

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192931** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.22

(51) Int. Cl. *C12N 15/11* (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.04.29

**(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ
ГЕМОГЛОБИНОПАТИИ**

(31) PCT/CN2019/085116

(32) 2019.04.30

(33) CN

(86) PCT/CN2020/087766

(87) WO 2020/221291 2020.11.05

(71) Заявитель:
ЭДИДЖЕН ИНК. (CN)

(72) Изобретатель:

Фан Жиго, Юй Линлин, Ян Хуэйхуэй
(CN)

(74) Представитель:

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

(57) Изобретение относится к способу лечения гемоглобинопатии у индивидуума, включающему (a) этап оценки, включающий оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC (гемопоэтические стволовые клетки) первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A; и (b) этап лечения, включающий введение второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC индивидууму, где модифицированные CD34-положительные HSPC происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A. В то же время изобретение также относится к способу лечения гемоглобинопатии у индивидуумов, способу отбора индивидуумов, страдающих гемоглобинопатией, для лечения второй популяцией модифицированных CD34-положительных HSPC и способу определения того, подходит или не подходит индивидуум, страдающий от гемоглобинопатии, для лечения второй популяцией модифицированных CD34-положительных HSPC, полученных от индивидуума и модифицированных для снижения функции BCL11A.

A1

202192931

202192931

A1

СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНОПАТИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с патентной заявкой PCT/CN2019/085116, поданной 30 апреля 2019 г., содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФОРМАТЕ ASCII

Перечень последовательностей, связанный с настоящей заявкой, представлен в текстовом формате ASCII, и в настоящем документе включен посредством ссылки во всем объеме: машинно-читаемая форма (CRF), содержащая перечень последовательностей (имя файла: FD00222PCT-PD01017-Sequence list_ST25, дата создания 22 апреля 2020 г., размер 11 КБ).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к сопутствующему способу прогнозирования для прогнозирования эффективности технологии редактирования генов при лечении гемоглобинопатии. В способе прогнозирования по настоящему изобретению CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки пациента выделяют перед лечением болезни, применяя технологию редактирования генов для разрушения сайтов эритроидных энхансеров BCL11A, и прогнозируя заранее эффективность лечения гемоглобинопатии с помощью редактируемых генами эритроидных энхансеров BCL11A путем оценки степени повышения экспрессии γ -глобина и фетального гемоглобина, тем самым облегчая лечение заболевания.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Гемоглобинопатия представляет собой группу наследственных заболеваний крови, вызванных аномальной молекулярной структурой гемоглобина или аномальным синтезом пептидной цепи глобина. Два основных типа заболеваний при гемоглобинопатии представляют собой β -талассемию и серповидно-клеточную анемию. Патогенез β -талассемии обусловлен генными мутациями в пептидной цепи β -глобина, у большинства пациентов есть точечные мутации, а у некоторых есть делеции гена больших фрагментов. Делеция гена и определенные точечные мутации могут вызывать полное подавление синтеза части пептидной цепи β -глобина, и такой тип называется β^0 -талассемией,

несколько точечных мутаций частично подавляют синтез β -цепи, но синтез части пептидной цепи все еще сохраняется, такой тип называется β^+ -талассемией, и разные комбинации могут иметь разные клинические симптомы. Из-за отсутствия или снижения экспрессии β -глобина избыточные α -цепи в крови будут откладываться в эритроцитах с образованием телец включения, прикрепляющихся к поверхности мембраны эритроцита и изменяющих характеристики мембраны эритроцита, и клетки становятся жесткими, что приводит к снижению деформируемости, представляя проявления хронической гемолитической анемии, тем самым еще больше изменяя состав костного мозга. Серповидно-клеточная анемия, аналогичная β -талассемии, является аутосомно-рецессивным наследственным заболеванием, разница в том, что такая анемия имеет единственный сайт мутации и вызвана мутацией одного основания β -глобина, то есть кодон 6 нормального β -гена изменен с GAG (кодирующего глутаминовую кислоту) на GTG (валин). В мутантном гомозиготном состоянии нормальный α -глобин и аномальный β -глобин образуют тетрамерный комплекс, называемый HbS, тетрамер имеет половину способности переносить кислород, как нормальный гемоглобин, и агрегируется в полимеры в деоксигенированном состоянии, поскольку образованные полимеры располагаются параллельно мембране и в тесном контакте с клеточной мембраной, когда количество полимеров достигает определенного уровня, клеточная мембрана изменяется с нормальной вогнутой формы на серповидную. Серповидные эритроциты плохо деформируются, легко разрушаются и гемолизуются, вызывая закупорку кровеносных сосудов, повреждение, некроз и т.д. (D. Rund, et al. New England Journal of Medicine. 2005, 718-739).

В настоящее время стандартные терапевтические способы лечения β -талассемии и серповидно-клеточной анемии включают длительные переливания крови в высоких дозах, сопровождающиеся терапией по удалению железа с помощью обезжелезивающих агентов, и терапевтическую технологию трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Однако длительные переливания крови в высоких дозах, сопровождающиеся терапией по удалению железа с помощью обезжелезивающих агентов, приводят к перегрузке железом, и одной из основных причин смерти у детей с талассемией является повреждение органов, вызванное отложением большого количества железа в жизненно важных органах пациентов, таких как селезенка, печень, сердце и почки. Хотя трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток может искоренить β -талассемию и серповидно-клеточную анемию, из-за смерти, вызванной низкой долей полной совместимости с HLA-типированием (HLA - человеческие лейкоцитарные антигены) и GVHD (реакция трансплантат против хозяина) и иммунологическим

отторжением после трансплантации, современным терапевтическим способам трудно удовлетворить огромные потребности пациентов, нуждающихся в лечении. Для решения проблемы терапевтических технологий аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, были созданы трансгенная терапия и терапия редактирования генов на основе генетически модифицированных аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, где терапевтическое решение терапии редактирования генов состоит в следующем: редактирование гемопоэтических стволовых клеток, полученных от пациента, с помощью инструментов редактирования генов, таких как CRISPR/Cas9, нуклеаза с «цинковыми пальцами» (ZFN) и TALEN и т.д., увеличивая экспрессию фетального гемоглобина (HbF), затем возврат пациенту генетически модифицированных гемопоэтических стволовых клеток собственного происхождения для восстановления общего гемоглобина до нормального уровня, тем самым достигая цели лечения заболевания.

Основным механизмом терапии с помощью редактирования генов для лечения β -талассемии и серповидно-клеточной анемии является применение биологического явления, естественно присутствующего в организме человека, то есть переключения гемоглобина. Гемоглобин взрослого человека (HbA) представляет собой тетрамерный комплекс, состоящий из двух α -глобинов и двух β -глобинов, но что касается плода в организме матери и ребенка в течение 120 дней после рождения, гемоглобин в организме человека представляет собой HbF, т.е. тетрамерный комплекс, состоящий из двух α -глобинов и двух γ -глобинов, который характеризуется высокой способностью переносить кислород и слабой способностью выделять кислород, что способствует получению плодом питательных веществ из организма матери. Однако через 120 дней после рождения плода эритроциты в организме человека переключаются с HbF на HbA и начинают экспрессировать нормальный гемоглобин HbA (Marina et al, Molecular Therapy. 2017; Megan D, et al. Blood. 2015). В клинике есть класс пациентов, хотя у них есть мутации, связанные с β -талассемией или серповидно-клеточной анемией, у них есть легкие клинические симптомы или их нет, поскольку гены, ингибирующие экспрессию HbF, также несут мутации, снижающие экспрессию этих генов, в конечном итоге у пациента появляется наследственная персистенция фетального гемоглобина (HPFH), которая компенсирует снижение общего уровня гемоглобина в эритроцитах, вызванное отсутствием или уменьшением β -глобина, благодаря чему общий гемоглобин приближается к нормальному уровню или возвращается к нему (Vinjamur DS, et al. Br. J. Haematol. 2018). Таким образом, поиск подходящего участка-мишени гена и увеличение экспрессии фетального гемоглобина в эритроцитах путем редактирования генов стало совершенно новой терапевтической стратегией. Однако экспрессия HbF и HbA в

организме человека находится в относительно стабильном состоянии динамического равновесия, и механизм регуляции очень сложен. Исследования показали, что существует LCR (область контроля локуса) размером примерно 16 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов) на расстоянии от 40 до 60 т.п.н. выше β -глобина, и эта область включает 5 сайтов гиперчувствительности к ДНКазе (дезоксирибонуклеаза, ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота), которые участвуют в регуляции экспрессии HbF и HbA. Кроме того, некоторые ключевые факторы транскрипции, участвующие в развитии гемопоэтической системы, дифференцировке и созревании эритроцитов, тесно связаны в этой области, включая GATA-1, BCL11A, FOG1, NuRD, LRF, MYB, KLF1, TAL1, E2A, LMO2 и LDB1, и т.д., и они совместно регулируют экспрессию HbF и HbA (G. Lettre, et al. PNAS. 2008, 11869-11874; Marina et al, Molecular Therapy. 2017; Megan D, et al. Blood. 2015). В настоящее время найденной подходящей мишенью является положение эритроидного энхансера BCL11A (+58), эта область модифицируется путем редактирования гена для подавления экспрессии гена BCL11A, тем самым снимая ингибирование экспрессии γ -глобина и HbF геном BCL11A и увеличивая экспрессию γ -глобина и HbF, не влияя на дифференцировку и развитие других линий, и некоторые клинически бессимптомные пациенты также несут мутации в этом сайте, которые вызывают HPFH (U. Manuela, et al. PNAS. 2008; P. Liu, et al. Nature Immunology. 2003; D.E. Bauer. Science. 2013; V.G. Sankaran, et al. Science. 2008; Matthew C., et al. Nature. 2015).

Хотя были проведены клинические испытания сайтов эритроидного энхансера BCL11A, т.е. клинические испытания фазы 1/2 для лечения β -талассемии и серповидно-клеточной анемии путем трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, разработанных с помощью технологии редактирования генов (номера на сайте в сети Интернет Clinicaltrials.gov: NCT03655678, NCT03745287 и NCT03432364), но из-за индивидуальных различий между пациентами степень регуляции гена BCL11A на HbF различается у разных пациентов. Например, если ген BCL11A уже находится в состоянии очень низкой экспрессии у определенного типа пациентов, что указывает на то, что подавление экспрессии HbF геном BCL11A ослаблено, тогда лечение пациента путем редактирования эритроидного энхансера BCL11A для увеличения HbF не подействует, и если пациент прошел химиотерапию для очистки костного мозга и иммунной системы, это нанесет непредсказуемый потенциальный вред. Более того, механизм регуляции экспрессии γ -глобина и фетального гемоглобина HbF очень сложен, и сложно заранее предсказать эффективность терапевтического способа путем обнаружения экспрессии определенного гена или нескольких генов. Таким образом, как заранее предсказать степень и потенциал усиления экспрессии γ -глобина и HbF с помощью гена BCL11A

является ключевым вопросом, который необходимо срочно решить в терапии аутологичными гемопоэтическими стволовыми клетками с редактированием генов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении применена стратегия предварительной оценки степени регуляции гена BCL11A на HbF и обеспечен сопутствующий диагностический способ для прогнозирования эффективности способа редактирования генов при лечении гемоглобинопатии, предсказывающий заранее степень увеличения экспрессии γ -глобина и HbF путем редактирования генов сайтов эритроидных энхансеров BCL11A, снижение риска неудачи или снижения эффективности терапии из-за низкой экспрессии или низкой функции BCL11A в клетках пациента, тем самым облегчая оценку пациентов для диагностики и лечения в процессе клинического лечения. Пациента, имеющего высокую экспрессию BCL11A и/или пациента, у которого BCL11A играет главную роль в регуляции γ -глобина и HbF, предпочтительно выбирают для проведения лечения, где новое терапевтическое решение сопутствующей диагностики плюс аутологичные гемопоэтические стволовые клетки с редактированием генов разработано, чтобы заполнить пробел в существующей технологии, облегчая быструю разработку новой терапевтической стратегии лечения гемоглобинопатии с помощью аутологичных гемопоэтических стволовых клеток с редактированием генов, тем самым удовлетворяя потребности клинического применения.

