD34⁺CD33^{Δdel} костного мозга

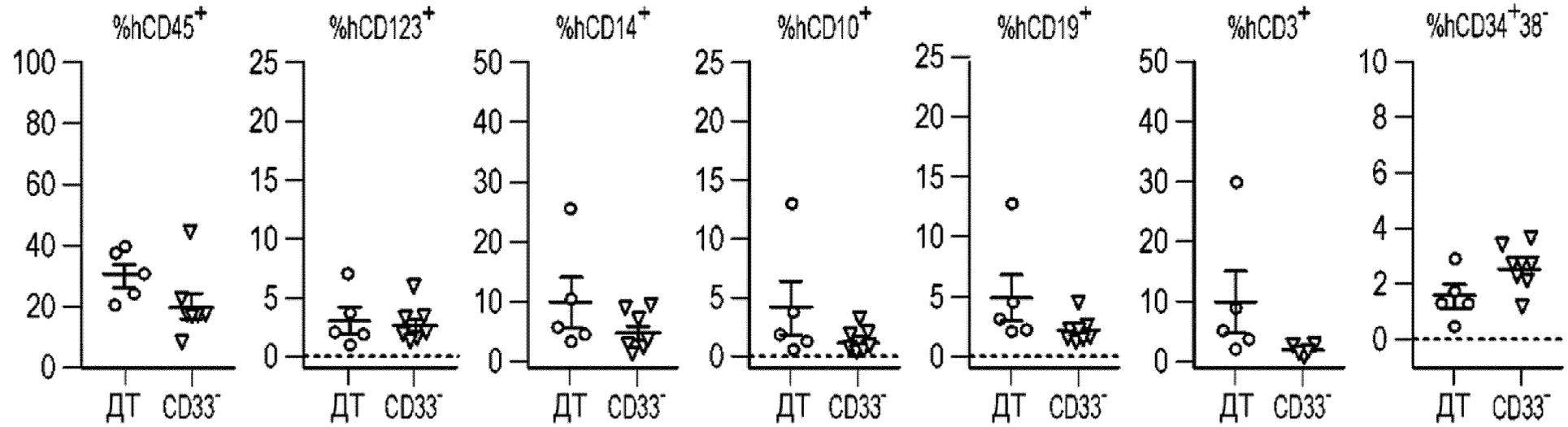
ФИГ. 20А

Анализ периферической крови на 7 неделе



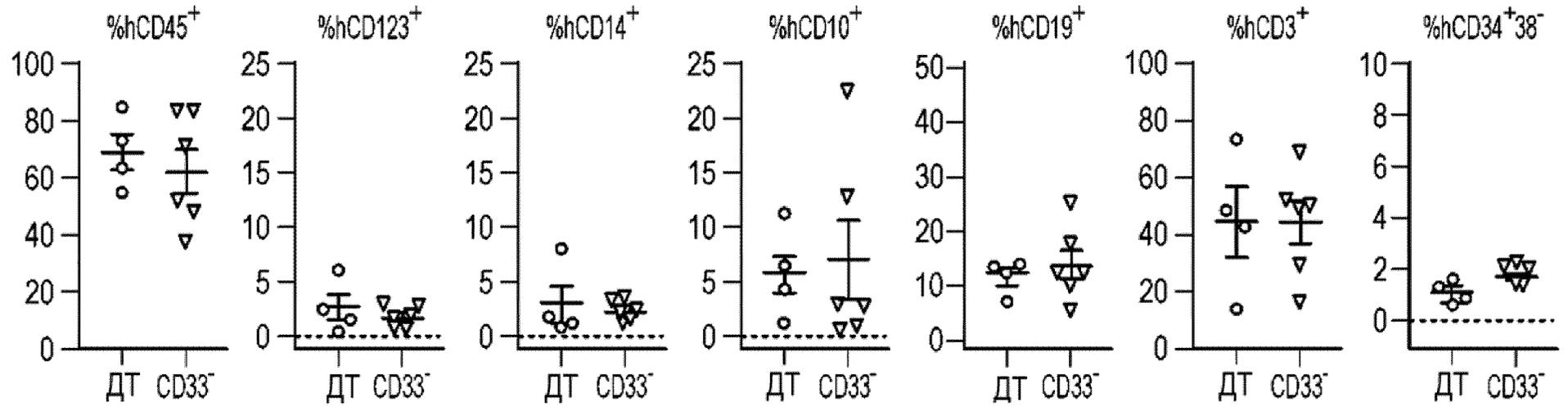
ФИГ. 20В

Анализ костного мозга на 21 неделе



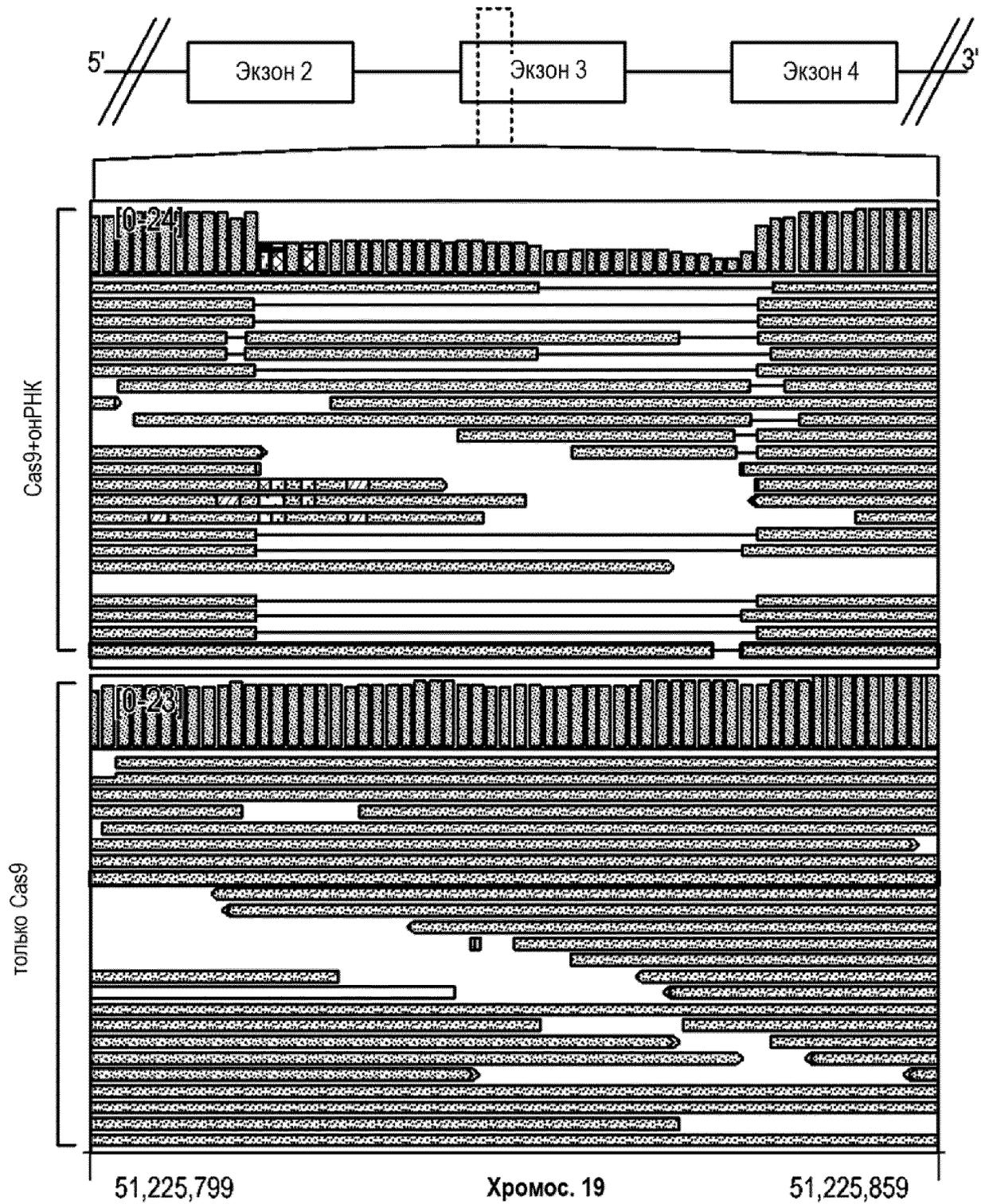
ФИГ. 20С

Анализ костного мозга на 21 неделе



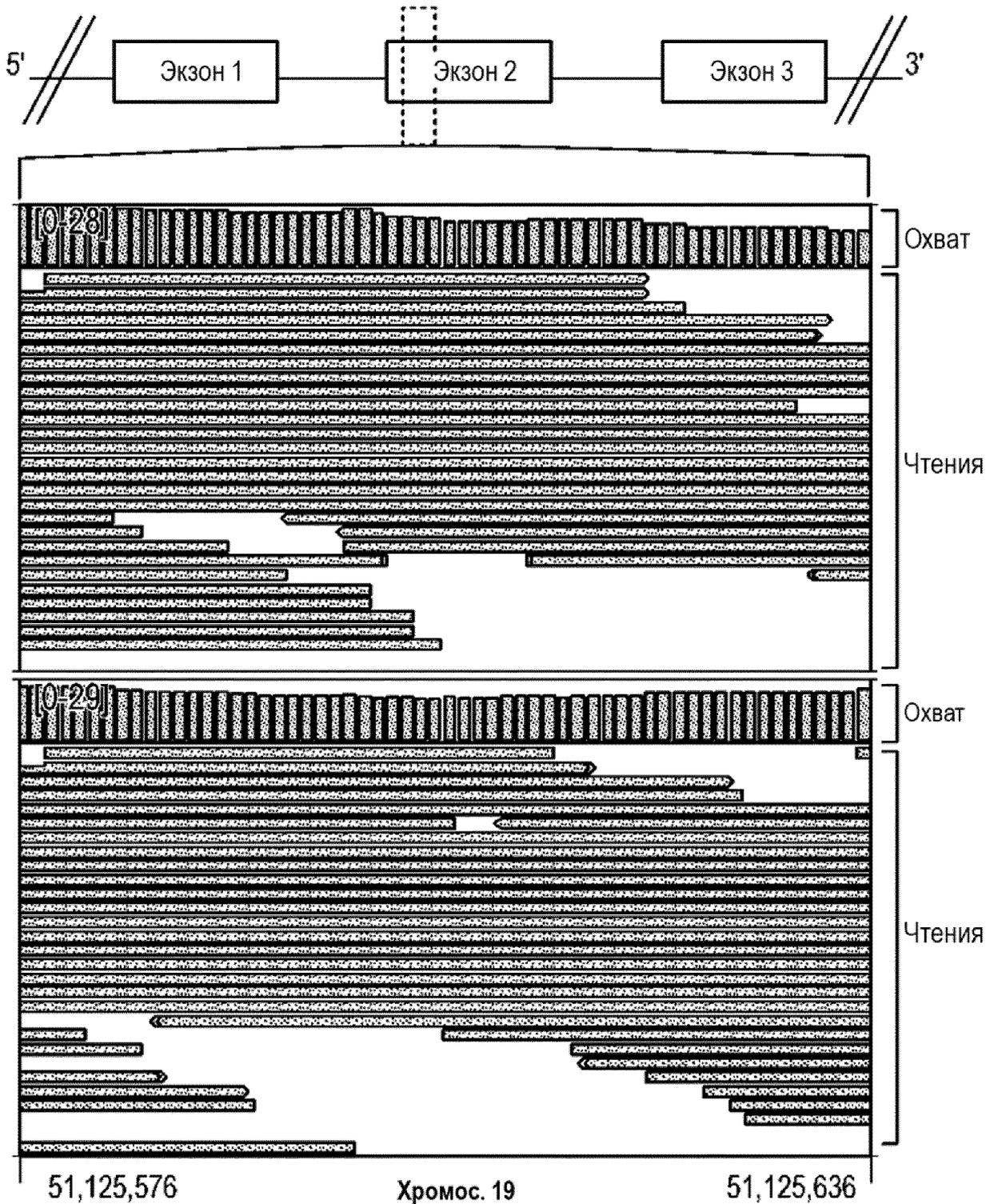
ФИГ. 20Е

CD33

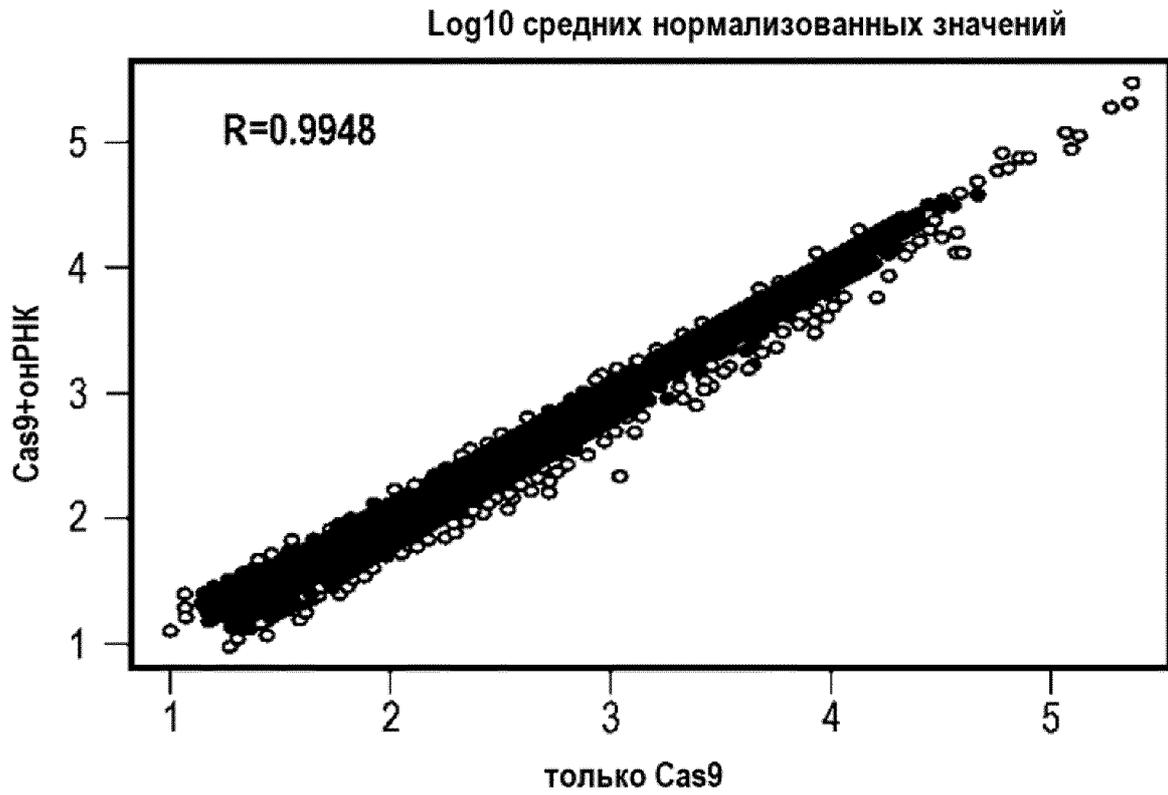


ФИГ. 21А

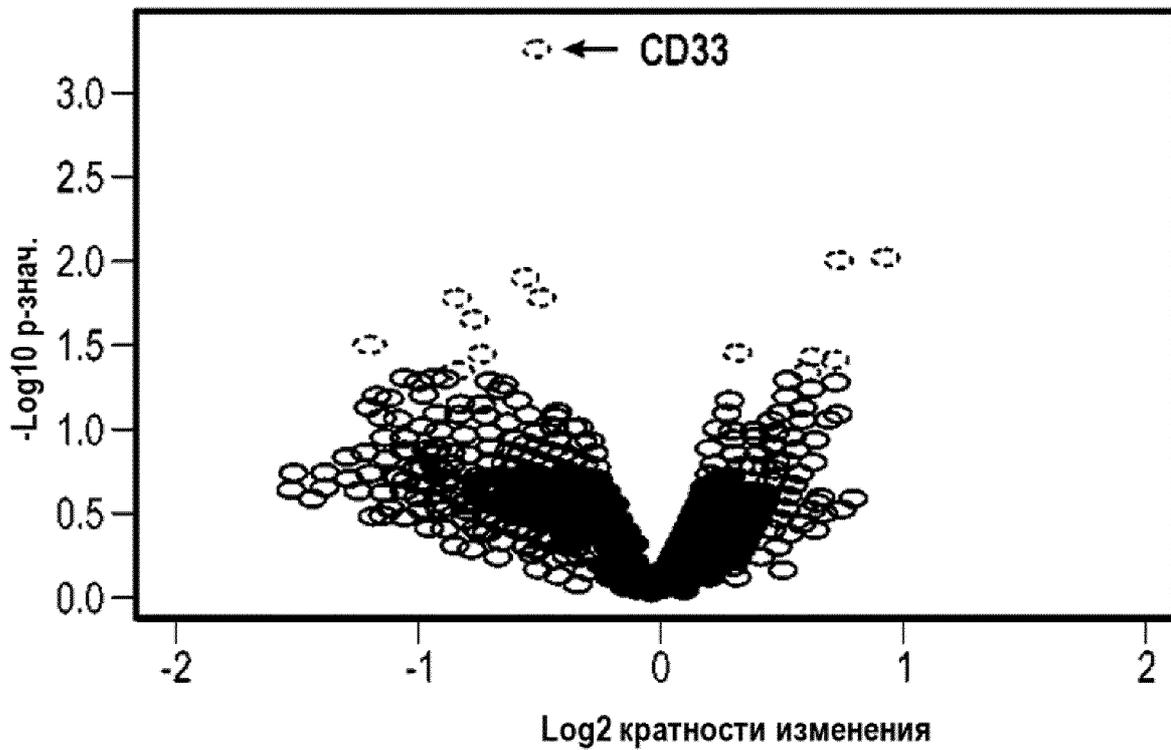
SIGLEC9