В настоящем изобретении впервые посредством экспериментов приведены доказательства того, что у гемопоэтических стволовых клеток, полученных из мобилизованной периферической крови разных доноров, после того, как одни и те же участки эритроидного энхансера BCL11A эффективно редактируются генами, уровень мРНК (матричная рибонуклеиновая кислота) γ -глобина и уровень белка HbF после дифференцировки эритроидных клеток увеличивается по-разному, указывая на то, что индивидуальные различия влияют на ингибирующий потенциал и степень влияния BCL11A на экспрессию γ -глобина и белка HbF. Дополнительно, у гемопоэтических стволовых клеток, полученных из мобилизованной периферической крови одного и того же донора, после того, как одни и те же сайты эритроидного энхансера BCL11A эффективно редактируются генами в разных сериях экспериментов, уровень мРНК γ -глобина и уровень белка HbF после дифференцировки эритроидных клеток увеличивается стабильно и одинаково. Результаты дальнейших экспериментов показывают, что у донора с более высокой экспрессией γ -глобина и белка HbF в одной серии, экспрессия γ -глобина и белка HbF в другой серии экспериментов также выше, и наоборот. Наконец, настоящее

изобретение относится к новому терапевтическому решению и стратегии лечения гемоглобинопатии с сопутствующей диагностикой и редактированием генов эритроидных энхансеров BCL11A аутологичных гемопоэтических стволовых клеток.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения гемоглобинопатии у индивидуума, включающему:

а) этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников («CD34-положительные HSPC» (HSPC - гемопоэтические стволовые клетки)) продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV (оценочные) клетки»), и

б) этап лечения, включающий: введение второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC индивидууму, где модифицированные CD34-положительные HSPC происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные TR (регуляторные Т-клетки) (лечебные) клетки»).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу повышения экспрессии фетального гемоглобина у индивидуума, включающему:

а) этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников («CD34-положительные HSPC») продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»), и

б) этап лечения, включающий: введение второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC индивидууму, где модифицированные CD34-положительные HSPC происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные TR клетки»).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу оценки функции гемоглобина у человека, включающему:

а) этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников («CD34-положительные HSPC») продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где

модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»), и

б) этап лечения, включающий: введение второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC индивидууму, где модифицированные CD34-положительные HSPC происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные TR клетки»). В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения гемоглобинопатии у индивидуума, включающему этап лечения, включающий: введение второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC индивидууму, где модифицированные CD34-положительные HSPC происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные TR клетки»),

где индивидуум выбран для лечения на основе функциональной оценки на этапе оценки, включающем: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников («CD34-положительные HSPC») продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу выбора индивидуума, страдающего гемоглобинопатией, для лечения второй популяцией модифицированных CD34-положительных HSPC, происходящих от индивидуума и модифицированных для снижения функции BCL11A («модифицированные TR клетки»), где способ включает этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных HSPC продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»), где, если первая популяция модифицированных CD34-положительных HSPC продуцирует желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), индивидуума выбирают для лечения.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу определения того, является ли индивидуум, страдающий гемоглобинопатией, подходящим или неподходящим для лечения второй популяцией модифицированных CD34-положительных HSPC («модифицированных TR клеток»), полученных от индивидуума и

модифицированных для снижения функции BCL11A, где способ включает этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных HSPC продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»), и если первая популяция модифицированных CD34-положительных HSPC продуцирует желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), индивидуум является подходящим для лечения.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу определения того, является ли индивидуум, страдающий гемоглобинопатией, подходящим или неподходящим для лечения второй популяцией модифицированных CD34-положительных HSPC («модифицированных TR клеток»), полученных от индивидуума и модифицированных для снижения функции BCL11A, где способ включает этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных HSPC продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»), и где, если первая популяция модифицированных CD34-положительных HSPC не продуцирует желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), индивидуум является неподходящим для лечения модифицированными TR клетками.

В приведенном выше варианте осуществления оценка способности первой популяции модифицированных CD34-положительных HSPC продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки относится к: оценке того, увеличивается ли уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемый модифицированными CD34-положительными HSPC с пониженной функцией BCL11A после дифференцировки, по меньшей мере примерно на 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% или 120% по сравнению с уровнем γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемого немодифицированными CD34-положительными HSPC после дифференцировки.

Если уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемый первой популяцией модифицированных CD34-положительных HSPC после

дифференцировки, увеличивается по меньшей мере примерно на 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34 %, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%%, 90%, 95%, 100% или 120% по сравнению с уровнем γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемого немодифицированными CD34-положительными HSPC после дифференцировки, то индивидуум является подходящим для лечения модифицированными TR клетками.

В некоторых вариантах осуществления указанного выше способа, уровень γ -глобина или фетального гемоглобина, продуцируемого модифицированными CD34-положительными HSPC после дифференцировки, составляет 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600% или выше от уровня γ -глобина или фетального гемоглобина, продуцируемого немодифицированными CD34-положительными HSPC после дифференцировки.

В некоторых вариантах осуществления указанного выше способа, уровень фетального гемоглобина, продуцируемого модифицированными CD34-положительными HSPC после дифференцировки, составляет более 6,5 г/дл, 7,0 г/дл, 7,5 г/дл, 8,0 г/дл, 8,5 г/дл, 9,0 г/дл, 9,5 г/дл, 10 г/дл, 10,5 г/дл или 11,0 г/дл периферической крови или более высокий уровень. В некоторых вариантах осуществления уровень фетального гемоглобина, продуцируемого модифицированными CD34-положительными HSPC после дифференцировки, составляет примерно от 9,0 до 18 г/дл, например, от 10 до 17 г/дл, от 11 до 15 г/дл или от 12 до 16 г/дл периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления указанного выше способа, в отношении желаемого уровня γ -глобина, модифицированные CD34-положительные HSPC продуцируют более чем примерно 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600% или более высокий уровень мРНК γ -глобулина по сравнению с немодифицированными CD34-положительными HSPC.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа этап оценки включает:

а) выделение CD34-положительных HSPC из образца костного мозга или периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC («выделенные EV клетки»),

б) модификацию выделенных EV клеток для получения первой популяции модифицированных CD34-положительных клеток HSPC с пониженной функцией BCL11A («модифицированные EV клетки»), и

с) оценку способности модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, этап лечения включает:

а) мобилизацию CD34-положительных HSPC в костном мозге индивидуума в периферической крови для увеличения количества CD34-положительных HSPC в периферической крови,

б) выделение CD34-положительных HSPC из периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC («выделенные TR клетки»),

с) модификацию выделенных TR клеток для получения второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC с пониженной функцией BCL11A («модифицированные TR клетки»), и

д) введение индивидууму эффективного количества модифицированных TR клеток.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения гемоглобинопатии у индивидуума, включающему:

1) этап оценки, включающий:

а) выделение CD34-положительных HSPC из образца костного мозга или периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC («выделенные EV клетки»),

б) модификацию выделенных EV клеток для получения первой популяции модифицированных CD34-положительных клеток HSPC с пониженной функцией BCL11A («модифицированные EV клетки»), и

с) оценку способности модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, и

2) этап лечения, включающий:

а) мобилизацию CD34-положительных HSPC у индивидуума в периферической крови,

б) выделение CD34-положительных HSPC из периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC («выделенные TR клетки»),

с) модификацию выделенных TR клеток для получения второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC с пониженной функцией BCL11A («модифицированные TR клетки»), и

d) введение индивидууму эффективного количества модифицированных TR клеток.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения гемоглобинопатии у индивидуума, включающему:

1) этап оценки, включающий:

a) выделение CD34-положительных HSPC из образца костного мозга или периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC («выделенные EV клетки»),

b) генетическую модификацию (например, генетическую модификацию способом CRISPR) выделенных EV клеток для получения первой популяции модифицированных CD34-положительных клеток HSPC с пониженной функцией BCL11A («модифицированные EV клетки»), и

c) оценку способности модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, и

2) этап лечения, включающий:

a) мобилизацию CD34-положительных HSPC у индивидуума в периферической крови,

b) выделение CD34-положительных HSPC из периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC («выделенные TR клетки»),

c) генетическую модификацию (например, генетическую модификацию способом CRISPR) выделенных TR клеток для получения второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC с пониженной функцией BCL11A («модифицированные TR клетки»), и

d) введение (например, путем внутривенной инъекции, включая однократную внутривенную инъекцию) эффективного количества модифицированных TR клеток индивидууму.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, образец костного мозга или периферической крови, применяемый для выделения CD34-положительных HSPC для получения выделенных EV клеток, представляет собой небольшое количество, например, объем образца костного мозга составляет не более 20 мл, например, от 5 до 20 мл, от 5 до 10 мл, и объем периферической крови составляет не более 30 мл, например, от 10 до 30 мл, от 15 до 20 мл.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, образец костного мозга или периферической крови, применяемый для выделения CD34-положительных

HSPC для получения выделенных TR клеток, представляет собой большое количество, например, не менее 50 мл, например, от 50 до 300 мл, от 100 до 200 мл.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, CD34-положительные HSPC клетки могут быть получены из костного мозга или периферической крови индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ разделения включает разделение на основе магнитных частиц. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, способ включает генетическую модификацию выделенных EV клеток. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, генетическая модификация включает генетическую модификацию выделенных EV клеток любым способом, выбранным из группы, состоящей из нуклеазы с «цинковыми пальцами» (ZFN), эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), и коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), редактирования РНК, интерференции РНК или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, функция BCL11A снижается путем модификации гена BCL11A в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, функция BCL11A снижается путем генетической модификации CD34-положительных клеток HSPC способом CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа функция BCL11A снижается путем модификации CD34-положительных клеток HSPC с помощью ингибитора функции BCL11A. В некоторых вариантах осуществления ингибитор функции BCL11A представляет собой белок или молекулу нуклеиновой кислоты, ингибирующую транскрипцию и/или экспрессию гена BCL11A, например, нуклеазу (такую как ZFN и TALEN), пептидную нуклеиновую кислоту, антисмысловую РНК, миРНК (малая интерферирующая РНК), микроРНК и кшРНК (короткие шпилечные РНК). В некоторых вариантах осуществления ингибитор функции BCL11A представляет собой белок или молекулу нуклеиновой кислоты, ингибирующую транскрипцию и/или экспрессию гена в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека. В некоторых вариантах осуществления ингибитор функции BCL11A представляет собой белок или молекулу нуклеиновой кислоты интерферирующую, ингибирующую или разрушающую транскрипцию и/или экспрессию гена в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека. В некоторых вариантах осуществления ингибитор функции BCL11A представляет собой нуклеазу (такую как ZFN и TALEN), пептидную нуклеиновую кислоту, антисмысловую РНК, миРНК, микроРНК интерферирующую, ингибирующую или разрушающую транскрипцию и/или экспрессию гена в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, способность модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки оценивают на этапе оценки, включающем: 1) культивирование модифицированных EV клеток в условиях, позволяющих дифференцировку для получения популяции эритроцитов, и 2) определение уровня γ -глобулина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемого эритроцитами.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, способность модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки оценивают на этапе оценки, включающем: определение уровня мРНК γ -глобулина. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, способность модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки оценивают на этапе оценки, включающем: определение уровня белка фетального гемоглобина (HbF). В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, где CD34-положительные HSPC клетки индивидуума не подвергали мобилизации или предварительной обработке перед этапом оценки, например, индивидууму не вводили агент для очистки костного мозга и лимфы (такой как бусульфан и флударабин) перед этапом оценки. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа этап оценки повторяют по меньшей мере один раз перед этапом лечения.

Способ модификации выделенных TR клеток может быть таким же, как способ модификации выделенных EV клеток, или отличаться от него. В некоторых вариантах осуществления способ модификации выделенных TR клеток может быть таким же, как и способ модификации выделенных EV клеток. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, выделенные TR клетки генетически модифицированы. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа генетическая модификация включает генетическую модификацию выделенных TR клеток любым способом, выбранным из группы, состоящей из нуклеазы с «цинковыми пальцами» (ZFN), эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), и коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), редактирования РНК, интерференции РНК (РНКи) или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, функция BCL11A снижается путем модификации гена BCL11A в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, функция BCL11A снижается путем генетической модификации CD34-положительных клеток HSPC

по технологии CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления указанного выше способа, функция BCL11A снижается путем модификации CD34-положительных клеток HSPC с помощью ингибитора функции BCL11A. В некоторых вариантах осуществления ингибитор функции BCL11A представляет собой молекулу белка или нуклеиновой кислоты, ингибирующую транскрипцию и/или экспрессию гена BCL11A, например, нуклеазу (такую как ZFN и TALEN), пептидную нуклеиновую кислоту, антисмысловую РНК, миРНК, микроРНК и кшРНК. В некоторых вариантах осуществления ингибитор функции BCL11A представляет собой молекулу белка или нуклеиновой кислоты, ингибирующую транскрипцию и/или экспрессию гена в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека. В некоторых вариантах осуществления ингибитор функции BCL11A представляет собой белок или молекулу нуклеиновой кислоты, интерферирующую, ингибирующую или разрушающую транскрипцию и/или экспрессию гена в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека. В некоторых вариантах осуществления ингибитор функции BCL11A представляет собой нуклеазу (такую как ZFN и TALEN), пептидную нуклеиновую кислоту, антисмысловую РНК, миРНК, микроРНК интерферирующую, ингибирующую или разрушающую транскрипцию и/или экспрессию гена в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека.