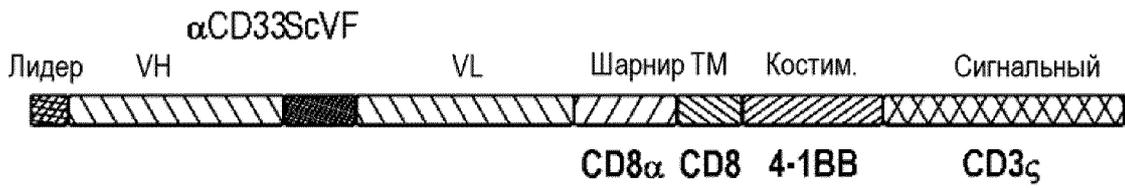
ФИГ. 21В



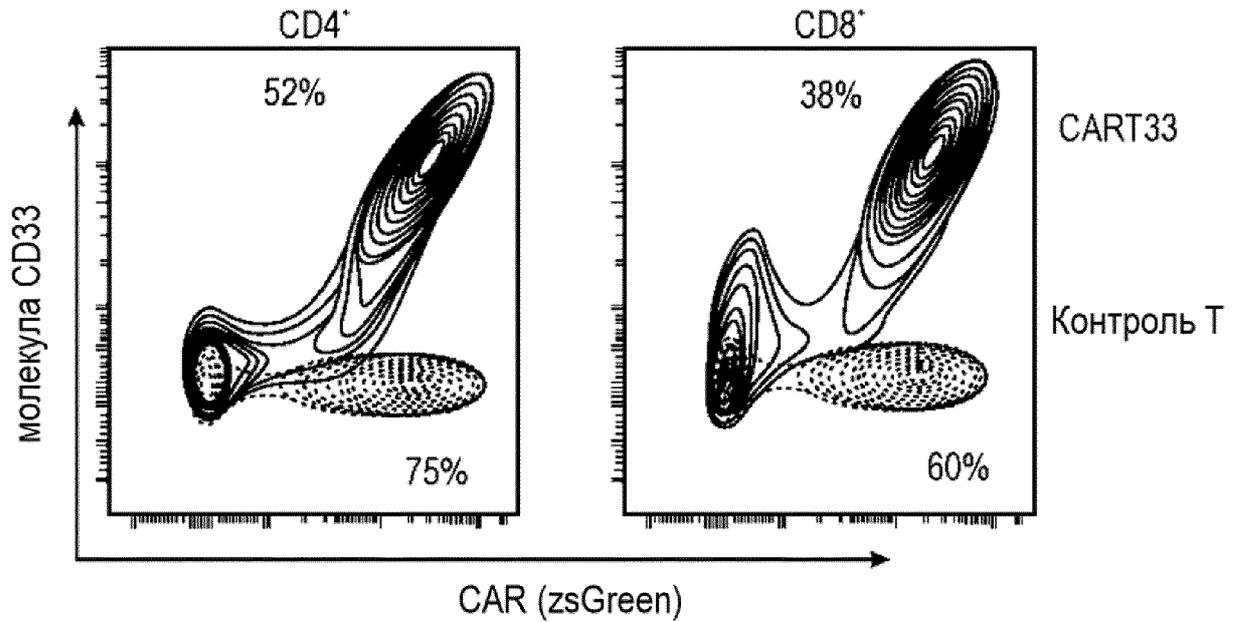
ФИГ. 21С



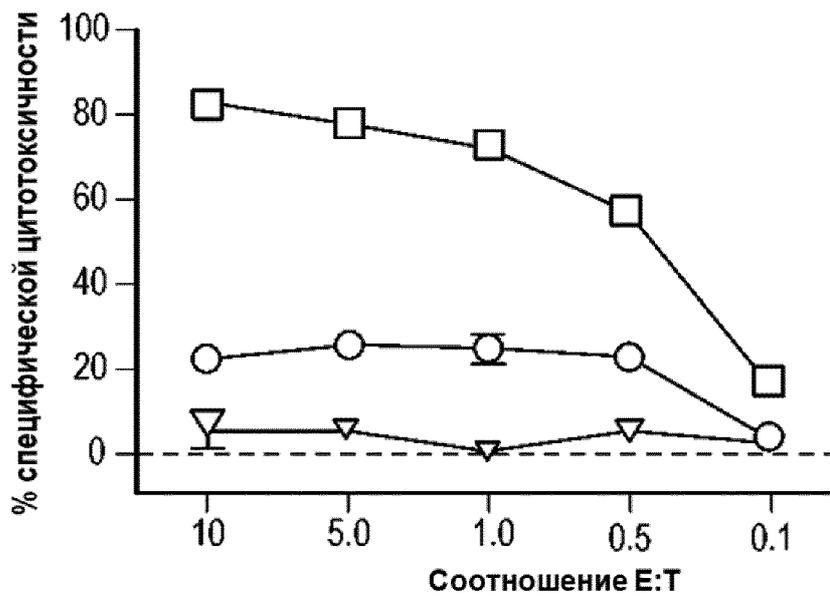
ФИГ. 21D



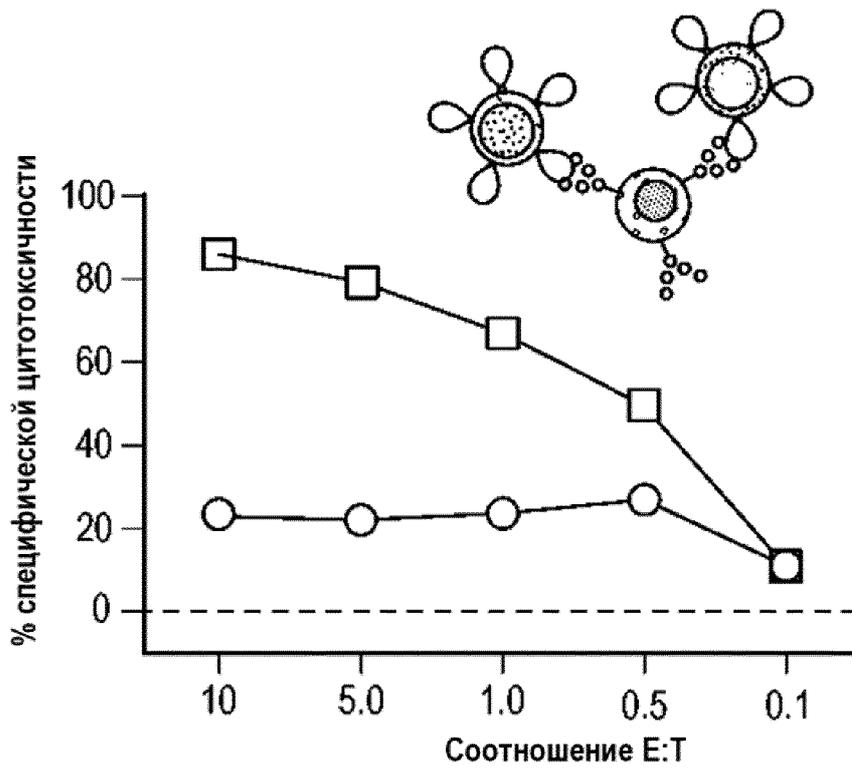
ФИГ. 22А



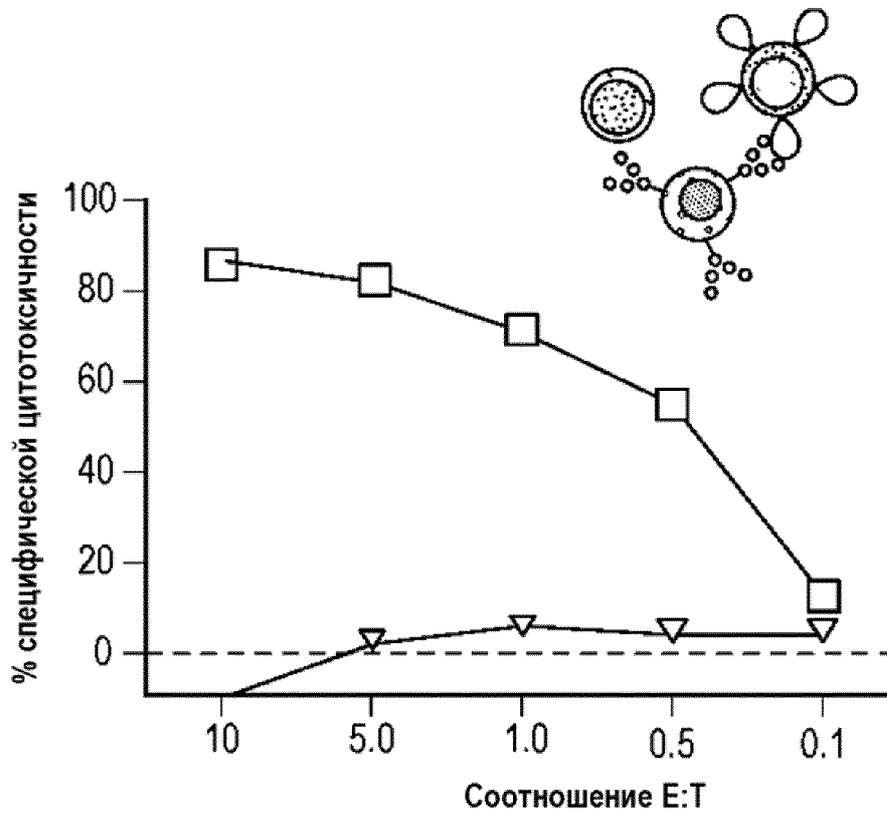
ФИГ. 22В



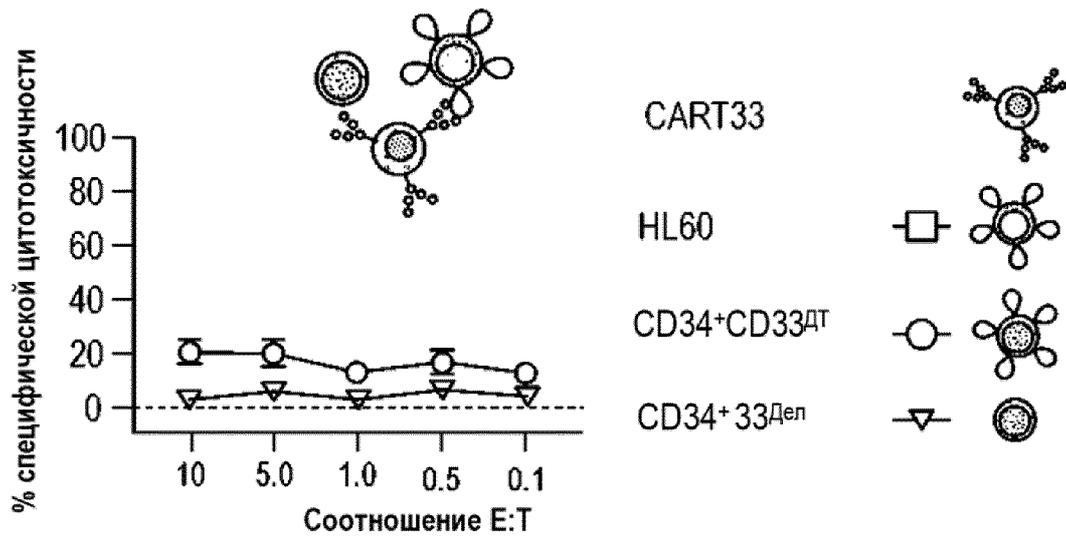
ФИГ. 22С



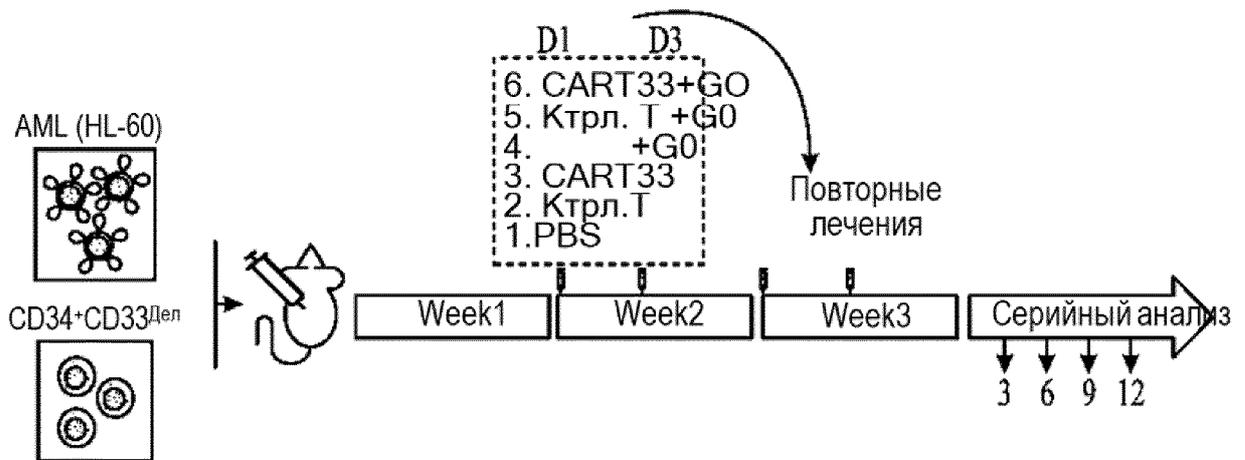
ФИГ. 22D



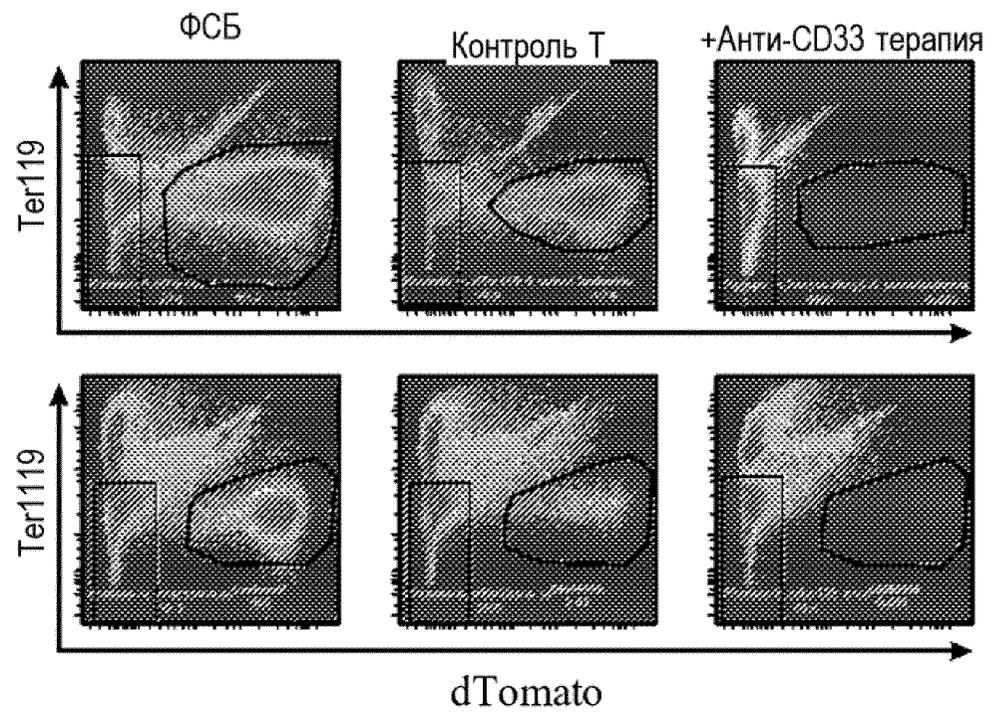
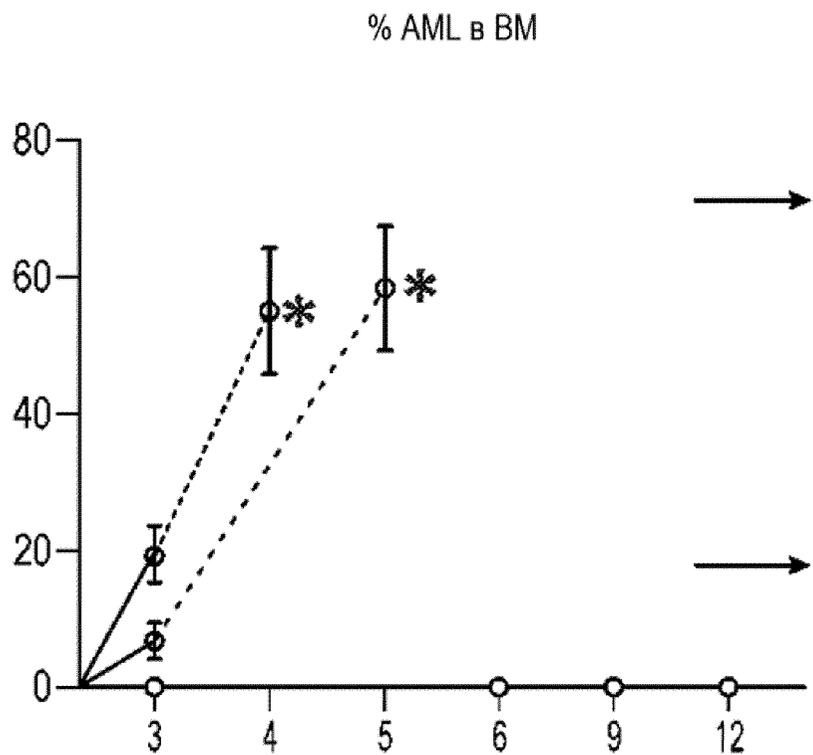
ФИГ. 22E



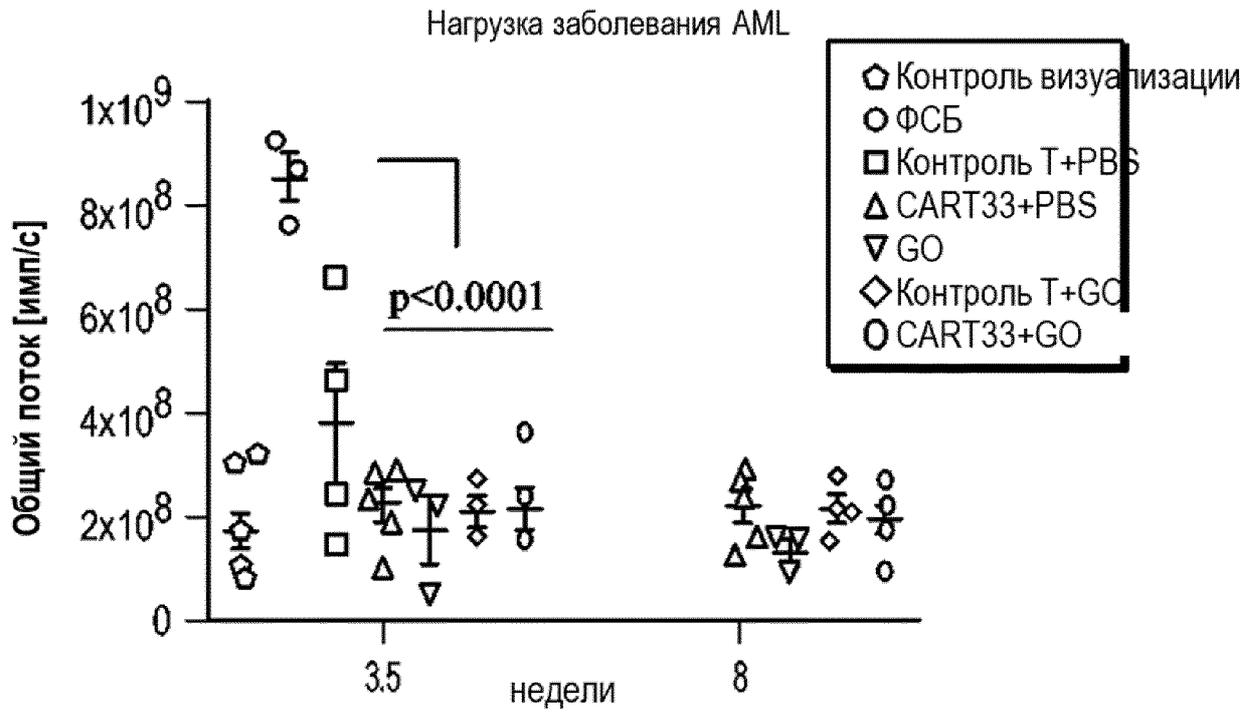
ФИГ. 22F



ФИГ. 23А

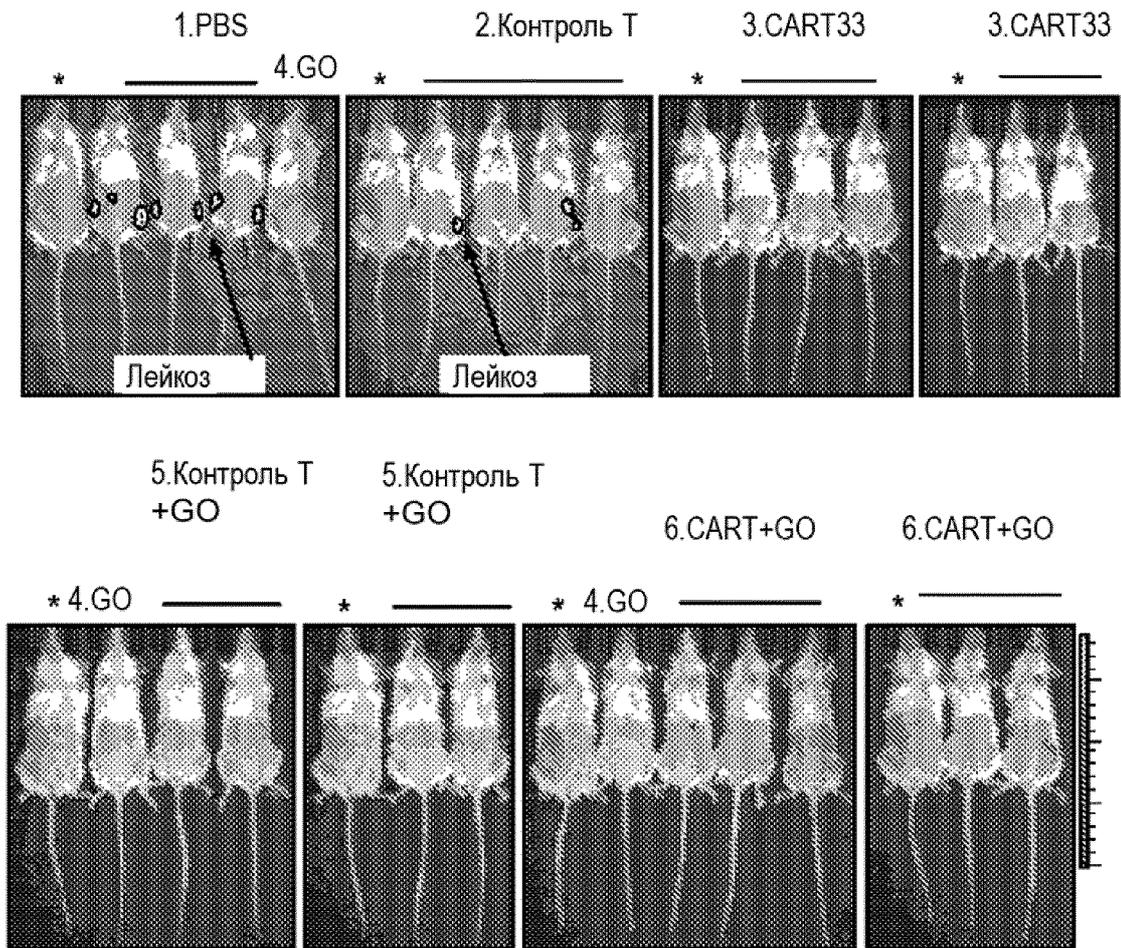


ФИГ. 23В



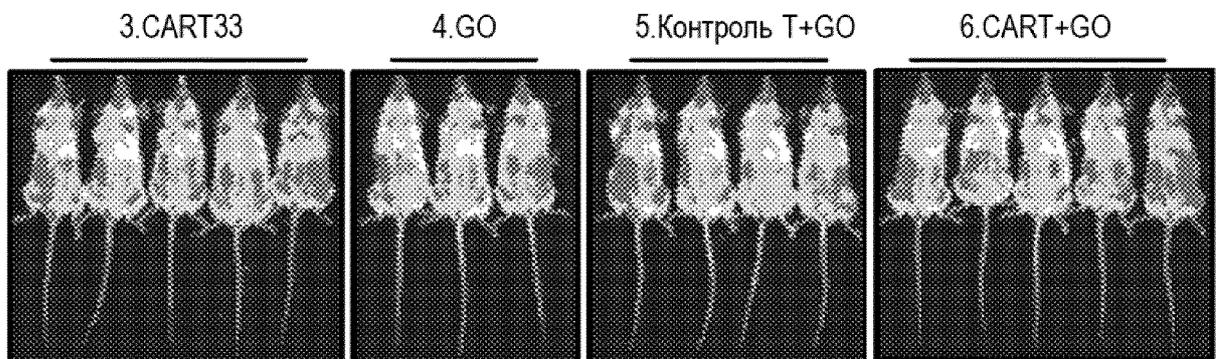
ФИГ. 23С

Визуализация на 3,5 недели

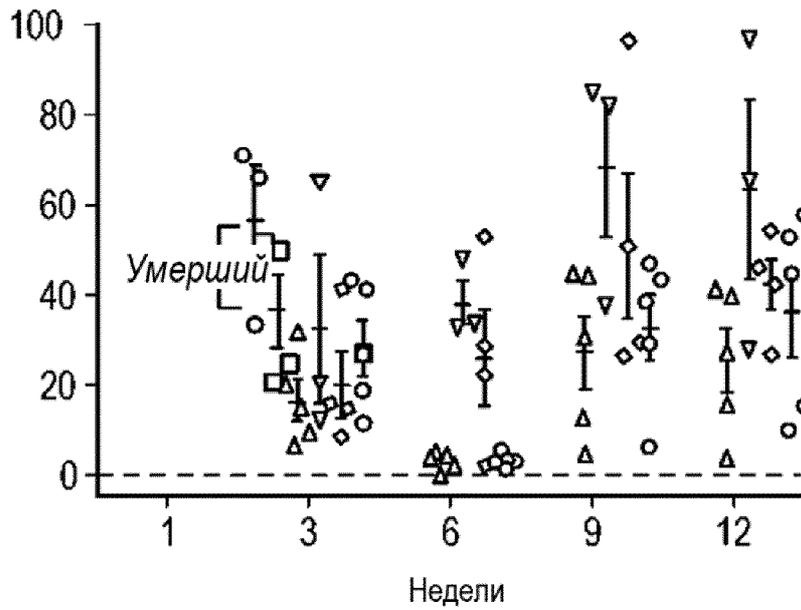


ФИГ. 23D

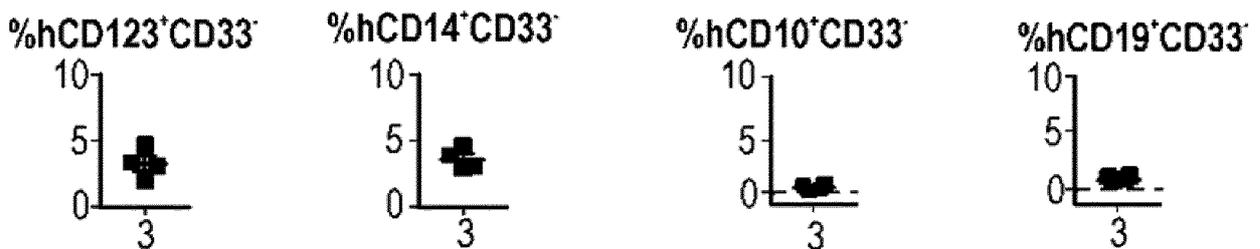
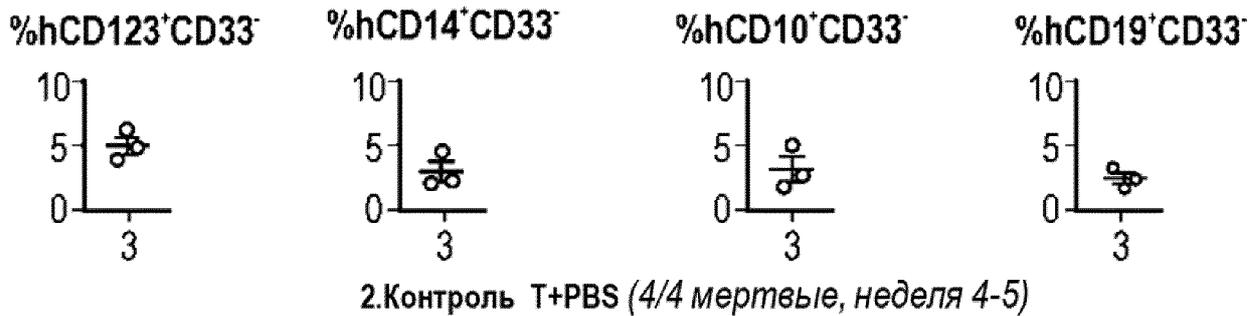
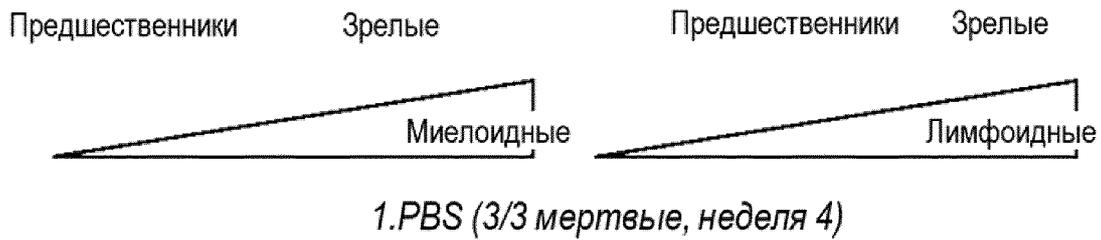
Визуализация на 8 недели