В некоторых вариантах осуществления этап лечения включает мобилизацию костного мозга индивидуума, так что большое количество гемопоэтических стволовых клеток продуцируется костным мозгом и высвобождается в систему кровообращения периферической крови. Мобилизация CD34-положительных HSPC включает введение индивидууму гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (GCSF) и/или плериксафора (например, от 4 до 10 дней, от 5 до 8 дней или от 6 до 7 дней) до сбора CD34-положительных HSPC клеток.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, этап лечения дополнительно включает: предварительную обработку индивидуума перед введением модифицированных TR клеток. Предварительная обработка может включать терапию по очищению костного мозга и/или очищению лимфы. В некоторых вариантах осуществления предварительная обработка включает химиотерапию, терапию моноклональными антителами или системное облучение. В некоторых вариантах осуществления химиотерапия включает введение индивидууму одного или более химиотерапевтических агентов, выбранных из группы, состоящей из: бусульфана, циклофосфида и флударабина.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, этап лечения включает введение (например, путем внутривенной инъекции, включая однократную внутривенную инъекцию) индивидууму 2×10^6 или более, 5×10^6 или более, 1×10^7 или более или 2×10^7 или более клеток/кг массы тела модифицированных TR клеток.

В некоторых вариантах осуществления выделенные TR клетки культивируют в течение одного или более дней перед модификацией, а затем выделенные TR клетки модифицируют. В некоторых вариантах осуществления модифицированные TR клетки культивируют в течение одного или более дней (например, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней) перед введением индивидууму. В некоторых вариантах осуществления модифицированные TR клетки хранят в условиях замораживания в течение по меньшей мере 24 часов перед введением модифицированных TR клеток индивидууму. В некоторых вариантах осуществления модифицированные TR клетки культивируют в течение одного или более дней (например, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней) перед хранением в условиях замораживания.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа гемоглобинопатия выбрана из группы, состоящей из: серповидно-клеточной анемии, носительства признака «серповидных клеток», гемоглобиноза С, носительства признака гемоглобиноза С, гемоглобиноза S/C, гемоглобиноза D, гемоглобиноза E, талассемии, расстройства, связанного с гемоглобином, с повышенным сродством к кислороду, расстройства, связанного с гемоглобином, с пониженным сродством к кислороду, болезни нестабильного гемоглобина и метгемоглобинемии. В некоторых вариантах осуществления гемоглобинопатия выбрана из группы, состоящей из β -талассемии и серповидно-клеточной анемии. В некоторых вариантах осуществления гемоглобинопатия представляет собой β^0 - или β^+ -талассемию.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа индивидуум представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека моложе 35 лет. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой мужчину. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой женщину. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека без осложнений со стороны сердца, печени, легких или селезенки. В некоторых вариантах осуществления уровень гемоглобина у индивидуума до лечения составляет не более 5,0 г/дл, 6,0 г/дл, 7,0 г/дл, 8,0 г/дл или 9,0 г/дл периферической крови. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа этап лечения выполняют сразу после этапа оценки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1: 2 единых направляющих РНК (sgРНК) гена, кодирующего мРНК Cas9 (SEQ ID NO: 1) и разрушенный эритроидный энхансер BCL11A (соответственно sgРНК-1 и sgРНК-2), вводят в гемопоэтические стволовые клетки, соответственно полученные из мобилизованной периферической крови 5 различных пациентов с талассемией и 2 здоровых доноров способом электропорации, через 4 дня, выполняют статистический анализ эффективности генерации инсерционно-делеционных мутаций (Indels) с помощью онлайн-программы Synthego ICE Analysis.

Фиг. 2: 2 sgРНК мРНК Cas9 и разрушенный эритроидный энхансер BCL11A (соответственно sgРНК-1 и sgРНК-2) вводят в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки, полученные соответственно из мобилизованной периферической крови 5 различных пациентов с талассемией и 2 здоровых доноров с помощью электропорации, выполняя дифференцировку эритроцитов, обнаружение через 18 дней для определения соотношения экспрессии двух мембранных белков человеческого CD71 и человеческого CD235a, которое представляет эффективность дифференцировки эритроидных клеток. Контрольная группа: представляющие клетки без редактирования генов. sgРНК-1 и sgРНК-2: представляют два типа клеток, соответственно, имеющих два типа sgРНК, подвергающихся редактированию генов.

Фиг. 3: 2 sgРНК мРНК Cas9 и разрушенный эритроидный энхансер BCL11A (соответственно sgРНК-1 и sgРНК-2) вводят в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки, полученные соответственно из мобилизованной периферической крови 5 различных пациентов с талассемией и 2 здоровых доноров посредством электропорации, выполняя дифференцировку эритроцитов, через 18 дней обнаружение экспрессии мРНК гена HBG (γ -глобина) с помощью количественной флуоресцентной ПЦР. Контрольная группа: представляющие клетки без редактирования генов. Экспериментальная группа: представляющие два типа клеток, соответственно подвергающихся редактированию генов двух видов sgРНК. N составляет 3 экспериментальных повтора. Ген HBG и ген GAPDH нормализованы.

Фиг. 4А: мРНК Cas9 и sgРНК-2 разрушенного эритроидного энхансера BCL11A вводят в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки, соответственно полученные из мобилизованной периферической крови 2 различных здоровых доноров путем электропорации, выполняя 3 серии экспериментов, через 4 дня, выполняют статистический анализ эффективности генерации инсерционно-делеционных мутаций с помощью онлайн-программы Synthego ICE Analysis. Фиг. 4В: мРНК Cas9 и sgРНК-2 разрушенного эритроидного энхансера BCL11A вводят в CD34-положительные

гемопозитические стволовые клетки, соответственно полученные из мобилизованной периферической крови 10 пациентов с талассемией путем электропорации, выполняя несколько серий экспериментов (пациент донор 1, три серии (пациент донор 6, пациент донор 9 и пациент донор 10, соответственно, две независимые серии), через 2 дня, выполняют статистический анализ эффективности генерации инсерционно-делеционных мутаций с помощью онлайн-программы Synthego ICE Analysis.

Фиг. 5: мРНК Cas9 и sgРНК-2 разрушенного эритроидного энхансера BCL11A вводят в CD34-положительные гемопозитические стволовые клетки, соответственно полученные из мобилизованной периферической крови 2 различных здоровых доноров путем электропорации, выполняя 3 серии экспериментов, выполняют дифференцировку эритроцитов, через 18 дней обнаружение экспрессии двух мембранных белков человеческого CD71 и человеческого CD235a, чтобы указать на эффективность дифференцировки эритроидных клеток. Контрольная группа: представляющие клетки без редактирования генов. Экспериментальная группа: представляющие клетки, подвергающиеся редактированию генов sgРНК-2.

Фиг. 6: мРНК Cas9 и sgРНК-2 разрушенного эритроидного энхансера BCL11A вводят в CD34-положительные гемопозитические стволовые клетки, соответственно полученные из мобилизованной периферической крови 10 пациентов с талассемией путем электропорации, выполняя несколько серий экспериментов, выполняют дифференцировку эритроцитов, через 18 дней обнаружение экспрессии двух мембранных белков человеческого CD71 и человеческого CD235a, чтобы указать на эффективность дифференцировки эритроидных клеток. Контрольная группа: представляющие клетки без редактирования генов. Экспериментальная группа: представляющие клетки, подвергающиеся редактированию генов sgРНК-2.

Фиг. 7: мРНК Cas9 и sgРНК-2 разрушенного эритроидного энхансера BCL11A вводят в CD34-положительные гемопозитические стволовые клетки, соответственно полученные из мобилизованной периферической крови первого здорового донора путем электропорации, выполняя 3 серии экспериментов по дифференцировке эритроцитов, через 18 дней после дифференцировки определение экспрессии мРНК генов, содержащих BCL11A и HBG (γ -глобин), с помощью флуоресцентной количественной ПЦР. Контрольная группа: представляющие клетки без редактирования генов. Экспериментальная группа: представляющие клетки, подвергающиеся редактированию генов sgРНК-2. N составляет 3 экспериментальных повтора. Ген HBG и ген BCL11A соответственно нормализованы по отношению к гену GAPDH.

Фиг. 8: мРНК Cas9 и sgРНК-2 разрушенного эритроидного энхансера BCL11A вводят в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки, соответственно полученные из мобилизованной периферической крови второго здорового донора путем электропорации, выполняя 3 серии экспериментов по дифференцировке эритроцитов, через 18 дней после дифференцировки определение экспрессии мРНК генов, содержащих BCL11A и HBG (γ -глобин), с помощью флуоресцентной количественной ПЦР. Контрольная группа: представляющие клетки без редактирования генов. Экспериментальная группа: представляющие клетки, подвергающиеся редактированию генов sgРНК-2. N составляет 3 экспериментальных повтора. Ген HBG и ген BCL11A соответственно нормализованы по отношению к гену GAPDH.

Фиг. 9A: мРНК Cas9 и sgРНК-2 разрушенного эритроидного энхансера BCL11A вводят в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки, соответственно полученные из мобилизованной периферической крови 10 пациентов с талассемией путем электропорации, выполняя несколько серий экспериментов, выполняют дифференцировку эритроцитов через 18 дней, определяя соотношение экспрессии HbF в эритроцитах после дифференцировки с помощью проточной цитометрии. Контрольная группа: представляющие клетки без редактирования генов. Экспериментальная группа: представляющие клетки, подвергающиеся редактированию генов sgРНК-2. Фиг. 9B: Статистический анализ кратных HbF +% в экспериментальной группе и HbF +% в контрольной группе от разных пациентов с талассемией.

Фиг. 10: Статистический анализ кратных HbF +% в экспериментальной группе и HbF +% в контрольной группе от пациента 1 с талассемией, n составляет 3 экспериментальных повтора.

Фиг. 11: Схематическая диаграмма нового терапевтического решения для редактирования гена сайта эритроидного энхансера BCL11A для лечения гемоглобинопатии.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способу прогнозирования эффективности технологии редактирования генов или уровня эффективности редактирования генов при лечении гемоглобинопатии (например, β -талассемии и серповидно-клеточной анемии) путем снижения функции BCL11A, например, путем разрушения сайта эритроидного энхансера BCL11A в гемопоэтических стволовых клетках с помощью технологии редактирования генома, проведения дифференцировки эритроцитов на гемопоэтических

стволовых клетках, подвергающихся редактированию генов, и оценки степени повышения экспрессии γ -глобина и фетального гемоглобина.