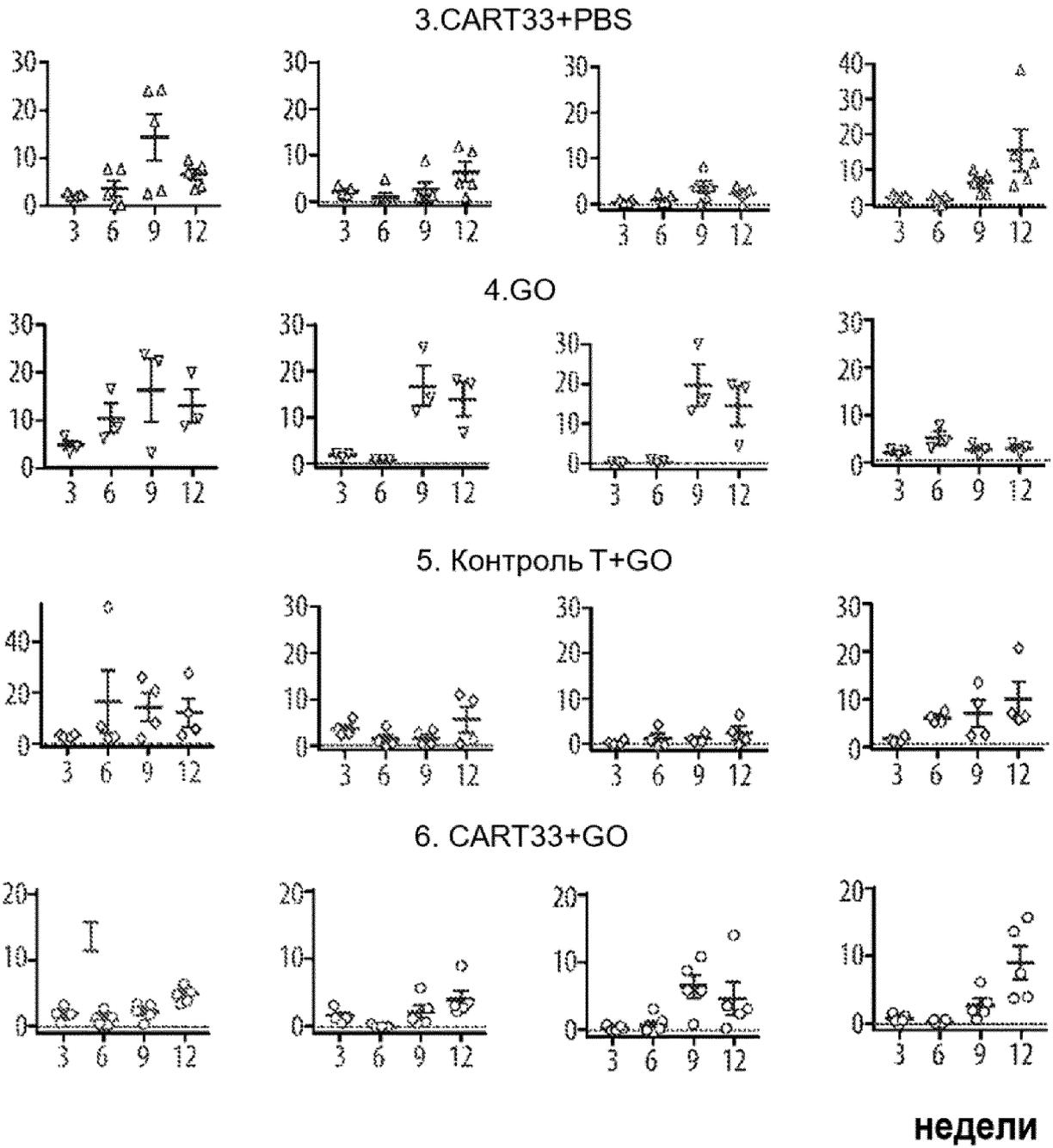
ФИГ. 23E



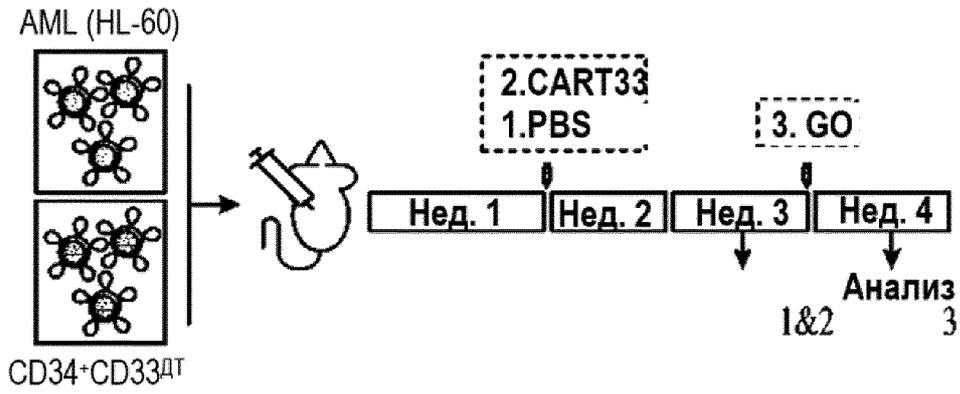
ФИГ. 23F



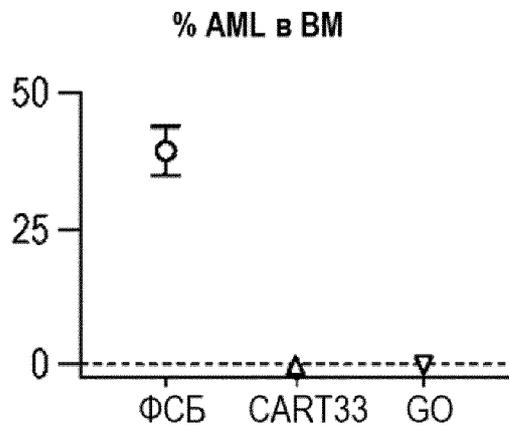
ФИГ. 24А



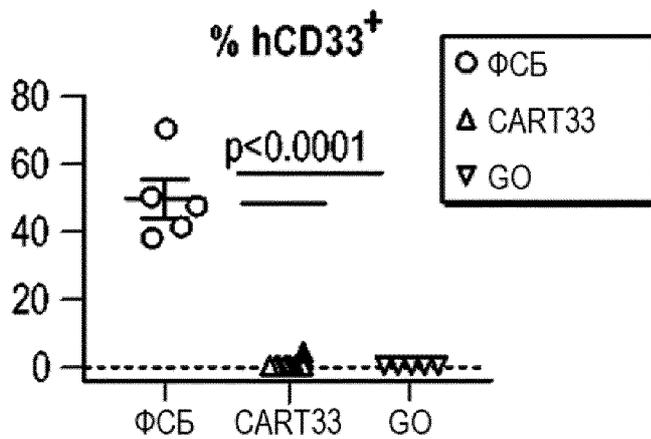
ФИГ. 24А (продолжение)



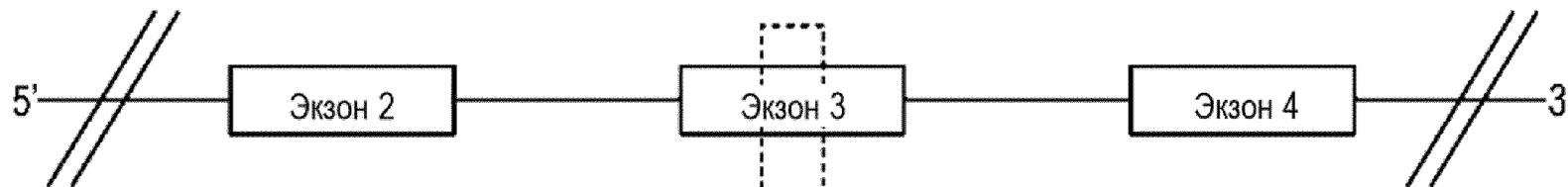
ФИГ. 24В



ФИГ. 24С



ФИГ. 24D



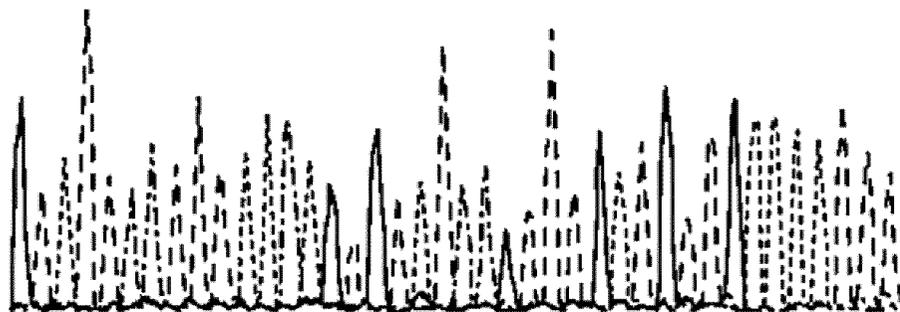
5' - TCATCCCTGGCACTCTAGAACCCGGCCACTC-3'
 3' - AGTAGGGACCGTGAGATCTTGGGCGGTGAG-5'