В частности, настоящее изобретение относится к способу лечения гемоглобинопатии у индивидуума, включающему:

а) этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников («CD34-положительные HSPC») продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»), и

б) этап лечения, включающий: введение второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC индивидууму, где модифицированные CD34-положительные HSPC происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные TR клетки»). В вариантах осуществления вышеупомянутого способа первая популяция и/или вторая популяция модифицированы для снижения функции BCL11A путем модификации гена BCL11A в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека (например, генетическая модификация с помощью технологии CRISPR/Cas, включающей введение sgPHK, содержащей последовательность, выбранную из любой последовательности SEQ ID NO: от 3 до 25, в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники для редактирования гена BCL11A).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения гемоглобинопатии у индивидуума включающему этап лечения, включающий: введение второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC индивидууму, где модифицированные CD34-положительные HSPC происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные TR клетки»), и

где индивидуума выбирают для лечения на основе функциональной оценки на этапе оценки, включающем: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников («CD34-положительные HSPC») продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»). В вариантах осуществления вышеупомянутого способа первая популяция и/или вторая популяция

модифицированы для снижения функции BCL11A путем модификации гена BCL11A в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека (например, генетическая модификация с помощью технологии CRISPR/Cas, включающей введение sgPHK, содержащей последовательность, выбранную из любой последовательности SEQ ID NO: от 3 до 25, в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники для редактирования гена BCL11A).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу выбора индивидуума, страдающего гемоглобинопатией, для лечения второй популяцией модифицированных CD34-положительных HSPC, которые происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные TR клетки»), где способ включает этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных HSPC продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»), где, если первая популяция модифицированных CD34-положительных HSPC продуцирует желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), индивидуума выбирают для лечения. В вариантах осуществления вышеупомянутого способа первая популяция и/или вторая популяция модифицированы для снижения функции BCL11A путем модификации гена BCL11A в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека (например, генетическая модификация с помощью технологии CRISPR/Cas, включающей введение sgPHK, содержащей последовательность, выбранную из любой последовательности SEQ ID NO: от 3 до 25, в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники для редактирования гена BCL11A).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения гемоглобинопатии у индивидуума, включающему:

1) этап оценки, включающий:

а) выделение CD34-положительных HSPC из образца костного мозга или периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC («выделенные EV клетки»),

б) генетическую модификацию (например, генетическую модификацию способом CRISPR) выделенных EV клеток для получения первой популяции модифицированных CD34-положительных клеток HSPC с пониженной функцией BCL11A («модифицированные EV клетки»), и

с) оценку способности модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, и

2) этап лечения, включающий:

a) мобилизацию CD34-положительных HSPC у индивидуума в периферической крови,

b) выделение CD34-положительных HSPC из периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC («выделенные TR клетки»),

с) генетическую модификацию (например, генетическую модификацию способом CRISPR) выделенных TR клеток для получения второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC с пониженной функцией BCL11A («модифицированные TR клетки»), и

d) введение (например, путем внутривенной инъекции, включая однократную внутривенную инъекцию) эффективного количества модифицированных TR клеток индивидууму. В вариантах осуществления вышеупомянутого способа первая популяция и/или вторая популяция модифицированы для снижения функции BCL11A путем модификации гена BCL11A в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека (например, генетическая модификация с помощью технологии CRISPR/Cas, включающей введение sgРНК, содержащей последовательность, выбранную из любой последовательности SEQ ID NO: от 3 до 25, в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники для редактирования гена BCL11A).

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа образец костного мозга или периферической крови, применяемый для выделения CD34-положительных HSPC для получения выделенных EV клеток, представляет собой небольшое количество, например, объем образца костного мозга составляет не более 20 мл, например, от 5 до 20 мл, от 5 до 10 мл, объем образца периферической крови составляет не более 30 мл, например, от 10 до 30 мл, от 15 до 20 мл.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа образец костного мозга или периферической крови, применяемый для выделения CD34-положительных HSPC с целью продуцирования выделенных TR клеток, представляет собой большое количество, например, не менее 50 мл, например, от 50 до 300 мл, от 100 до 200 мл.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа CD34-положительные клетки HSPC могут быть выделены из костного мозга или периферической крови индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ разделения включает разделение на основе магнитных частиц. Например, клетки костного

мозга или периферической крови специально помечают суперпарамагнитными частицами MACS MicroBeads. После магнитного мечения такие клетки проходят через сортировочную колонку, помещенную в сильное и стабильное магнитное поле (матрица в сортировочной колонке создает магнитное поле с высоким градиентом). Клетки с магнитной меткой остаются в колонке, в то время как клетки без метки вытекают. Когда сортировочную колонку удаляют из магнитного поля, клетки с магнитной меткой в колонке можно элюировать, так что могут быть получены две популяции клеток, состоящих из меченых и немеченых клеток. В конкретном варианте осуществления центрифугирование в градиенте плотности жидкости фиколла можно применять для разделения различных слоев клеток в крови путем центрифугирования в градиенте плотности на низкой скорости с применением разницы в удельном весе различных компонентов. Плотность эритроцитов и гранулоцитов больше, чем у расслоенной жидкости, и эритроциты будут быстро агломерироваться в нить и накапливаться на дне пробирки после контакта с жидкостью фиколла. Между слоем плазмы и разделенной на слои жидкостью, то есть лейкоцитарной пленкой, обогащены только моноклеарные клетки с той же плотностью, что и у разделенной на слои жидкости, и в этом слое существуют гемопоэтические стволовые клетки. CD34-положительные клетки HSPC могут быть получены путем последующего разделения на основе магнитных частиц.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу определения того, является ли индивидуум, страдающий гемоглобинопатией, подходящим или неподходящим для лечения второй популяцией модифицированных CD34-положительных HSPC («модифицированных TR клеток»), полученных от индивидуума и модифицированных для снижения функции BCL11A, где способ включает этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных HSPC продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»), и где, если первая популяция модифицированных CD34-положительных HSPC продуцирует желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), индивидуум является подходящим для лечения.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу определения того, является ли индивидуум, страдающий гемоглобинопатией, подходящим или неподходящим для лечения второй популяцией модифицированных CD34-положительных HSPC («модифицированные TR клетки»), полученной от индивидуума и

модифицированной для снижения функции BCL11A, где способ включает этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных HSPC для продуцирования желаемого уровня γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции получены от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»), где, если первая популяция модифицированных CD34-положительных HSPC не продуцирует желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), индивидуум является неподходящим для лечения второй популяцией модифицированных CD34-положительных HSPC («модифицированные TR клетки»).

«Гемопозитические стволовые клетки» относятся к клеточной популяции с высоким потенциалом пролиферации, способностью к множественной дифференцировке и способностью к самообновлению. Гемопозитические стволовые клетки могут не только дифференцироваться и дополнять различные клетки крови, но также поддерживать характеристики и количество стволовых клеток за счет самообновления. Степень дифференцировки и способность к пролиферации гемопозитических стволовых клеток различны и неоднородны. Плюрипотентные гемопозитические стволовые клетки являются наиболее примитивными, во-первых, они дифференцируются в направленные плюрипотентные гемопозитические стволовые клетки, например, миелоидные гемопозитические стволовые клетки, способные генерировать гранулоциты, эритроциты, мононуклеарные клетки и мегакариоцитарно-тромбоцитарные клетки, и стволовые клетки лимфоцитов, способные преобразовываться в В-лимфоциты и Т-лимфоциты. Эти два типа стволовых клеток сохраняют основные характеристики гемопозитических стволовых клеток, и слегка дифференцированы, и они соответственно отвечают за «компоненты костного мозга» и возникновение лимфоцитов, поэтому их называют направленными плюрипотентными гемопозитическими стволовыми клетками. Далее они дифференцируются в гемопозитические клетки-предшественники, которые также являются примитивными клетками крови, но утратили многие из основных характеристик гемопозитических стволовых клеток, например, теряют способность к множественной дифференцировке и дифференцируются только в направлении одной клеточной линии или двух тесно связанных линий клеток, потеря способности к многократному обновлению и зависимость от пролиферации и дифференцировки гемопозитических стволовых клеток для пополнения их числа, с ограниченным потенциалом распространения и делением только несколько раз. По количеству линий клеток крови, дифференцированных от гемопозитических клеток-предшественников, они делятся на

унипотентные гемопоэтические клетки-предшественники (дифференцирующиеся только в одну линию клеток крови) и олигопотентные гемопоэтические клетки-предшественники (дифференцирующиеся на 2–3 линии клеток крови). В контексте настоящего описания термины «гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники» и «гемопоэтические стволовые клетки» могут применяться взаимозаменяемо, охватывая плюрипотентные гемопоэтические стволовые клетки, направленные плюрипотентные гемопоэтические стволовые клетки и гемопоэтические клетки-предшественники, и это общие термины для гемопоэтических стволовых клеток с различной гетерогенностью.

В контексте настоящего описания «CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники», сокращенно называемые CD34-положительными HSPC, относятся к популяции стволовых клеток и клеток-предшественников, экспрессирующих маркеры CD34 на поверхности и обладающих кроветворной функцией. Например, CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники можно обнаружить и подсчитать, например, с помощью проточной цитометрии и флуоресцентно меченных антител к CD34.

В конкретном варианте осуществления CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники выделяют или получают из организма (индивидуума), содержащего клетки гемопоэтического происхождения. «Разделение» относится к удалению из его первоначальной среды. Например, клетка выделена, если она отделена от некоторых или всех компонентов, которые обычно сопровождают ее в естественном состоянии.

Гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники могут быть получены или выделены из нефракционированного или фракционированного костного мозга взрослых субъектов, источники включают бедренные кости, тазовые кости, ребра, грудину и другие кости. Гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники могут быть непосредственно получены или выделены из тазовых костей с помощью иглы и шприца или получены из крови, обычно полученной из крови после предварительной обработки мобилизатором гемопоэтических стволовых клеток, таким как GCSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор). Другие источники гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников включают пуповинную кровь, плацентарную кровь и мобилизованную периферическую кровь индивидуумов.

После того, как популяция клеток выделена и получена от индивидуума (например, из костного мозга или периферической крови), она может быть дополнительно очищена для получения CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников, например, путем удаления зрелых клеток, направленных на

клонирование, в популяции выделенных клеток путем иммунизации, например, мечения твердого матрикса путем связывания антител с набором антигенов «линии происхождения» (например, CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123 и CD235a), а затем разделение исходных гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников с помощью антител, связывающихся с CD34-положительными антигенами. Наборы для очистки гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников из различных источников клеток коммерчески доступны, и в конкретных вариантах осуществления такие наборы можно применять вместе со способами по настоящему изобретению.

«CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники» могут составлять по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% CD34-положительной популяции гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников в популяции клеток, богатой CD34-положительными клетками.

«Модифицированная» клетка относится к клетке, претерпевающей изменения на молекулярном или клеточном уровне с помощью биологических или химических способов. Например, выделенные CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники («CD34-положительные HSPC») разрушают ген BCL11A или его кодирующую РНК с образованием модифицированных EV клеток или модифицированных TR клеток с пониженной функцией BCL11A способами редактирования генов, например, любым способом, выбранным из группы, состоящей из: ZFN, TALEN, CHRISPR, редактирования РНК или технологии РНКи. Ингибиторы функции BCL11A, включая нуклеазы (такие как ZFN и TALEN), пептидную нуклеиновую кислоту, антисмысловую РНК, миРНК, микроРНК и кшРНК, также можно применять для подавления функции гена BCL11A с целью модификации выделенных CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников («CD34-положительные HSPC»), тем самым продуцируя модифицированные EV клетки или модифицированные CD34-положительные TR клетки.

«EV клетка» в контексте настоящего описания представляет собой клетку, применяемую для оценки (EV), и «TR клетка» в контексте настоящего описания представляет собой клетку, применяемую для лечения (TR).

«Мобилизация» гемопоэтических стволовых клеток относится к процессу, посредством которого гемопоэтические стволовые клетки в гемопоэтическом микроокружении перемещаются из специфического микроокружения костного мозга в периферическое кровообращение после воздействия на них мобилизующего агента.

Гемоглобинопатия представляет собой группу наследственных заболеваний крови, вызванных аномальной молекулярной структурой гемоглобина или аномальным синтезом пептидной цепи глобина. Клинические проявления включают гемолитическую анемию, метгемоглобинемию или гипоксию тканей, вызванную повышенным или пониженным сродством гемоглобина к кислороду, или цианоз из-за компенсаторного эритроцитоза.

«Гемоглобин» представляет собой связывающий белок, состоящий из глобина и гема. Молекула глобина имеет две пары пептидных цепей, одна пара представляет собой α -цепи, другая пара представляет собой цепи, не относящиеся к α , состоящие из 5 видов цепей, то есть β , γ , δ и ξ -цепи (со структурой, подобной α -цепи) и ϵ -цепь. Гемоглобин человека представляет собой тетрамер, состоящий из двух пар (4) мономеров гемоглобина (каждая пептидная цепь связана с гемом с образованием мономера гемоглобина), объединенных в соответствии с определенным пространственным соотношением, например, HbA (или HbA1, $\alpha_2\beta_2$), HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) и HbF ($\alpha_2\gamma_2$), где HbF ($\alpha_2\gamma_2$) представляет собой тетрамер фетального гемоглобина.