РАМ

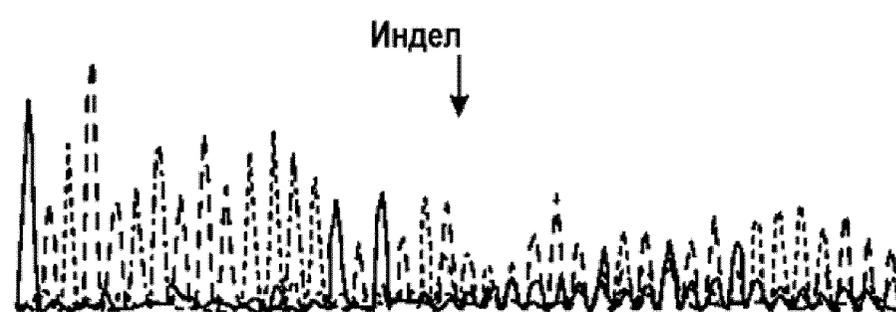
Направляющая РНК

180 190 200 210
 AGTGGCCGGGTTCCTAGAGTGCCAGGGATGAGGATTTGGG

180 190 200 210
 AGTGGCCGGGTTCCTAGAGTGCCGGGGATGAGGATTTGGG

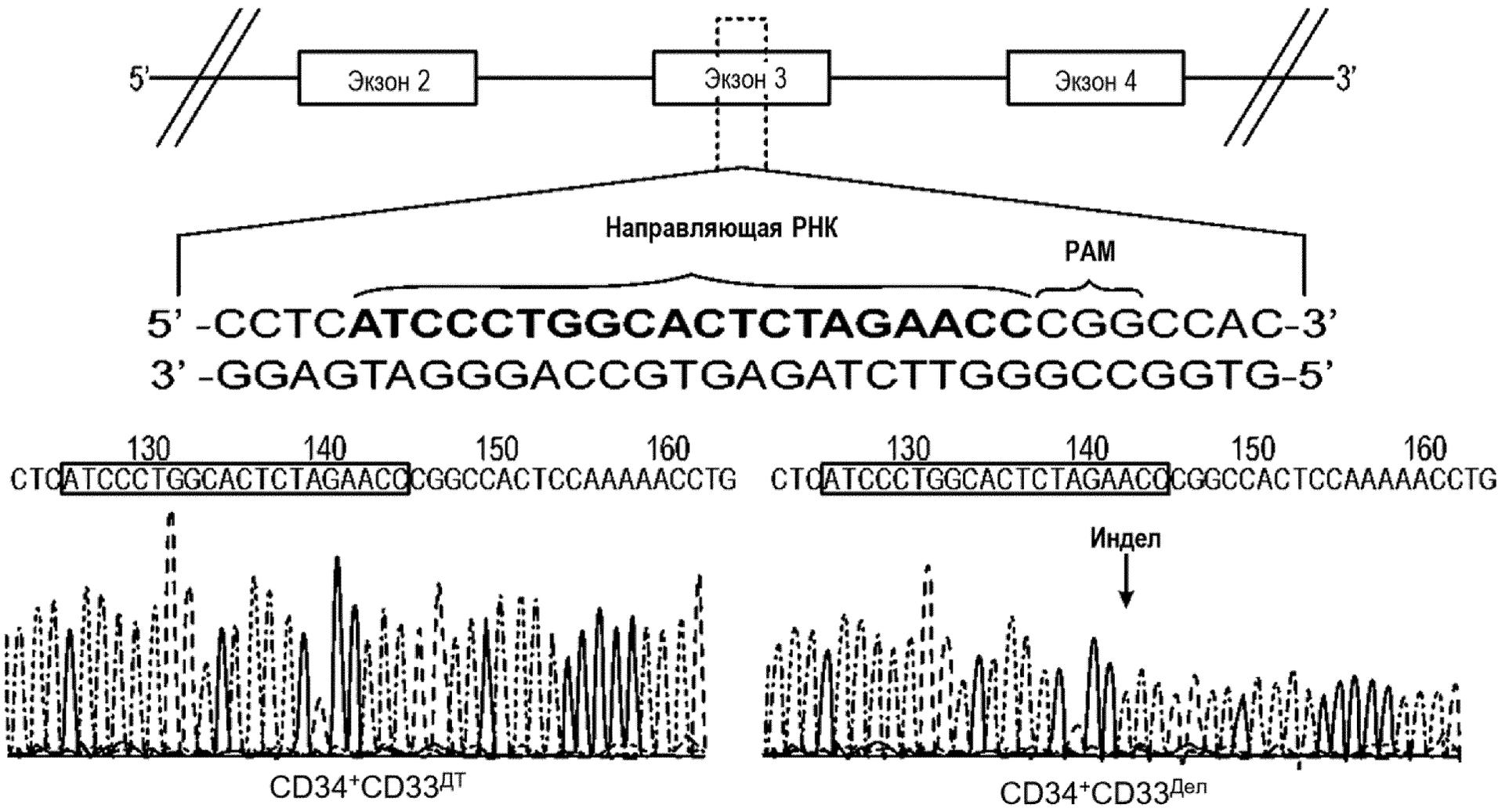


CD34⁺CD33ДТ

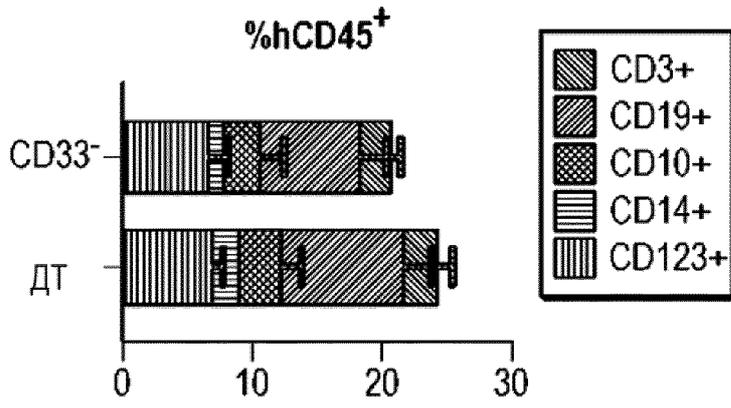


CD34⁺CD33Деп

ФИГ. 25А

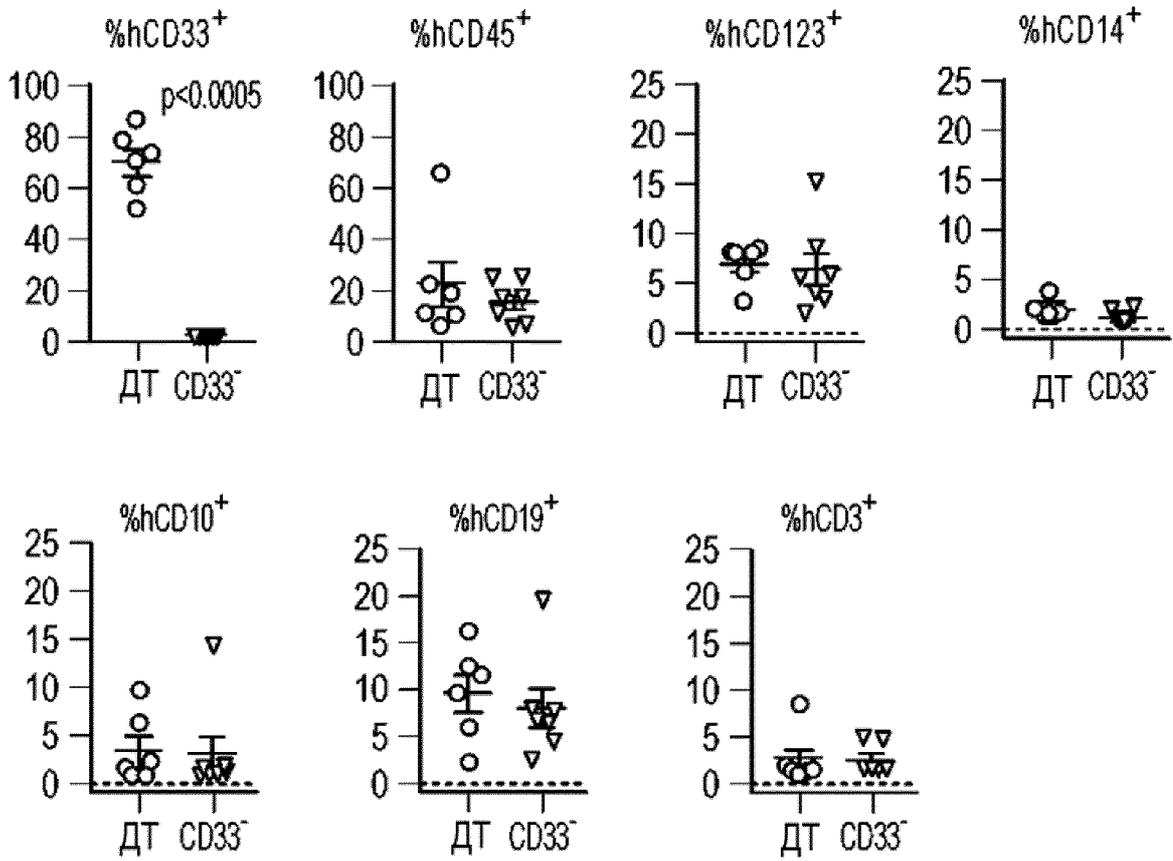


ФИГ. 25В



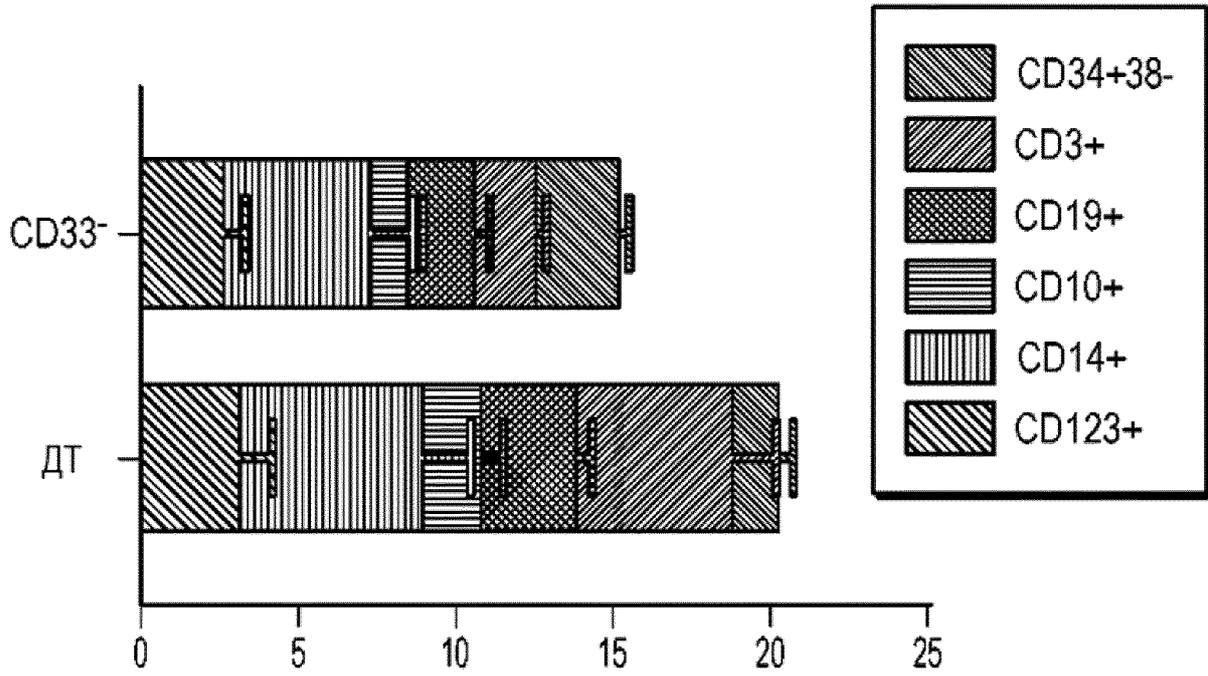
Клетки CD34⁺CD33^{Del} костного мозга

Аспират костного мозга на 15 неделе

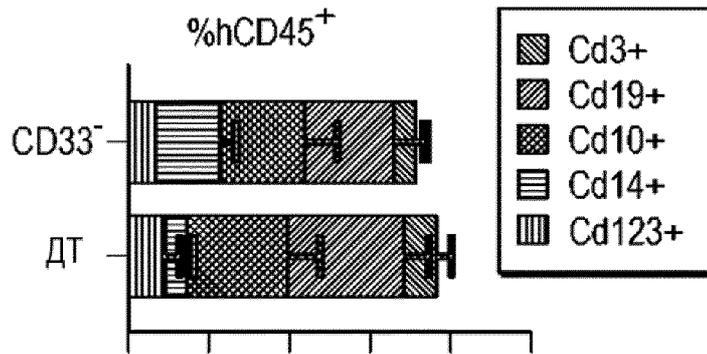


ФИГ. 26А

Цельный костный мозг, 21 неделя после трансплантации % hCD45+

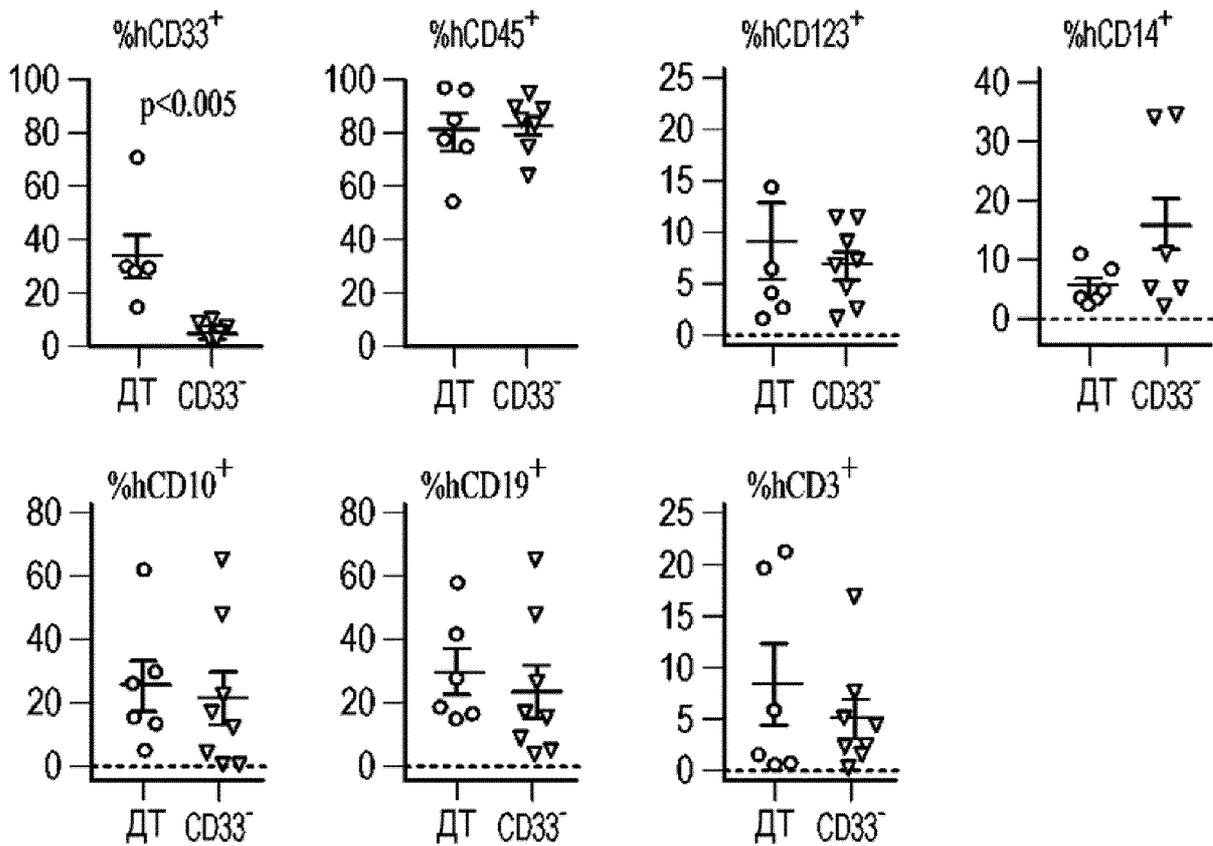


ФИГ. 26В

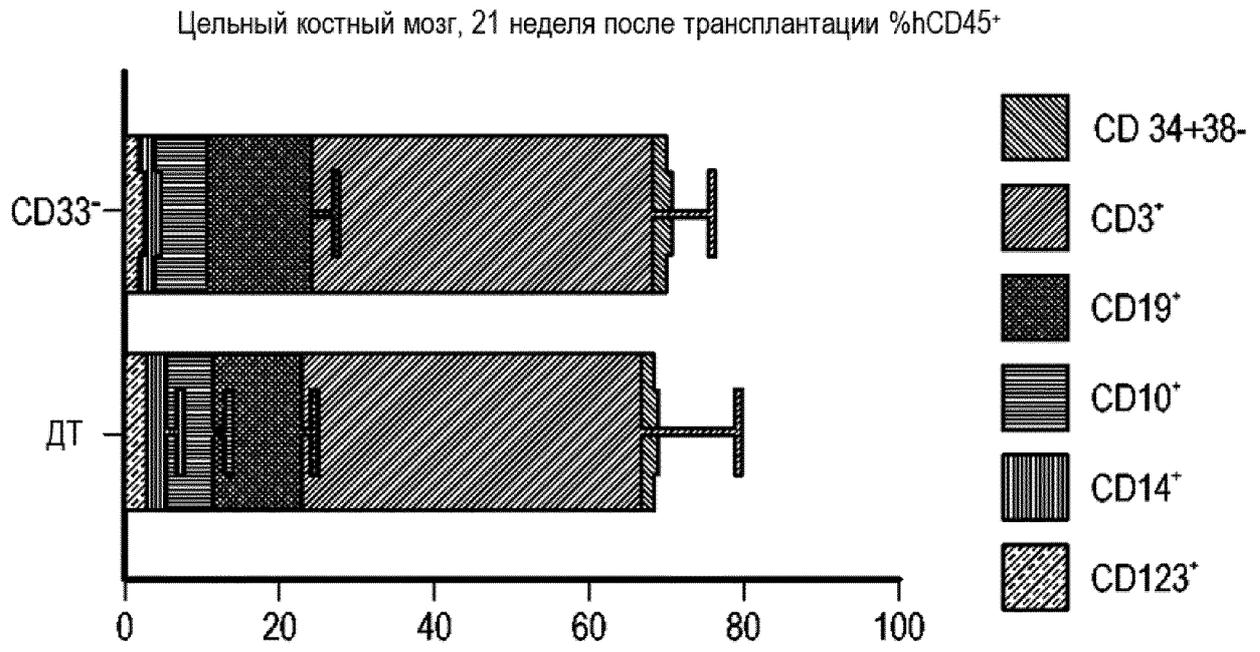


Клетки CD34⁺CD33^{Дел} пуповинной крови

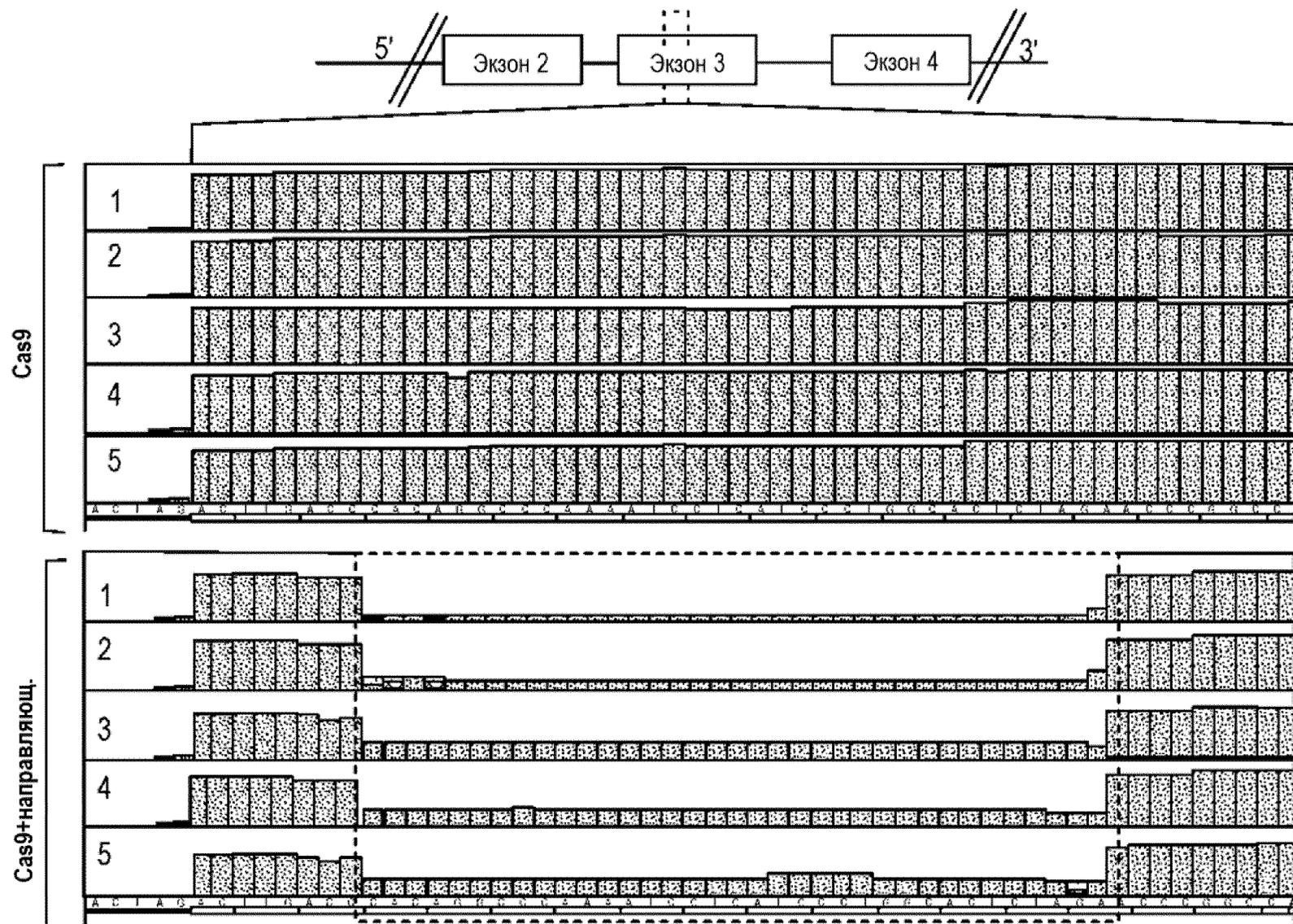
Аспират костного мозга на 16 неделе



ФИГ. 26С



ФИГ. 26D



ФИГ. 27

	Cas9			Cas9+онПНК		
Всего чтений PF	629,724,054			659,744,702		
Процент оснований Q30	93.46%			93.43%		
	SNV	Вставка s	Делеция s	SNV	Вставка s	Делеция s
Обобщенные данные о небольших вариантах						
Всего пропущено	3,743,12			3,744,33		
	6	401,796	418,883	1	401,386	418,187
Процент обнаружения по dbSNP	94.24%	85.75%	86.70%	94.25%	85.82%	86.89%
Соотнош. Het/Hom	1.613	2.008	2.358	1.614	2	2.343
Соотнош. Ts/TV	2.063	-	-	2.063	-	-
Вариантов по результатам						
Сдвиги рамки	-	58	67	-	57	67
Несинонимичные	10,248	144	192	10,300	157	191
Синонимичные	11,638	-	-	11,625	-	-
Стоп-мутация	77	6	0	77	6	0
Потеря стоп-кодона	19	0	1	19	0	1

ФИГ. 28

НЕЦЕЛЕВОЙ САЙТ	НЕСОВПАДЕНИЯ	ХРОМОСОМА	САЙТ РАЗРЕЗАНИЯ	ПАМ	ГЕН	Индел ы
ATCCCTGGCACTCAGGAGCC	3	хрм9	129 640 094	AGG	ASB6	Нет
AACCCTGGCTCTCTAAAACC	3	хрм12	112 995 250	AGG	RP1-71H24_1	Нет
ATCCCTGGCACCCCTGGCACC	3	хрм14	99 627 517	TGG		Нет
ATCCCTGGCACTCCAGGGCC	3	хрм17	9 253 589	TGG	STX8	Нет
AGCCCTGGCAGTCTGGAACC	3	хрм8	52 941 254	TGG		Нет
ATCCCAGGCCCTCTATAACC	3	хрм1	236 691 946	TGG	ACTN2	Нет
ATCCATGGTACTCTGGAACC	3	хрм22	35 609 583	AGG	MB	Нет
AACCCAGGCACTCTAGCACC	3	хрм2	203 480 837	AGG	RAPH1	Нет
ACCCCTAGCACTCTAGAGCC	3	хрм1	26 560 691	AGG	RPS6KA1	Нет
ACCCCTGGCAGTCTAGAGCC	3	хрм4	25 435 756	AGG		Нет
ATCCCTGACACTCTGGGACC	3	хрм12	3 595 172	TGG		Нет
AGCCCTCGCACTCTGGAACC	3	хрм14	74 598 895	AGG	LTBP2	Нет
ATCTCTGGCAGACTAGAACC	3	хрм5	94 207 405	AGG	KIAA0825	Нет
ACCCCTGACACTCTAGAAAG	4	хрм16	57 399 318	AGG		Нет
ATCCCTGGCACACTGGGCCCC	4	хрм2	106 853 582	AGG	ST6GAL2	Нет
ATCACTTGTCTCCCTAGAACC	4	хрм9	125 259 035	TGG		Нет
ATCCCTGACCCTCCAGAACA	4	хрм9	131 545 888	TGG	RP11-40A7.2	Нет
ACCCCTGGCTCCCTAGAGCC	4	хрм10	125 810 087	TGG	UROS	Нет
CTGCCTGGCTCTCTAGCACC	4	хрм11	205 054	TGG	BET1L	Нет
GTCTCTTGGCACTCTAGGCCCC	4	хрм11	2 689 716	AGG	KCNQ1	Нет

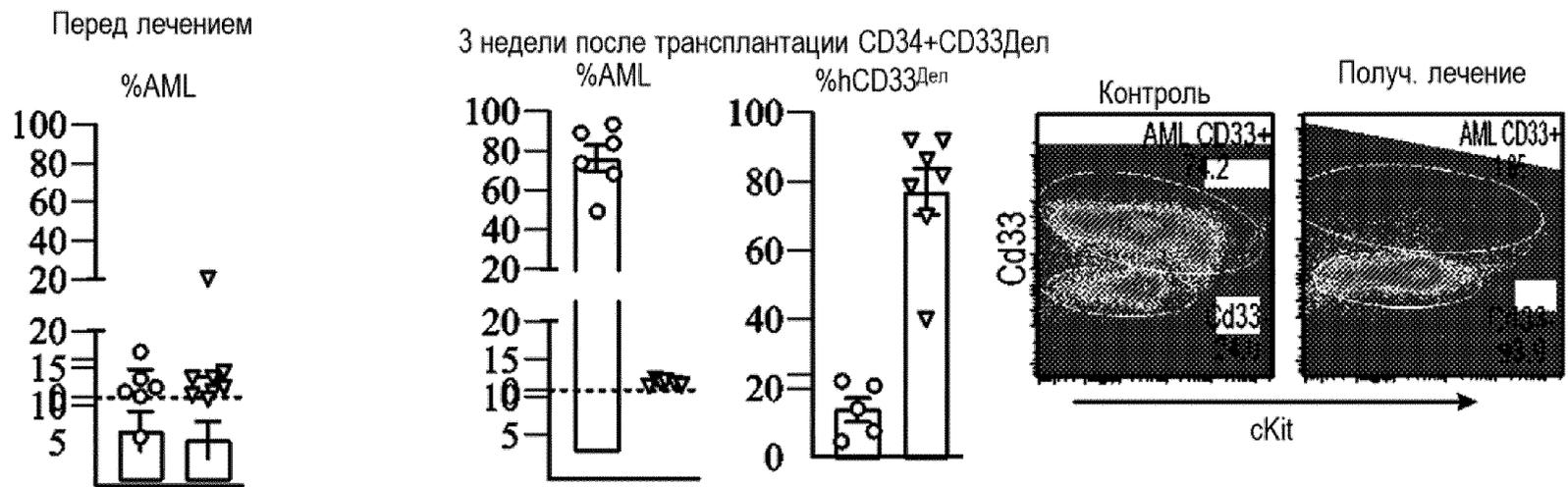
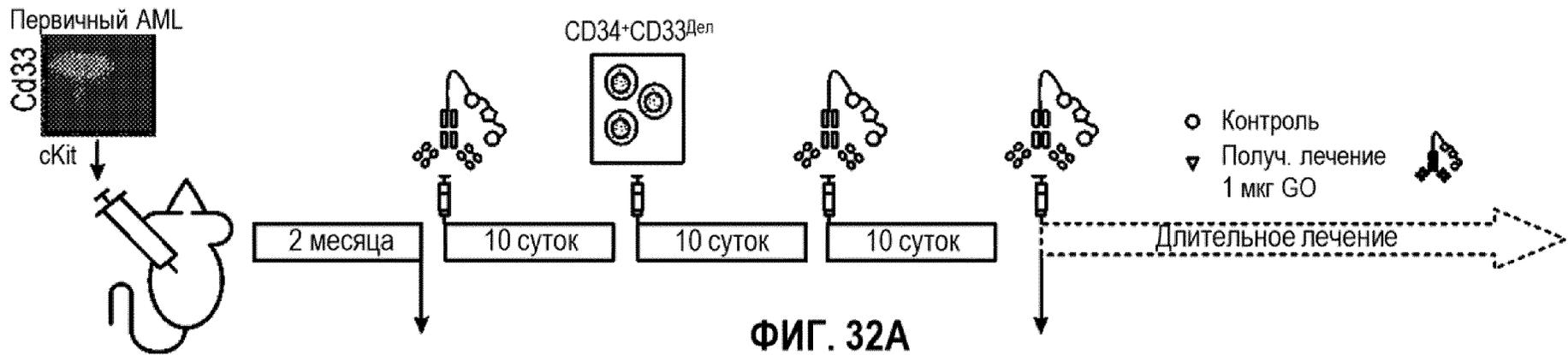
ФИГ. 29