В контексте настоящего описания термин «BCL11A» представляет собой фактор транскрипции. Впервые он был обнаружен у мышей в качестве сайта связывания ретровирусов и получил название Evi9. Позже этот ген был также обнаружен в геноме человека и локализован на участке 2p13 короткого плеча хромосомы 2.

Снижение функции BCL11A после модификации означает, что ген BCL11A разрушен или его экспрессия и/или транскрипция ингибируется, ослабляется, блокируется и мешает модификации, например, генетической модификации (например, редактирование гена на уровне ДНК и/или уровне РНК) или путем добавления ингибиторов функции BCL11A (например, нуклеаз (таких как ZFN и TALEN), пептидной нуклеиновой кислоты, антисмысловой РНК, миРНК, микроРНК и кшРНК, нацеленных на ген BCL11A).

В контексте настоящего описания термин «CRISPR/Cas» представляет собой технологию редактирования генов, включая, помимо прочего, различные естественные или искусственно созданные системы CRISPR/Cas, такие как система CRISPR/Cas9. Естественная система CRISPR/Cas представляет собой адаптивную иммунную защиту, сформированную в ходе долгосрочной эволюции бактерий и архей, которую можно применять для борьбы с вторгающимися вирусами и чужеродной ДНК. Например, принцип работы CRISPR/Cas9 заключается в том, что crРНК (РНК, полученная из CRISPR) объединяется с tracrРНК (транс-активационная РНК) посредством спаривания оснований с образованием комплекса tracrРНК/crРНК, который направляет белок нуклеазы Cas9 для разрезания двойной нити ДНК в целевом сайте последовательности

спаривания с sgРНК. Направляющая sgРНК (единая направляющая РНК) может быть сформирована путем искусственного конструирования tracrРНК и crРНК, и этого достаточно, чтобы направлять Cas9 для выполнения сайт-специфического расщепления ДНК. Как РНК-управляемый связывающий дцДНК белок, эффекторная нуклеаза Cas9 может совместно локализовать РНК, ДНК и белок и имеет большой потенциал для трансформации. Система CRISPR/Cas может применять белки Cas 1, 2 или 3 типа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в способе применяют Cas9. Другие применимые системы CRISPR/Cas включают, но не ограничиваются ими, системы и способы, описанные в WO2013176772, WO2014065596, WO2014018423, US8697359, PCT/CN2018/112068 и PCT/CN2018/112027.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, способ включает генетическую модификацию выделенных EV клеток. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа генетическая модификация включает:

генетическую модификацию выделенных EV клеток любым способом, выбранным из группы, состоящей из нуклеазы с «цинковыми пальцами» (ZFN), эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), и коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), редактирования РНК, интерференции РНК или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения энхансер BCL11a (последовательность нуклеиновой кислоты, влияющая, например, на усиление экспрессии или функции BCL11a) разрушают генетической модификацией (например, способом, выбранным из группы, состоящей из: ZFN, TALEN, CRISPR, редактирования РНК или РНКи). В отношении энхансера BCL11a см., например, публикацию Bauer et al., Science, Vol. 342, 2013, pp. 253-257. Примером энхансера BCL11a является последовательность нуклеиновой кислоты между экзоном 2 и экзоном 3 гена BCL11a (например, нуклеиновая кислота, расположенная в или соответствующая положениям, записанным в hg38: +55:Chr2:60497676-60498941, +58:Chr2:60494251-60495546, +62:Chr2:60490409-60491734). Пример энхансера BCL11a представляет собой: +62 участок последовательности нуклеиновой кислоты между экзоном 2 и экзоном 3 гена BCL11a. Пример энхансера BCL11a представляет собой: +58 участок последовательности нуклеиновой кислоты между экзоном 2 и экзоном 3 гена BCL11a (последовательность 150 п.о. (пар оснований))

58K	участка	гена	BCL11A:
-----	---------	------	---------

ctgccagtcctcttctacccacccacgccccaccctaatacagaggccaaacccttctggagcctgtgataaaagcaactgttagcttgca
ctagactagcttcaaagttgtattgaccctggtgtgttatgtctaagagtagatgcc (SEQ ID NO: 2). В некоторых

вариантах осуществления энхансер BCL11a представляет собой: +55 участок последовательности нуклеиновой кислоты между экзоном 2 и экзоном 3 гена BCL11a.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, функция BCL11A снижается путем модификации гена BCL11A в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа функция BCL11A снижается путем модификации CD34-положительных клеток HSPC по технологии CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления ингибитор функции BCL11A представляет собой молекулу белка или нуклеиновой кислоты, ингибирующую транскрипцию и/или экспрессию гена в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека. В некоторых вариантах осуществления ингибитор функции BCL11A представляет собой белок или молекулу нуклеиновой кислоты, интерферирующую, ингибирующую или разрушающую транскрипцию и/или экспрессию гена в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека. В некоторых вариантах осуществления ингибитор функции BCL11A представляет собой нуклеазу (такую как ZFN и TALEN), пептидную нуклеиновую кислоту, антисмысловую РНК, миРНК, микроРНК интерферирующую, ингибирующую или разрушающую транскрипцию и/или экспрессию гена в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутого способа применяют редактирование генов для разрушения геномной области BCL11A в положениях 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека в гемопоэтических стволовых клетках с тем, чтобы снизить функцию BCL11A. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутого способа редактирование генов представляет собой способ редактирования генов на основе нуклеазы с «цинковыми пальцами», редактирования генов TALEN или редактирования генов CRISPR/Cas, редактирования РНК или РНКи. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа редактирование генов представляет собой способ редактирования генов CRISPR/Cas9. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа целевая нуклеотидная последовательность генома BCL11A комплементарна любой последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: от 3 до 25.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа sgРНК, содержащую последовательность, выбранную из любой SEQ ID NO: от 3 до 25, вводят в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники для редактирования гена BCL11A, тем самым снижая функцию BCL11A. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа sgРНК модифицирована 2'-О-метиловым аналогом и/или межнуклеотидным 3'-тио. В некоторых вариантах

осуществления вышеуказанного способа химическая модификация представляет собой модификацию 2'-О-метильного аналога одного, двух и/или трех оснований перед 5'-концом и/или последнего основания 3'-конца sgРНК. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа sgРНК и нуклеотиды, кодирующие Cas9, вводят совместно в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа sgРНК и нуклеотиды, кодирующие Cas9, совместно вводят в гемопоэтические стволовые клетки путем электропорации. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа условия электропорации составляют от 200 до 600 В, от 0,5 мс до 2 мс.

«Дифференцировка» клеток относится к процессу, где клетки из одного и того же источника постепенно продуцируют популяции клеток с различными морфологическими структурами и функциональными характеристиками.

«Дифференцировка» от гемопоэтических стволовых клеток до эритроцитов включает стадию гемопоэтических стволовых клеток, стадию эритроидных клеток-предшественников, стадию пролиферации и дифференцировки эритроидных клеток-предшественников (от первичного эритроцита до позднего эритроцита), процессы пролиферации и созревания ретикулоцитов, и стадию высвобождения ретикулоцитов из периферической крови для созревания в эритроциты. Стадия гемопоэтических стволовых клеток: в настоящее время известно, что гемопоэтические стволовые клетки в основном существуют в костном мозге, селезенке, печени и других кроветворных тканях, и небольшое их количество также циркулирует в периферической крови. Стадия эритроидных клеток-предшественников: на этой стадии клетки представляют собой популяцию клеток между гемопоэтическими стволовыми клетками и клетками-предшественниками эритроидов. Гемопоэтические стволовые клетки дифференцируются в эритроидные клетки-предшественники под влиянием кроветворного микроокружения костного мозга. Гемопоэтическое микроокружение включает микрососудистую систему, нервную систему, гемопоэтическую строму и т.д. На дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток специфически влияют и влияют гуморальные факторы и цитокины. Стадия эритроидных клеток-предшественников: включая примитивные эритроциты, ранние молодые эритроциты, промежуточные молодые эритроциты, поздние молодые эритроциты и ретикулоциты для достижения зрелых эритроцитов.

Процесс созревания клеток представляет собой процесс увеличения гемоглобина и снижения активности ядер. По мере созревания клеток содержание гемоглобина в ядродержащих эритроцитах продолжает увеличиваться, а содержание РНК продолжает снижаться. Увеличение гемоглобина в эритроцитах заставляет ядро терять активность и

больше не синтезировать ДНК или РНК. Эксперименты подтвердили это потому, что гемоглобин проникает в ядро через поры ядерной мембраны и действует на нуклеогистоны, что приводит к инактивации хромосом и способствует ядерной конденсации. Поздний молодой эритроцит теряет способность к продолжению деления, позже его ядро концентрируется и выпадает, и затем поглощается мононуклеарным макрофагом или фрагментируется и растворяется в селезенке, и, таким образом, эритроцит становится ретикулоцитом без ядра. Гемоглобин больше не синтезируется на стадии зрелых эритроцитов. Согласно теории, по которой увеличение концентрации внутриклеточного гемоглобина приведет к потере активности ядра клетки, количество делений эритроцитов во время созревания и конечный размер клетки связаны со скоростью синтеза гемоглобина. По мере созревания клеток диаметр эритроидных клеток постепенно уменьшается, и объем клеток постепенно уменьшается. Это связано с тем, что некоторые органеллы (например, митохондрии, аппарат Гольджи, полирибосомы) для синтеза гемоглобина, белков матрикса и различных ферментов в клетке постепенно уменьшаются, а органеллы также постепенно дегенерируют и исчезают. Активность генов определяется экспрессией глобина в процессе созревания эритроцитов. Глобин составляет всего 0,1% белка в примитивных эритроцитах и достигает 95% до стадии ретикулоцитов. Известно, что синтез взрослого глобина происходит в основном за счет HbA ($\alpha 2\beta 2$), небольшого количества HbA2 ($\alpha 2\delta 2$) и HbF ($\alpha 2\gamma 2$). Время пролиферации эритроидных клеток можно оценить по способности синтеза ДНК цикла пролиферации клеток, меченных радионуклидом, время пролиферации примитивных эритроцитов составляет примерно 20 часов, ранних молодых эритроцитов примерно 16 часов, промежуточных молодых эритроцитов примерно от 25 до 30 часов, поздние молодые эритроциты не обладают способностью синтезировать ДНК и не являются пролиферативными клетками. Следовательно, нормальные эритроидные клетки-предшественники образуются из костного мозга, и для пролиферации и дифференцировки требуется примерно от 3 до 5 дней, пока новые ретикулоциты не выйдут из костного мозга. Затем ретикулоциты остаются в селезенке в течение 1-2 дней, продолжая созревать и изменяя липидный состав мембраны, а затем попадают в кровоток.

«Способность к желаемому уровню γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF)» означает, что по сравнению с уровнем γ -глобина или фетального гемоглобина, продуцируемого немодифицированными клетками EV после дифференцировки, уровень γ -глобина или фетального гемоглобина, продуцируемого модифицированными EV клетками после дифференцировки увеличивается, например, по меньшей мере в 0,2 раза, 0,3 раза, 0,4 раза, 0,5 раза, 1,0 раза, 1,5 раза, 2,0 раза, 2,5 раза, 3,0 раза, 3,5 раза, 4,0 раза,

4,5 раза, 5 раз, 5,5 раз, 6,0 раз и более. Например, в некоторых вариантах осуществления, по сравнению с немодифицированными CD34-положительными HSPC, модифицированные CD34-положительные HSPC продуцируют 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600% или более высокий уровень γ -глобина или фетального гемоглобина.

В вышеупомянутом варианте осуществления оценка способности первой популяции модифицированных CD34-положительных HSPC продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки относится к: оценке того, увеличивается ли уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемый модифицированными CD34-положительными HSPC с пониженной функцией BCL11A после дифференцировки, по меньшей мере примерно на 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33 %, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%%, 90%, 95%, 100% или 120%, по сравнению с уровнем γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемым немодифицированными CD34-положительными HSPC после дифференцировки.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа желаемый уровень фетального гемоглобина составляет более 6,5 г/дл, 7,0 г/дл, 7,5 г/дл, 8,0 г/дл, 8,5 г/дл, 9,0 г/дл, 9,5 г/дл, 10 г/дл, 10,5 г/дл или 11,0 г/дл периферической крови или более высокий уровень.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, в отношении желаемого уровня γ -глобина, модифицированные CD34-положительные HSPC продуцируют более чем примерно 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600% или более высокий уровень мРНК γ -глобулина по сравнению с немодифицированными CD34-положительными HSPC.