НЕЦЕЛЕВОЙ САЙТ	НЕСОВПАДЕНИЯ	ХРОМОСОМА	САЙТ РАЗРЕЗАНИЯ	РАМ	ГЕН	Инделлы
ССТСАСААГАТТАГАССАС	3	хрм12	86 341 556	TGG	MGAT4C	Нет
ТСТСАСТГГССТТГАССАС	3	хрм9	134 687 890	TGG	COL5A1	Нет
ССТСАСТГГАСТТГАСТСАГ	3	хрм1	209 621 235	GGG	LAMB3	Нет
ССТСАСТГГАСААГАССАС	3	хрм12	19 574 394	TGG	AEBP2	Нет
ССТСАСТАГАСТАГАТССАТ	3	хрм9	973 903	TGG		Нет
ССТСГСТАГАССТТАССАС	3	хрм7	157 876 963	AGG	PTPRN2	Нет
ССТСАСААГАСААГАССАС	3	хрм8	62 858 829	TGG	NKAIN3	Нет
СТТАССАГССТТГАССАС	3	хрм19	51 125 605	AGG	SIGLEC9	Нет
ССТСАССАГСССТГАССАС	3	хрм19	51 143 004	AGG	SIGLEC7	Нет
СТТАССАГССТТГАССАС	3	хрм19	51 144 414	AGG	SIGLEC7	Нет
ССТСАССАГСССТГАССАС	3	хрм19	51 185 448	AGG	SIGLEC20P	Нет
ССТСАССАГСССТГАССАС	3	хрм19	51 211 800	AGG	SIGLEC22P	Нет
ССТСАССАГСССТГАССАС	3	хрм19	51 501 106	AGG	SIGLEC12	Нет
ССТСАССАГСССТГАССАС	3	хрм19	51 509 057	AGG	SIGLEC27P	Нет
ССТСАССАГСССТГАССАС	3	хрм19	51 530 952	AGG	SIGLEC6	Нет
ТСАСАСТГГССТТГАССАС	4	хрм9	130 997 236	TGG		Нет
ССТТАСТАГАССТССАССАС	4	хрм5	127 098 351	GGG		Нет
ССТСАСААГАТААГАССАС	4	хрм2	223 246 492	TGG		Нет
ССТААСТАГААТТГССАСАС	4	хрм2	228 144 164	AGG	SPHKAP	Нет
ССТСТАТАТАСТТГТССАС	4	хрм1	46 408 719	AGG	FAAH	Нет

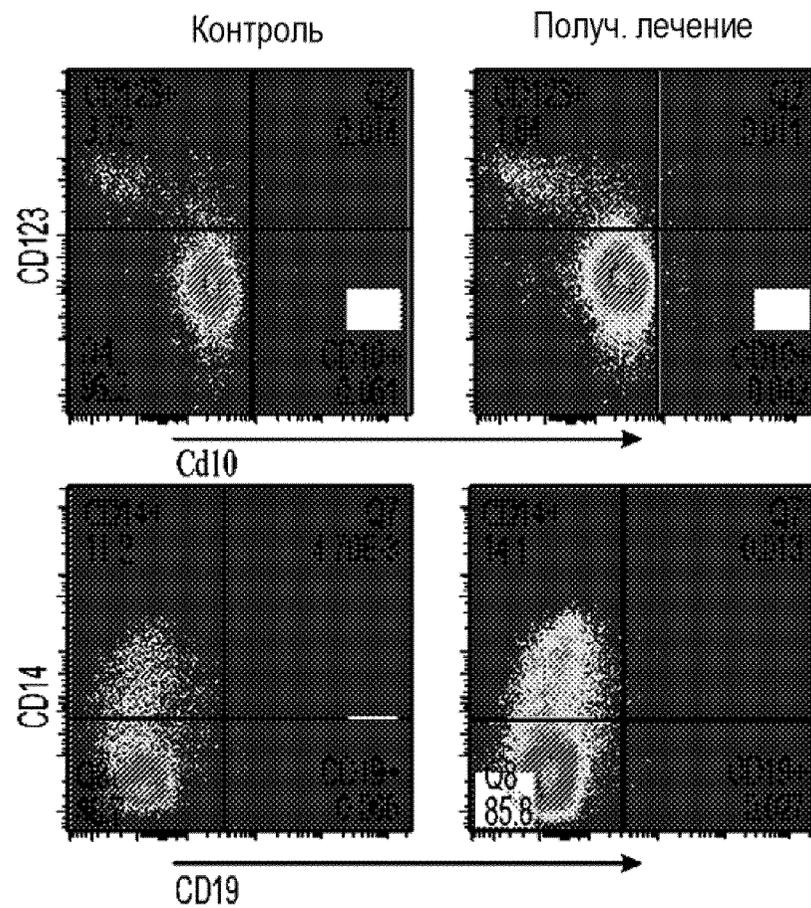
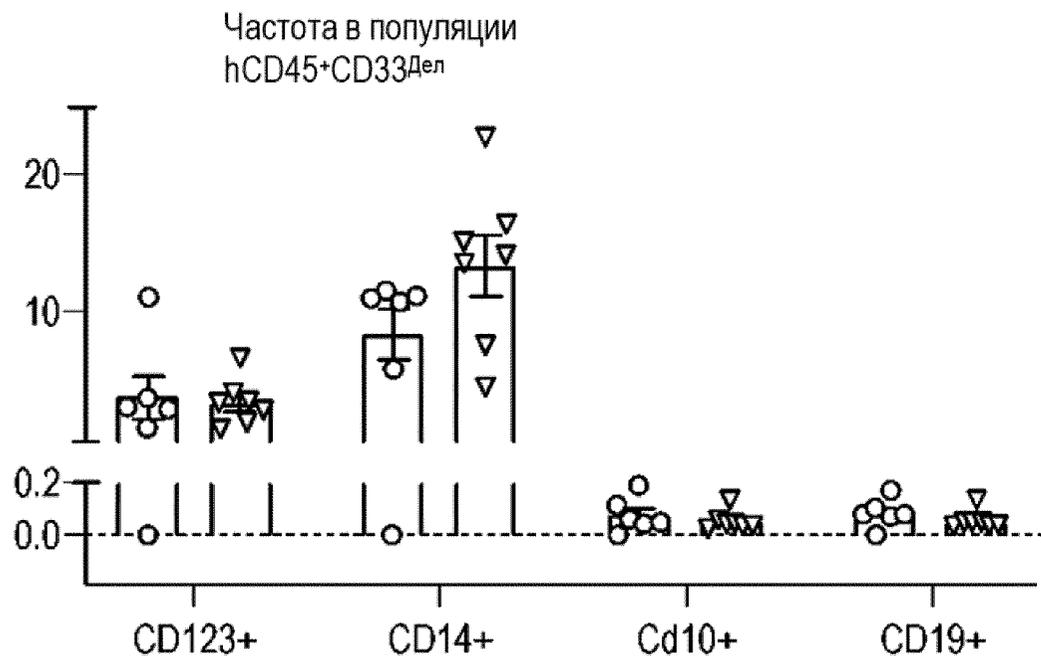
ФИГ. 30

Ген	Log2 кратности	P-знач.	Padj	Внешние характеристики
CD33	-0,837	0,000455048	0,999	Антиген CD33 поверхности миелоид клет
CDON	1,033	0,009579405	0,999	Родств. молекуле адгезии клеток
AC027279.1	0,824	0,01015653	0,999	Некодирующая РНК
LDLR	-0,563	0,012597131	0,999	Рецептор липопротеинов низкой плотности
PRAME	-0,87	0,016800466	0,999	Антиген меланомы, предпочтительно экспресс. в опухолях
INSIG1	-0,494	0,017206864	0,999	Белок индуцируемого инсулином гена 1
HMGB1P31	-0,797	0,022454929	0,999	Некодирующая РНК
AP005019.1	-1,261	0,032232654	0,999	Некодирующая РНК
PCLAF	0,382	0,035486149	0,999	PCNA-ассоциированный фактор: PCLAF
CD22	-0,76	0,03640001	0,999	B-клеточный рецептор CD22
TPTE2	0,712	0,037739962	0,999	Фосфатидилинозит 3,4,5-трифосфат-3-фосфатаза TPTE2
ZNF469	0,811	0,039222723	0,999	Цинк-пальцевый белок 469
SVOPL	-0,867	0,04599215	0,999	Предполагаемый транспортер SVOPL
FFAR4	0,678	0,046205968	0,999	Рецептор 4 свободных жирных кислот