Вышеупомянутый уровень γ -глобулина или фетального гемоглобина (HbF) может быть обнаружен, например, путем детектирования мРНК γ -глобулина или гемоглобина (HbF) после того, как CD34-положительные HSPC дифференцируются до стадии, на которой безъядерные эритроциты составляют более 10 % (например, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%) от общего количества дифференцированной популяции клеток, тем самым сравнивая, увеличивается ли уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемого модифицированными CD34-положительными HSPC с пониженной функцией BCL11A после дифференцировки, по меньшей мере примерно на 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%,

39%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, или на 120%, по сравнению с уровнем γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемым немодифицированными CD34-положительными HSPC после дифференцировки.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные CD34-положительные HSPC с пониженной функцией BCL11A снижают функцию BCL11A путем модификации гена BCL11A в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека (например, генетическая модификация с помощью технологии CRISPR/Cas, включающей введение sgРНК, содержащей последовательность, выбранную из любой SEQ ID NO: от 3 до 25, в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники для редактирования гена BCL11A).

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа способность модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки оценивают на этапе оценки, включающем: 1) культивирование модифицированных EV клеток в условиях, позволяющих дифференцировку для получения популяции эритроцитов, и 2) определение уровня γ -глобулина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемого эритроцитами.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, способность модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки оценивают на этапе оценки, включающем: определение уровня мРНК γ -глобулина. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, способность модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки оценивают на этапе оценки, включающем: определение уровня белка фетального гемоглобина (HbF). В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, индивидуума не подвергали мобилизации или предварительной обработке CD34-положительных HSPC клеток перед этапом оценки.

В некоторых вариантах осуществления мобилизация CD34-положительных клеток HSPC включает введение субъекту GCSF и/или MozobilTM (Genzyme) или другого мобилизатора гемопоэтических стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, этап оценки повторяют по меньшей мере один раз (например, 2, 3, 4, 5 или более раз) перед этапом лечения.

Выделенные TR клетки можно модифицировать способом, идентичным или отличным от способа модификации модифицированных выделенных EV клеток. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, выделенные TR клетки

генетически модифицированы. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, способ включает генетическую модификацию выделенных TR клеток. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа, генетическая модификация включает генетическую модификацию выделенных TR клеток любым способом, выбранным из группы, состоящей из: нуклеазы с «цинковыми пальцами» (ZFN), эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), и коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR) или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения энхансер BCL11a (последовательность нуклеиновой кислоты, влияющая на экспрессию или функции BCL11a) в выделенных EV клетках или TR клетках разрушают путем генетической модификации (например, способом, выбранным из группы, состоящей из: ZFN, TALEN, CRISPR, редактирования РНК или РНКи). В отношении энхансера BCL11a см., например, публикацию Bauer et al., Science, Vol. 342, 2013, pp. 253-257. Пример энхансера BCL11a представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты между экзоном 2 и экзоном 3 гена BCL11a (например, нуклеиновая кислота, расположенная в или соответствующая положениям, записанным в hg38: +55:Chr2:60497676-60498941, +58:Chr2:60494251-60495546, +62:Chr2:60490409-60491734). Пример энхансера BCL11a представляет собой: +62 участок последовательности нуклеиновой кислоты между экзоном 2 и экзоном 3 гена BCL11a. Пример энхансера BCL11a представляет собой: +58 участок последовательности нуклеиновой кислоты между экзоном 2 и экзоном 3 гена BCL11a. В некоторых вариантах осуществления энхансер BCL11a представляет собой: +55 участок последовательности нуклеиновой кислоты между экзоном 2 и экзоном 3 гена BCL11a.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа функция BCL11A снижается путем модификации гена BCL11A в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа функция BCL11A снижается путем модификации CD34-положительных клеток HSPC по технологии CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления ингибитор функции BCL11A представляет собой молекулу белка или нуклеиновой кислоты, ингибирующую транскрипцию и/или экспрессию гена в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека. В некоторых вариантах осуществления ингибитор функции BCL11A представляет собой белок или молекулу нуклеиновой кислоты, интерферирующую, ингибирующую или разрушающую транскрипцию и/или экспрессию гена в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека. В некоторых вариантах осуществления ингибитор функции BCL11A представляет собой нуклеазу

(такую как ZFN и TALEN), пептидную нуклеиновую кислоту, антисмысловую РНК, миРНК, микроРНК интерферирующую, ингибирующую или разрушающую транскрипцию и/или экспрессию гена в области положений 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутого способа, редактирование генов применяют для разрушения геномной области BCL11A в положениях 60495197-60495346 на хромосоме 2 человека в гемопоэтической стволовой клетке с целью снижения функции BCL11A. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутого способа, редактирование генов представляет собой способ редактирования генов на основе нуклеазы с «цинковыми пальцами», редактирование генов TALEN или редактирование генов CRISPR/Cas, редактирование РНК или РНКи. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа редактирование генов представляет собой способ редактирования генов CRISPR/Cas9. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа целевая нуклеотидная последовательность генома BCL11A комплементарна любой последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: от 3 до 25.

В следующей таблице перечислены положения геномных последовательностей на хромосоме 2 человека, на которые нацелены sgРНК, представленные SEQ ID NO: от 3 до 25, и сайт расщепления для расщепления Cas9, запускаемого каждой sgРНК.

Сайт расщепления

Энхансер-7 BCL11A chr2: 60495203-60495222 chr2: 60495219

Название	Положение в последовательности генома человека	Сайт расщепления
Энхансер-7 BCL11A	chr2:60495203-60495222	chr2:60495219
Энхансер-8 BCL11A	chr2:60495208-60495227	chr2:60495224
Энхансер-9 BCL11A	chr2:60495217-60495236	chr2:60495233
Энхансер-10 BCL11A	chr2:60495218-60495237	chr2:60495234
Энхансер-11 BCL11A	chr2:60495219-60495238	chr2:60495235
Энхансер-14 BCL11A	chr2:60495221-60495240	chr2:60495223
Энхансер-12 BCL11A	chr2:60495222-60495241	chr2:60495238
Энхансер-13 BCL11A	chr2:60495223-60495242	chr2:60495239
Энхансер-15 BCL11A	chr2:60495228-60495247	chr2:60495244
Энхансер-16 BCL11A	chr2:60495229-60495248	chr2:60495245

Энхансер-17 BCL11A	chr2:60495230-60495249	chr2:60495246
Энхансер-18 BCL11A	chr2:60495231-60495250	chr2:60495247
Энхансер-19 BCL11A	chr2:60495234-60495253	chr2:60495250
Энхансер-20 BCL11A	chr2:60495235-60495254	chr2:60495251
Энхансер-2 BCL11A	chr2:60495236-60495255	chr2:60495238
Энхансер-1 BCL11A	chr2:60495247-60495266	chr2:60495263
Энхансер-6 BCL11A	chr2:60495252-60495271	chr2:60495268
Энхансер-5 BCL11A	chr2:60495253-60495272	chr2:60495269
Энхансер-4 BCL11A	chr2:60495257-60495276	chr2:60495273
Энхансер-3 BCL11A	chr2:60495264-60495283	chr2:60495280
Энхансер-22 BCL11A	chr2:60495299-60495318	chr2:60495301
Энхансер-23 BCL11A	chr2:60495319-60495338	chr2:60495335
Энхансер-21 BCL11A	chr2:60495320-60495339	chr2:60495336

SEQ ID NO: 3: sgPHK, обозначенная как энхансер-1 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-1), кодирующая последовательность sgPHK:

cacaggctccaggaagggtt

SEQ ID NO: 4: sgPHK, обозначенная как энхансер-2 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-2), кодирующая последовательность sgPHK:

atcagaggccaacccttcc

SEQ ID NO: 5: sgPHK, обозначенная как энхансер-3 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-3), кодирующая последовательность sgPHK:

ctaacagttgcttttatcac

SEQ ID NO: 6: sgPHK, обозначенная как энхансер-4 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-4), кодирующая последовательность sgPHK:

ttgcttttatcacaggctcc

SEQ ID NO: 7: sgPHK, обозначенная как энхансер-5 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-5), кодирующая последовательность sgPHK:

ttttatcacaggctccagga

SEQ ID NO: 8: sgPHK, обозначенная как энхансер-6 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-6), кодирующая последовательность sgPHK:

tttatcacaggctccagga

SEQ ID NO: 9: sgPHK, обозначенная как энхансер-7 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-7), кодирующая последовательность sgPHK:

tgggtgggtagaaggagac

SEQ ID NO: 10: sgPHK, обозначенная как энхансер-8 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-8), кодирующая последовательность sgPHK:

gggcgtgggtgggtagaag

SEQ ID NO: 11: sgPHK, обозначенная как энхансер-9 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-9), кодирующая последовательность sgPHK:

ttagggtggggcggtgggtg

SEQ ID NO: 12: sgPHK, обозначенная как энхансер-10 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-10), кодирующая последовательность sgPHK:

attagggtggggcggtgggt

SEQ ID NO: 13: sgPHK, обозначенная как энхансер-11 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-11), кодирующая последовательность sgPHK:

gattagggtggggcggtggg

SEQ ID NO: 14: sgPHK, обозначенная как энхансер-12 BCL11A (иногда сокращенно называемая как энхансер-12), кодирующая последовательность sgPHK:

tctgattagggtggggcggt

SEQ ID NO: 15: sgPHK, обозначенная как энхансер-13 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-13), кодирующая последовательность sgPHK:

ctctgattagggtggggcg

SEQ ID NO: 16: sgPHK, обозначенная как энхансер-14 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-14), кодирующая последовательность sgPHK:

cacgccccaccctaatacag

SEQ ID NO: 17: sgPHK, обозначенная как энхансер-15 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-15), кодирующая последовательность sgPHK:

ttggcctctgattagggtg

SEQ ID NO: 18: sgPHK, обозначенная как энхансер-16 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-16), кодирующая последовательность sgPHK:

tttggcctctgattagggtg

SEQ ID NO: 19: sgPHK, обозначенная как энхансер-17 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-17), кодирующая последовательность sgPHK:

gtttggcctctgattagggt

SEQ ID NO: 20: sgPHK, обозначенная как энхансер-18 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-18), кодирующая последовательность sgPHK:

ggtttggcctctgattagggt

SEQ ID NO: 21: sgPHK, обозначенная как энхансер-19 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-19), кодирующая последовательность sgPHK:

aagggtttggcctctgatta

SEQ ID NO: 22: sgPHK, обозначенная как энхансер-20 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-20), кодирующая последовательность sgPHK:

gaagggtttggcctctgatt

SEQ ID NO: 23: sgPHK, обозначенная как энхансер-21 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-21), кодирующая последовательность sgPHK:

actcttagacataacacacc

SEQ ID NO: 24: sgPHK, обозначенная как энхансер-22 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-22), кодирующая последовательность sgPHK:

cttcaaagttgtattgaccc

SEQ ID NO: 25: sgPHK, обозначенная как энхансер-23 BCL11A (иногда сокращенно называемая энхансером-23), кодирующая последовательность sgPHK:

ctcttagacataacacacca.

После анализа сайтов расщепления указанных выше 23 sgPHK было обнаружено, что сайты расщепления для расщепления Cas9, запускаемого такими sgPHK, сконцентрированы в геномной области положений 60495219-60495336 гена BCL11A.

В общих чертах, направляющая последовательность в sgPHK представляет собой любую полинуклеотидную последовательность, которая имеет достаточную комплементарность с последовательностью-мишенью для гибридизации с последовательностью-мишенью и управления специфическим для последовательности связыванием комплекса CRISPR с последовательностью-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, когда для оптимального выравнивания применяют соответствующий алгоритм выравнивания, степень комплементарности между направляющей последовательностью и ее соответствующей целевой последовательностью составляет примерно или более чем примерно 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99 % или более. Оптимальное выравнивание может быть определено любым подходящим алгоритмом выравнивания последовательностей, и неограничивающие примеры включают: алгоритм Смита-Уотермана, алгоритм Нидлмана-Вимша, алгоритм на основе преобразования Барроуза-Уиллера (например, выравнивание Барроуза-Уиллера), ClustalW, Clustal X, BLAT, Novoalign (Novocraft Technologies), ELAND (Illumina, Сан-Диего, Калифорния), SOAP (доступно по адресу: soap.genomics.org.cn) и Maq (доступно по адресу: maq.sourceforge.net). В некоторых вариантах осуществления длина направляющей последовательности может быть примерно или более чем примерно 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 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина направляющей

последовательности составляет менее чем примерно 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12 или менее нуклеотидов. Способность направляющей последовательности управлять специфическим для последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью может быть оценена любым подходящим способом анализа. Например, компоненты системы CRISPR (содержащие тестируемую направляющую последовательность), достаточные для образования комплекса CRISPR, могут быть предоставлены для клетки-хозяина с соответствующей целевой последовательностью, например, это может быть выполнено путем трансфекции вектором, кодирующим компоненты последовательности CRISPR, а затем оценка предпочтительного расщепления в целевой последовательности (как определено Surveyor, как описано в настоящем документе). Аналогично, расщепление целевой полинуклеотидной последовательности можно проводить в пробирке путем предоставления компонентов целевой последовательности, комплекса CRISPR (включающего тестируемую направляющую последовательность и управляющую направляющую последовательность, отличную от направляющей последовательности), затем сравнивая скорость связывания или расщепления тестируемой последовательности и контрольной направляющей последовательности на целевой последовательности, тем самым выполняя оценку. Другие способы анализа, известные специалистам в данной области техники, также можно применять для выполнения вышеуказанного определения и оценки.

В некоторых вариантах осуществления sgРНК, применяемая в процессе редактирования гена, химически модифицирована. «Химически модифицированная sgРНК» относится к специальной химической модификации sgРНК, такой как модификация 2'-О-метильного аналога по 3 основаниям его 5'- и 3'-концов и/или межнуклеотидная 3'-тио модификация.

Химически модифицированная sgРНК имеет по меньшей мере два следующих преимущества. Во-первых, поскольку sgРНК представляет собой одноцепочечную форму РНК с очень коротким периодом полураспада, после попадания в клетку она будет быстро распадаться (максимум 12 часов), в то время как белку Cas9 требуется не менее 48 часов, чтобы связать sgРНК для выполнения редактирования генов. Следовательно, химически модифицированная sgРНК принимается, после попадания в клетку она стабильно экспрессируется, и после объединения с белком Cas9 редактирование гена может быть эффективно выполнено в геноме для получения инсерционно-делеционных мутаций. Во-вторых, немодифицированная sgРНК имеет плохую способность проникать через клеточные мембраны и не может эффективно проникать в клетки или ткани для

выполнения соответствующих функций. Способность химически модифицированной sgPНК проникать через клеточные мембраны обычно повышается. В настоящем изобретении можно применять способы химической модификации, обычно используемые в данной области техники, при условии, что они могут улучшать стабильность sgPНК (увеличивая период полувыведения) и повышать способность проникать через клеточную мембрану. В дополнение к конкретным химическим модификациям, используемым в примерах, также могут применяться другие способы модификации, например, способы химической модификации, описанные в следующих публикациях: Deleavey GF1, Damha MJ. Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing. *Chem Biol.* 2012 Aug 24; 19(8):937-54, и Hendel et al., Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat Biotechnol.* 2015 Sep; 33(9):985-989.

В некоторых вариантах осуществления sgPНК и/или нуклеотиды, кодирующие Cas9 (такие как мPНК), вводят в гемопоэтические стволовые клетки посредством электротрансдукции, например, путем введения в гемопоэтические стволовые клетки в условиях электропорации: от 250 до 360 В, от 0,5 до 1 мс; от 250 до 300 В, от 0,5 до 1 мс; 250 В, 1 мс; 250 В 2 мс; 300 В, 0,5 мс; 300 В, 1 мс; 360 В, 0,5 мс; или 360 В, 1 мс. В некоторых вариантах осуществления sgPНК и нуклеотиды, кодирующие Cas9, совместно вводят в гемопоэтические стволовые клетки путем электропорации. В некоторых вариантах осуществления sgPНК вводят в гемопоэтические стволовые клетки, экспрессирующие Cas9, путем электротрансдукции.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды, кодирующие Cas9, представляют собой мPНК, например, мPНК, содержащую кэп ARCA. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды, кодирующие Cas9, находятся в вирусном векторе, таком как лентивирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды, кодирующие Cas9, содержат последовательность, представленную SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления sgPНК и нуклеотиды, кодирующие Cas9, находятся в одном и том же векторе.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа sgPНК, содержащую любую последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: от 3 до 25, вводят в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники для редактирования гена BCL11A, тем самым снижая функцию BCL11A. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа sgPНК модифицирована 2'-О-метилловым аналогом и/или межнуклеотидным 3'-тио. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа химическая модификация представляет собой модификацию 2'-О-метильного аналога у первого, первых двух и/или

первых трех оснований 5'-конца и/или у последнего основания 3'-конца sgPНК. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа sgPНК и нуклеотиды, кодирующие Cas9, вводят совместно в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа sgPНК и нуклеотиды, кодирующие Cas9, совместно вводят в гемопоэтическую стволовую клетку путем электропорации. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа условия электропорации составляют от 200 до 600 В, от 0,5 до 2 мс.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа мобилизация CD34-положительных HSPC на этапе лечения включает: лечение индивидуума гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (GCSF) и/или плериксафором.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа этап лечения дополнительно включает: предварительную обработку индивидуума перед введением модифицированных TR клеток.

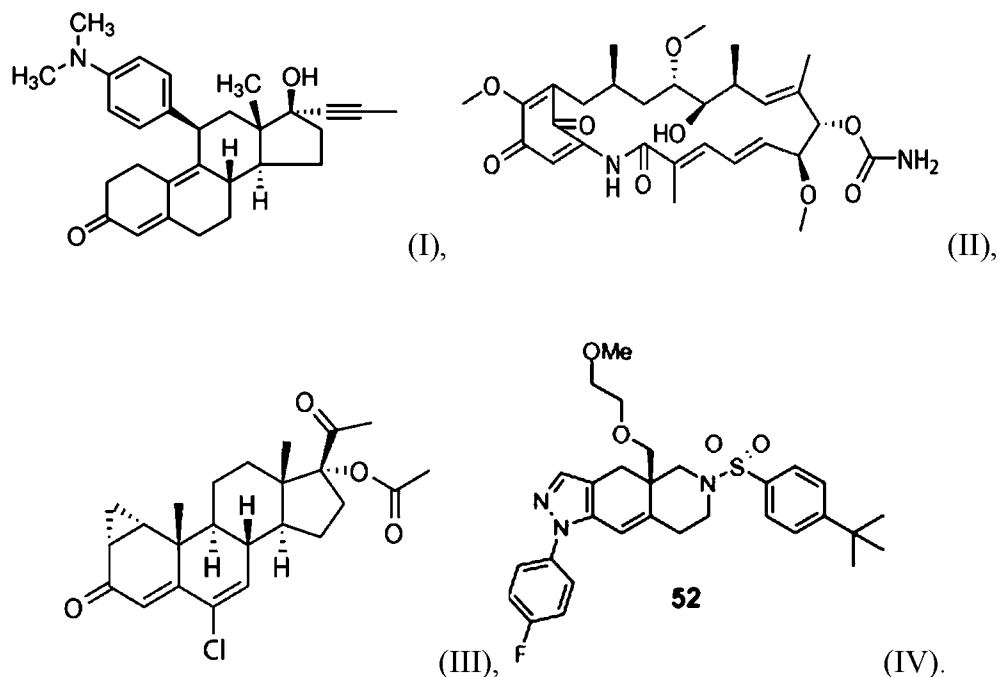
В некоторых вариантах осуществления предварительная обработка включает химиотерапию, терапию моноклональными антителами или системное облучение. В некоторых вариантах осуществления химиотерапия включает введение индивидууму одного или более химиотерапевтических агентов, выбранных из группы, состоящей из бусульфана, циклофосфида и флударабина.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа популяцию модифицированных EV клеток культивируют *in vitro* для дальнейшей дифференцировки в клетки-предшественники эритроцитов или зрелые эритроциты, экспрессирующие γ -глобин или фетальный гемоглобин.

В некоторых вариантах осуществления клетки-предшественники эритроцитов представляют собой клетки-предшественники, способные экспрессировать γ -глобин или фетальный гемоглобин до того, как станут зрелыми эритроцитами.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутого способа среду для экспансии эритроидных клеток и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток применяют для выполнения экспансии эритроидных клеток и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток на популяции модифицированных EV клеток, где среда для экспансии эритроидных клеток и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток содержит: базальную среду и композицию факторов роста, и где композиция факторов роста содержит: фактор роста стволовых клеток (SCF), интерлейкин-3 (IL-3) и эритропоэтин (EPO). В некоторых вариантах осуществления также включен этап выполнения дифференцировки эритроидных клеток и денуклеации

гемопоэтических стволовых клеток с применением среды для дифференцировки и денуклеации эритроидных клеток, где среда для дифференцировки и денуклеации эритроидных клеток содержит: базальную среду, факторы роста и антагонисты и/или ингибиторы рецептора прогестерона и рецептора глюкокортикоидов. В некоторых вариантах осуществления факторы роста в среде для дифференцировки и денуклеации эритроидных клеток включают эритропоэтин (EPO), и антагонисты и/или ингибиторы рецептора прогестерона и рецептора глюкокортикоидов представляют собой один, два или более, выбранных из группы, состоящей из следующих соединений (I)-(IV):



В некоторых вариантах осуществления среда для экспансии эритроидных клеток и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток включает: базальную среду и добавки факторов роста, где базальная среда может быть выбрана из любой бессывороточной базальной среды, такой как STEMSPAN™ SFEM II (STEM CELLS TECHNOLOGY Inc.) или IMDM (модифицированная среда Дульбекко Iscove), необязательно с добавлением ITS (Thermofisher), L-гулутамина (Thermofisher), витамина C и/или бычьего сывороточного альбумина, где добавка фактора роста представляет собой любую добавку, выбранную из группы, состоящей из IL-3, SCF и EPO, или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа клетки-предшественники эритроцитов, такие как эритробласты, ядерные эритроциты, молодые эритроциты и ретикулоциты, получают через от 5 до 10 дней, например, от 6 до 10 дней или от 7 до 10 дней экспансии и дифференцировки популяции модифицированных EV клеток. Клетки-предшественники эритроцитов затем подвергают обработке в течение

примерно от 4 до 14 дней, например, примерно 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней дифференцировки (или дифференцировки и денуклеации), чтобы получить зрелые эритроциты.

В некоторых вариантах осуществления этап дифференцировки популяции модифицированных EV клеток в зрелые эритроциты, продуцирующие желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), может включать:

а) получение CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников (выделенные CD34-положительные HSPC) из периферической крови человека (с или без мобилизации гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге) или костного мозга,

б) генетическую модификацию вышеуказанных CD34-положительных HSPC для снижения функции BCL11A,

с) добавление дополнительных факторов роста в бессывороточную среду (SFME) для выполнения от 5 до 10 дней, например, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней и 10 дней экспансии и дифференцировки, тем самым дифференцируя HSPC в клетки-предшественники эритроцитов,

д) добавление дополнительных факторов роста в бессывороточную среду (SFME) для выполнения примерно от 4 до 14 дней (например, примерно 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более дней) дифференцировки с получением зрелых эритроцитов. В некоторых вариантах осуществления среда для дифференцировки эритроидных клеток и денуклеации гемопоэтических стволовых клеток включает: базальную среду, факторы роста и химические низкомолекулярные добавки, где базальная среда представляет собой бессывороточную базальную среду, такую как STEMSPANTM SFEM II (STEM CELLS Technology Inc.), IMDM (модифицированная среда Дульбекко Iscove), необязательно с добавлением ITS (ThermoFisher), L-гулутамина (ThermoFisher), витамина C и/или бычьего сывороточного альбумина, факторов роста и химических низкомолекулярных добавок, содержащих EPO, трансферрин человека и/или химическую небольшую молекулу мифепристон.