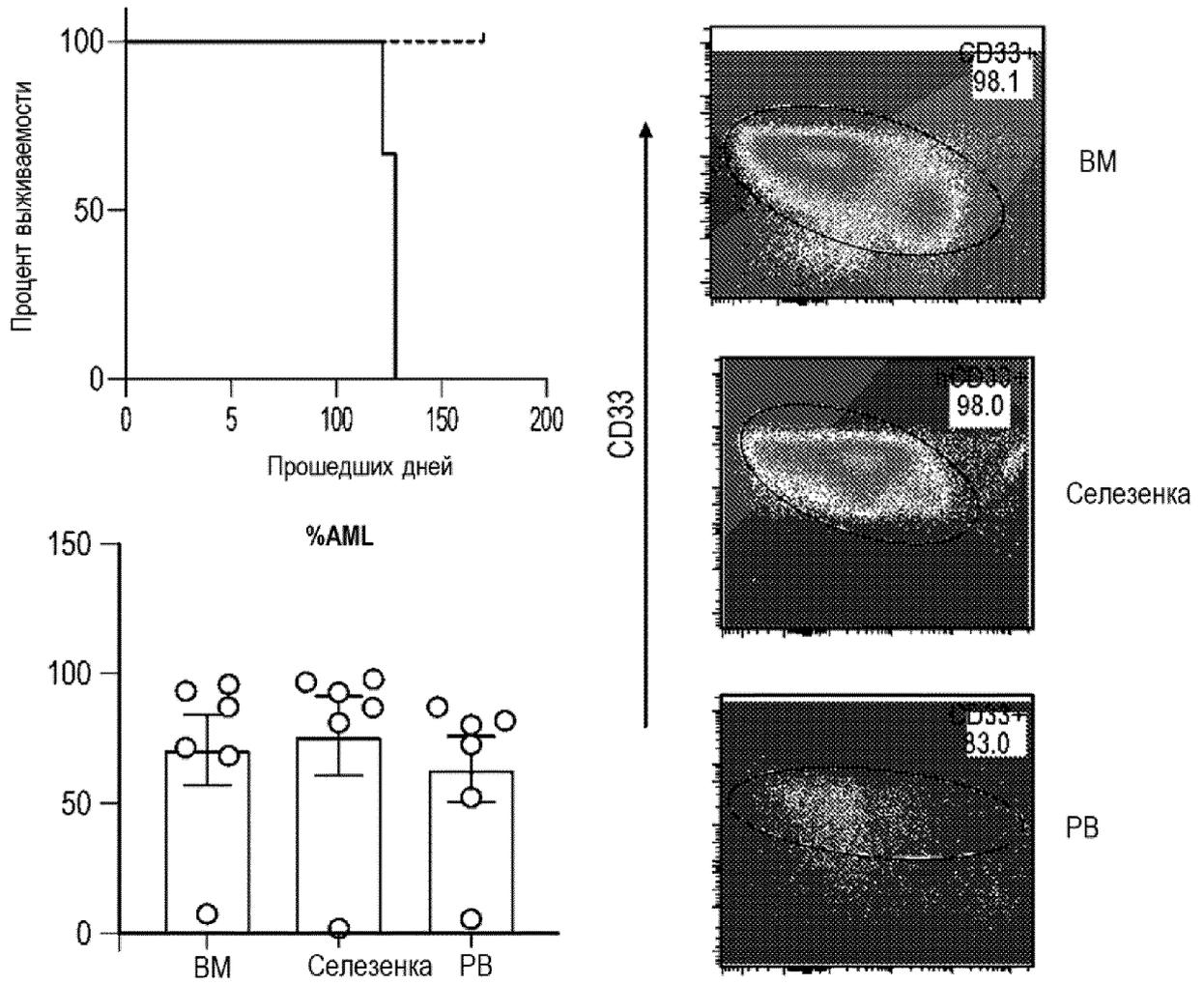
ФИГ. 31



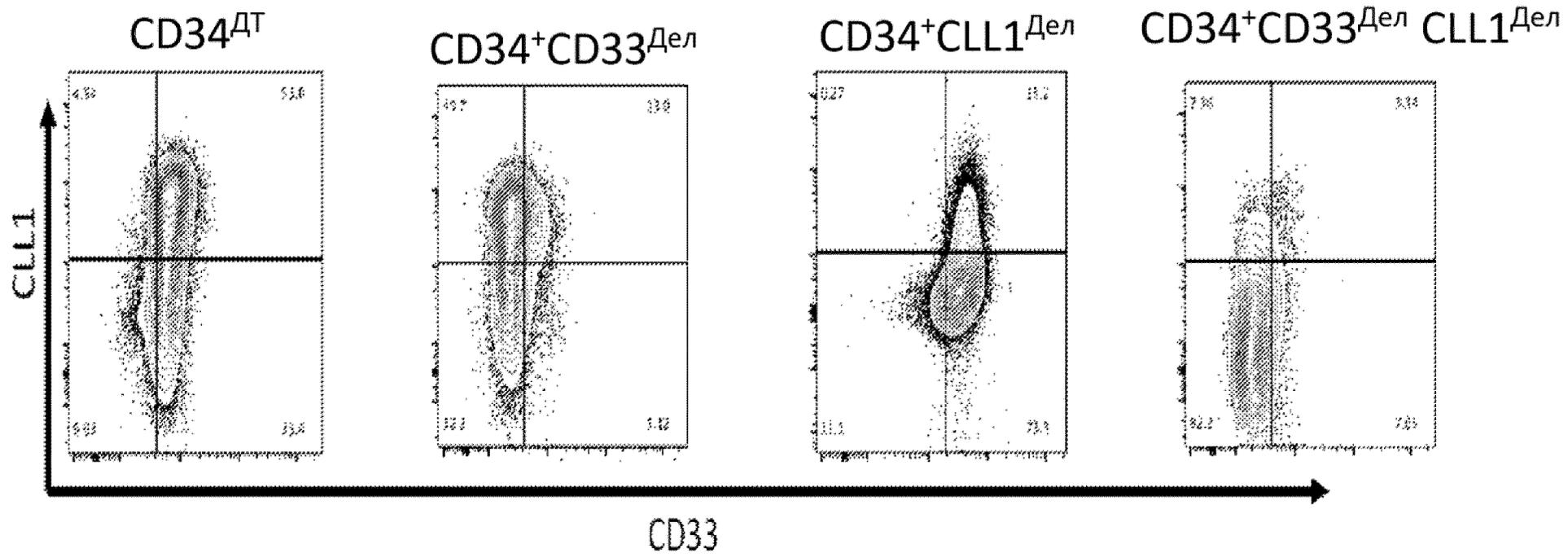
ФИГ. 32В



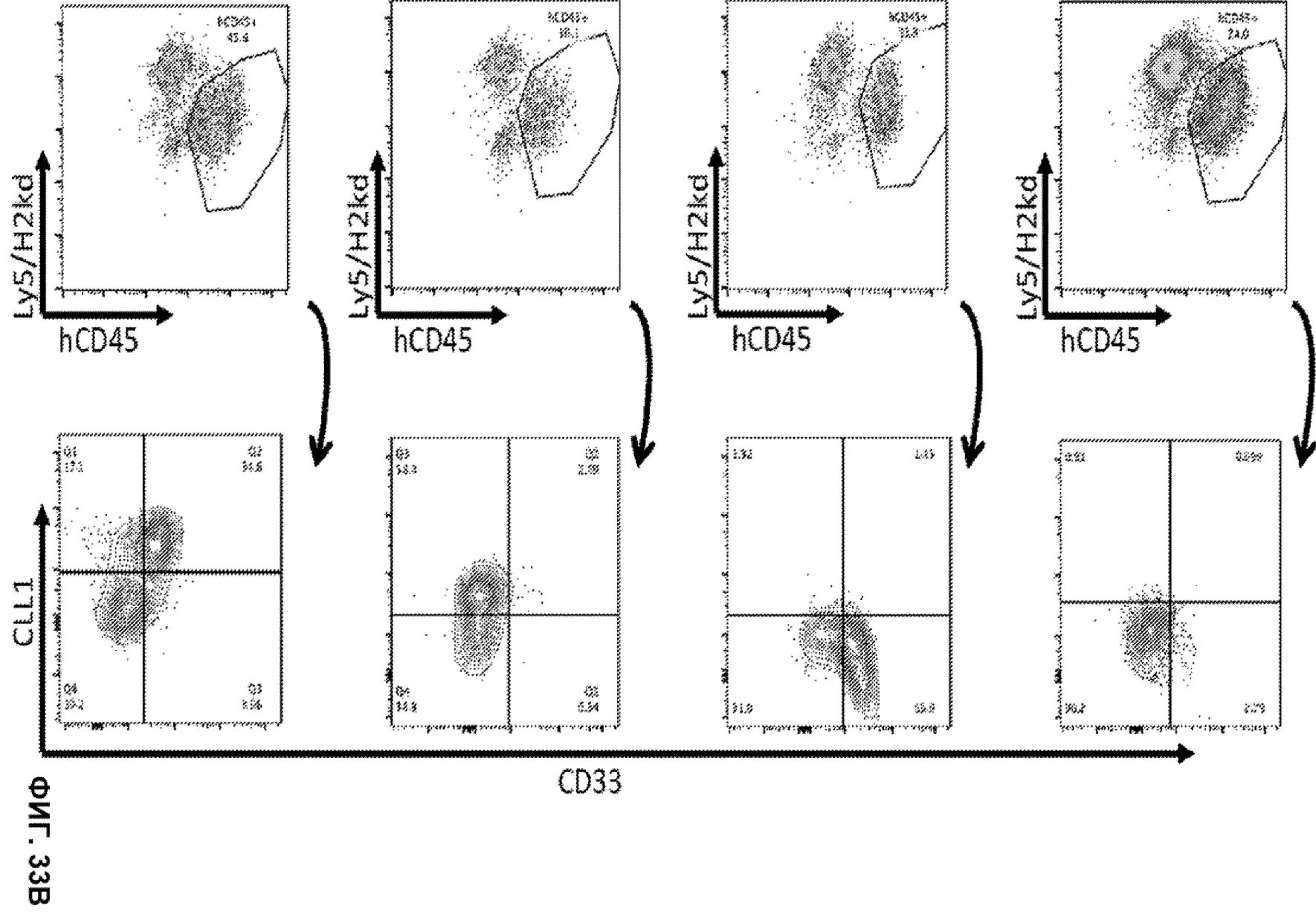
ФИГ. 32В (продолжение)

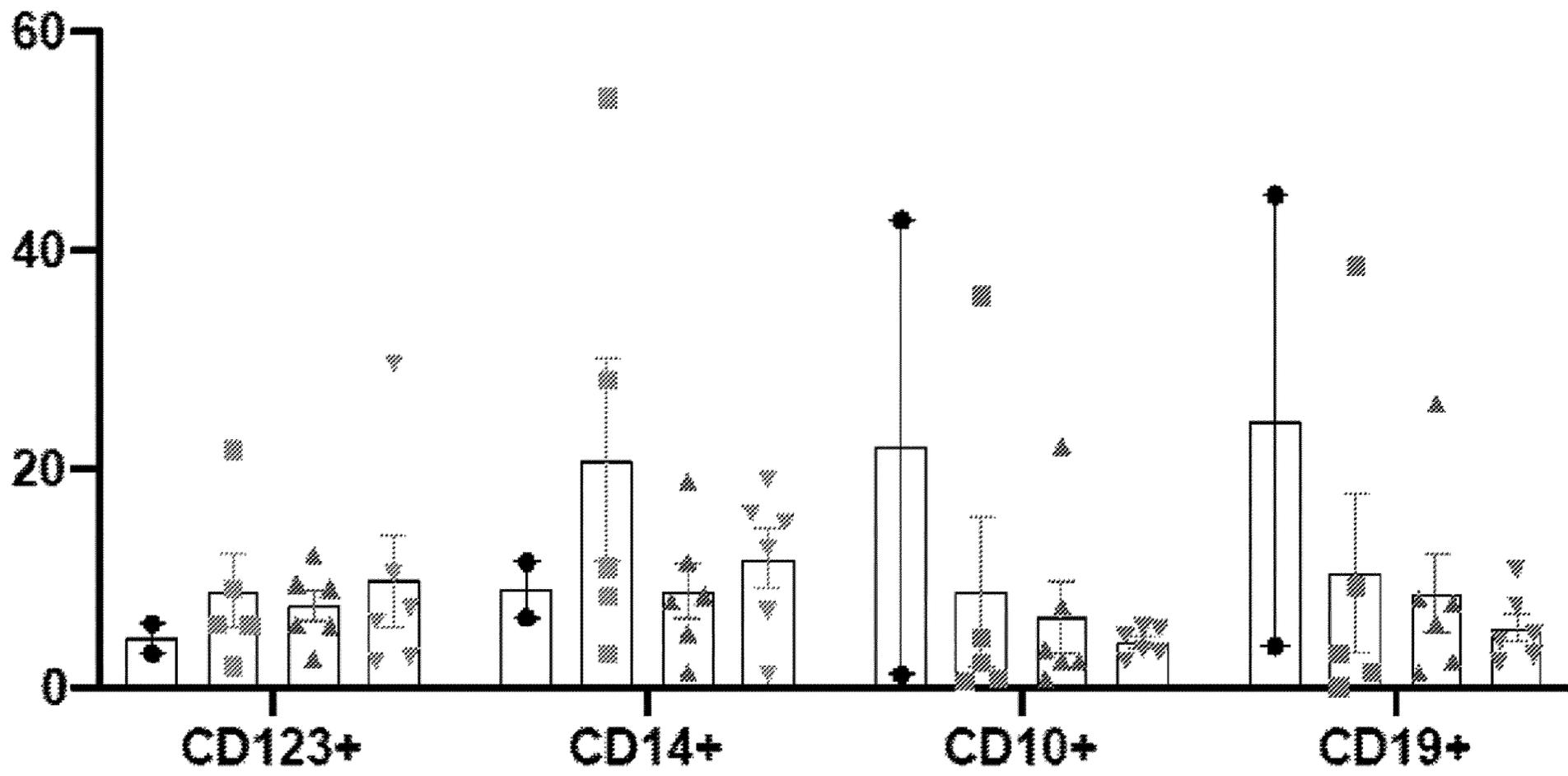


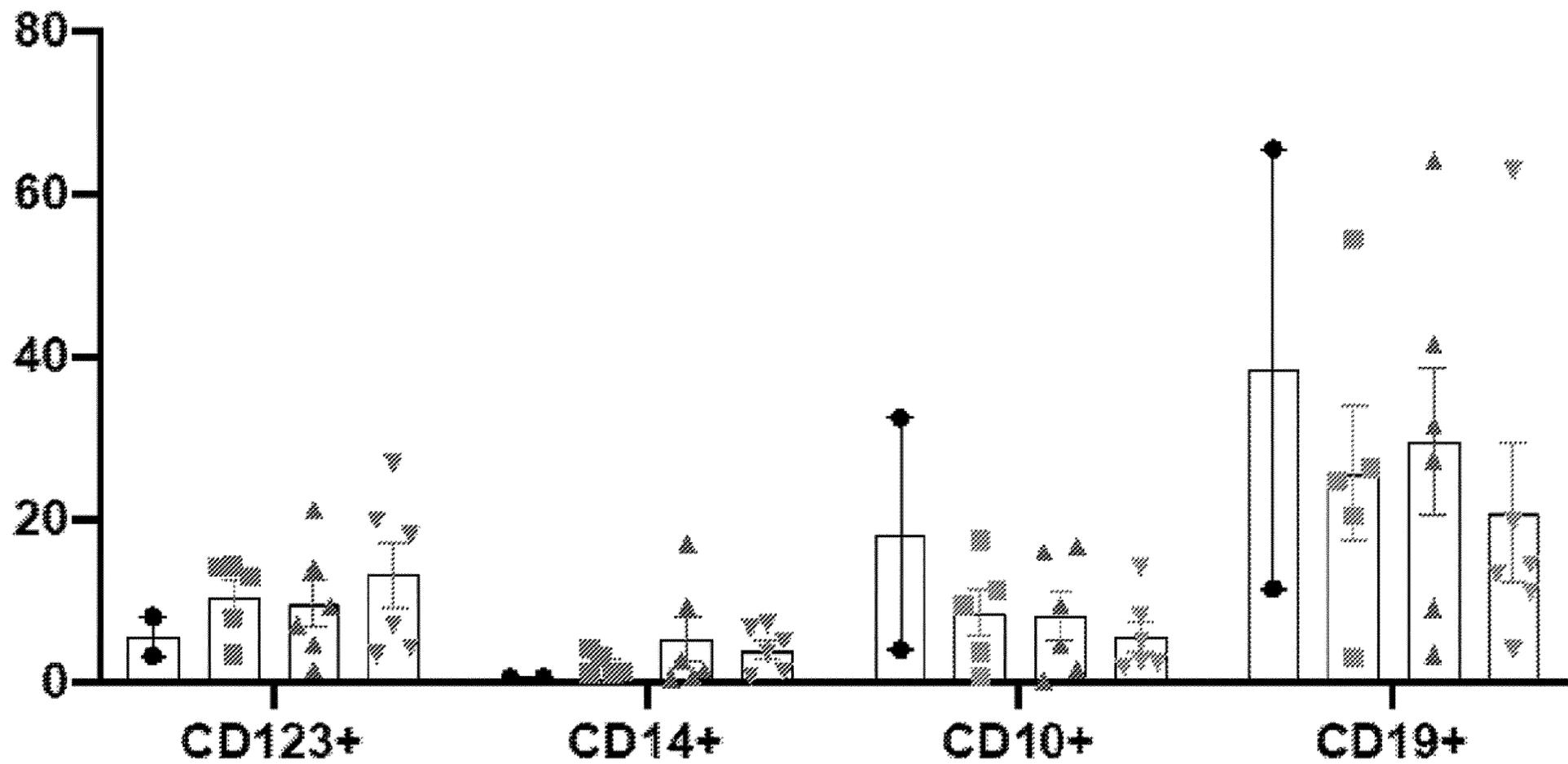
ФИГ. 32С



ФИГ. 33А







ФИГ. 33Д