Модифицированные CD34-положительные HSPC (популяция EV клеток) дифференцируются с образованием мРНК γ -глобина или гемоглобина (HbF), которые могут быть обнаружены обычными способами в данной области техники. Например, когда модифицированные CD34-положительные HSPC (популяция EV клеток) дифференцируются до стадии, на которой безъядерные эритроциты составляют более 10% (например, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%) от общего числа клеток популяции дифференцированных клеток, уровень образующегося γ -глобина или

фетального гемоглобина (HbF) может быть определен обычными способами в данной области техники; сравнение уровня γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемого модифицированными CD34-положительными HSPC с пониженной функцией BCL11A после дифференцировки, выше по сравнению с уровнем γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемого немодифицированными CD34-положительными HSPC после дифференцировки, если он увеличен по меньшей мере примерно на 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% или 120%, что указывает на то, что способ по настоящему изобретению можно применять для лечения. Любую обычно применяемую базальную среду можно применять в указанной выше среде для экспансии эритроидных клеток и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток и в среде для дифференцировки эритроидных клеток и денуклеации гемопоэтических стволовых клеток, такую как STEMSPANTM SFEM II (приобретенную у STEM CELL TECHNOLOGIES), например, IMDM, DF12, Knockout DMEM, RPMI 1640, Alpha MEM, DMEM и т.д., приобретенные у Thermo Fisher. Кроме того, при необходимости к указанным базальным средам можно дополнительно добавить другие компоненты, например, ITS (то есть, в основном содержащие инсулин, трансферрин человека и селен), L-глутамин, витамин C и бычий сывороточный альбумин. Например, ITS, 2 mM L-глутамин, от 10 до 50 мкг/мл витамина C и от 0,5 до 5 мас.% BSA (бычий сывороточный альбумин) можно добавить в среду IMDM. Кроме того, указанный выше DF12 можно добавить с такой же концентрацией ITS, L-глутамин, витамина C и бычьего сывороточного альбумина. Knockout DMEM можно добавить с той же концентрацией ITS, L-глутамин, витамина C и бычьего сывороточного альбумина, RPMI 1640 можно добавить с такой же концентрацией ITS, L-глутамин, витамина C и бычьего сывороточного альбумина, Alpha MEM можно добавить с той же концентрацией ITS, L-глутамин, витамина C и бычьего сывороточного альбумина, DMEM также можно добавить с такой же концентрацией ITS, L-глутамин, витамина C и бычьего сывороточного альбумина. В данном документе, концентрация дополнительных ITS в различных базальных средах может составлять: 0,1 мкг/мл концентрации инсулина, 0,0055 мкг/мл трансферрина человека и $6,7 \times 10^{-6}$ мкг/мл селена. Кроме того, концентрация каждого компонента дополнительной ITS также может быть скорректирована в соответствии с фактическими потребностями. ITS можно приобрести в Thermofisher и при необходимости отрегулировать до соответствующей конечной рабочей концентрации.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа популяцию модифицированных TR клеток не подвергают пролиферации *ex vivo* или *in vitro* перед введением индивидууму. В конкретном варианте осуществления модифицированные TR клетки можно промывать для удаления лечебных реагентов и вводить пациенту без пролиферации *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления модифицированные TR клетки вводят пациенту до возникновения любого значительного деления клеток *ex vivo* или до времени, необходимого для любого значительного деления клеток *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления после модификации модифицированные TR клетки культивируют в течение одного или более дней перед введением индивидууму. В некоторых вариантах осуществления после модификации модифицированные TR клетки вводят пациенту в течение 2, 4, 6, 12, 24 или 48 часов.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные TR клетки хранят в условиях замораживания по меньшей мере 24 часа перед введением индивидууму. В некоторых вариантах осуществления модифицированные TR клетки культивируют в течение одного или более дней перед хранением в условиях замораживания. Модифицированные TR клетки можно культивировать в бессывороточной базальной среде с добавлением цитокинов, поддерживающих жизнеспособность клеток в течение одного или более дней (например, от 1 до 3 дней), цитокин представляет собой, например, SCF (фактор стволовых клеток), TPO (тромбопоэтин), FLT-3L (FMS-подобный лиганд тирозинкиназы-3) или IL-6 (интерлейкин-6). Например, клетки можно культивировать в среде для роста стволовых клеток (CellGenix) в течение одного или более дней (например, от 1 до 3 дней).

В некоторых вариантах осуществления выделенные TR клетки культивируют в течение одного или более дней перед модификацией, а затем выделенные TR клетки модифицируют.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа гемоглобинопатия выбрана из группы, состоящей из серповидно-клеточной анемии, носительства признака «серповидных клеток», гемоглобиноза C, носительства признака гемоглобиноза C, гемоглобиноза S/C, гемоглобиноза D, гемоглобиноза E, талассемии, расстройства, связанного с гемоглобином, с повышенным сродством к кислороду, расстройства, связанного с гемоглобином, с пониженным сродством к кислороду, болезни нестабильного гемоглобина и метгемоглобинемии. В некоторых вариантах осуществления изобретения гемоглобинопатия выбрана из группы, состоящей из: β -талассемии и серповидно-клеточной анемии. В некоторых вариантах осуществления гемоглобинопатия представляет собой β^0 - или β^+ -талассемию.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа индивидуум представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутого способа этап лечения выполняют сразу после этапа оценки.

В контексте настоящего описания термин «лечение» относится к достижению желаемых фармакологических и/или физиологических эффектов, включая, но не ограничиваясь ими: достижение улучшения или устранения симптомов заболевания. Эффект может быть профилактическим, проявляясь в виде полной или частичной профилактики заболевания или его симптомов, и/или эффект может быть терапевтическим, проявляясь как улучшение или устранение симптомов, или обеспечивая частичное или полное исчезновение заболевания или побочных эффектов, вызванных заболеванием. В контексте настоящего описания термин «лечение» включает любое лечение заболевания у млекопитающего, особенно человека, включающее: (a) предотвращение начала заболевания у индивидуума, (b) подавление заболевания, то есть предотвращение его развития, (c) облегчение заболевания, например, ремиссия заболевания, например, полное или частичное устранение симптомов заболевания, и (d) возвращение индивидуума к состоянию, предшествующему заболеванию, например, восстановление кровеносной системы. В контексте настоящего описания термин «лечение» не обязательно означает полное исчезновение или излечение заболевания или болезненного состояния или связанных с ним симптомов, и включает любое минимальное улучшение или облегчение любого одно или более измеримых проявлений заболевания или болезненного состояния. В конкретных способах, описанных выше, лечение включает улучшение восстановления кроветворения или выживаемости индивидуума.

Иллюстративные варианты осуществления:

1. Способ лечения гемоглобинопатии у человека, включающий:

а) этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников («CD34-положительные HSPC») продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»), и

б) этап лечения, включающий: введение второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC индивидууму, где модифицированные CD34-положительные

HSPC происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные TR клетки»).

2. Способ лечения гемоглобинопатии у индивидуума, включающий этап лечения, включающий: введение индивидууму второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC, где модифицированные CD34-положительные HSPC происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные TR клетки»), и

где индивидуум выбран для лечения на основе функциональной оценки на этапе оценки, включающем: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников («CD34-положительные HSPC») продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»).

3. Способ выбора индивидуума, страдающего гемоглобинопатией, для лечения второй популяцией модифицированных CD34-положительных HSPC, происходящих от индивидуума и модифицированных для снижения функции BCL11A («модифицированные TR клетки»), где способ включает этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных HSPC продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»), где, если первая популяция модифицированных CD34-положительных HSPC продуцирует желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), индивидуума выбирают для лечения.

4. Способ определения того, является ли индивидуум, страдающий гемоглобинопатией, подходящим или неподходящим для лечения второй популяцией модифицированных CD34-положительных HSPC («модифицированные TR клетки»), полученных от индивидуума и модифицированных для снижения функции BCL11A, где способ включает этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных HSPC продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»), и где, если первая популяция модифицированных CD34-положительных

HSPC продуцирует желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), индивидиуум является подходящим для лечения.

5. Способ определения того, является ли индивидиуум, страдающий гемоглобинопатией, подходящим или неподходящим для лечения второй популяцией модифицированных CD34-положительных HSPC («модифицированных TR клеток»), полученных от индивидиуума и модифицированных для снижения функции BCL11A, где способ включает: этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных HSPC продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидиуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»), и где, если первая популяция модифицированных CD34-положительных HSPC не продуцирует желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), индивидиуум является неподходящим для лечения модифицированными TR клетками.

6. Способ по любому из вариантов осуществления 1-5, где этап оценки включает:

a) выделение CD34-положительных HSPC из образца костного мозга или периферической крови индивидиуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC («выделенные EV клетки»),

b) модификацию выделенных EV клеток для получения первой популяции модифицированных CD34-положительных клеток HSPC с пониженной функцией BCL11A («модифицированные EV клетки»), и

c) оценку способности модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки.

7. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6, где этап лечения включает:

a) мобилизацию CD34-положительных HSPC в костном мозге индивидиуума для увеличения количества CD34-положительных HSPC в периферической крови,

b) выделение CD34-положительных HSPC из периферической крови индивидиуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC («выделенные TR клетки»),

c) модификацию выделенных TR клеток для получения второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC с пониженной функцией BCL11A («модифицированные TR клетки»), и

d) введение индивидиууму эффективного количества модифицированных TR клеток.

8. Способ лечения гемоглобинопатии у индивидиуума, включающий:

1) этап оценки, включающий:

а) выделение CD34-положительных HSPC из образца костного мозга или периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC («выделенные EV клетки»),

б) модификацию выделенных EV клеток для получения первой популяции модифицированных CD34-положительных клеток HSPC с пониженной функцией BCL11A («модифицированные EV клетки»), и

с) оценку способности модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, и

2) этап лечения, включающий:

а) мобилизацию CD34-положительных HSPC у индивидуума в периферической крови,

б) выделение CD34-положительных HSPC из периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC («выделенные TR клетки»),

с) модификацию выделенных TR клеток для получения второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC с пониженной функцией BCL11A («модифицированные TR клетки»), и

д) введение индивидууму эффективного количества модифицированных TR клеток.

9. Способ по любому из вариантов осуществления 1-8, где модифицированные EV клетки модифицированы путем генетической модификации.

10. Способ по любому из вариантов осуществления 6-8, где модификация выделенных EV клеток включает генетическую модификацию выделенных EV клеток.

11. Способ по варианту осуществления 9 или 10, где выделенные EV клетки генетически модифицированы способом, выбранным из группы, состоящей из нуклеазы с «цинковыми пальцами» (ZFN), эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), и коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), редактирования РНК, интерференции РНК.

12. Способ по любому из вариантов осуществления 1-11, где способность модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки оценивают на этапе оценки, включающем: 1) культивирование модифицированных EV клеток в условиях, позволяющих дифференцировку для получения популяции эритроцитов, и 2) определение уровня γ -глобулина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемого эритроцитами.

13. Способ по любому из вариантов осуществления 1-12, где способность модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки оценивают на этапе оценки, включающем: определение уровня мРНК γ -глобулина.

14. Способ по любому из вариантов осуществления 1-12, где способность модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки оценивают на этапе оценки, включающем: определение уровня белка фетального гемоглобина (HbF).

15. Способ по любому из вариантов осуществления 1-14, где индивидуума не подвергают мобилизации или предварительному лечению перед этапом оценки.

16. Способ по любому из вариантов осуществления 1-15, где этап оценки повторяют по меньшей мере один раз перед этапом лечения.

17. Способ по любому из вариантов осуществления 1-16, где модифицированные TR клетки модифицируют путем генетической модификации.

18. Способ по любому из вариантов осуществления 7-16, где модификация выделенных TR клеток включает генетическую модификацию выделенных TR клеток.

19. Способ по варианту осуществления 17 или 18, где выделенные TR клетки генетически модифицированы способом, выбранным из группы, состоящей из: нуклеазы с «цинковыми пальцами» (ZFN), эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), и коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), редактирования РНК, интерференции РНК.

20. Способ по любому из вариантов осуществления 7-19, где мобилизация CD34-положительных HSPC на этапе лечения включает: лечение индивидуума гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (G-CSF) и/или плериксафором.

21. Способ по любому из вариантов осуществления 1-20, где этап лечения дополнительно включает: предварительную обработку индивидуума перед введением модифицированных TR клеток.

22. Способ по варианту осуществления 21, где предварительная обработка включает химиотерапию, терапию моноклональными антителами или системное облучение.

23. Способ по варианту осуществления 22, где предварительная обработка включает химиотерапию.

24. Способ по варианту осуществления 23, где химиотерапия включает введение индивидууму одного или более химиотерапевтических агентов, выбранных из группы, состоящей из: бусульфана, циклофосфида и флударабина.

25. Способ по любому из вариантов осуществления 7-24, где выделенные TR клетки культивируют в течение одного или более дней перед модификацией.

26. Способ по любому из вариантов осуществления 7-25, где модифицированные TR клетки культивируют в течение одного или более дней перед введением индивидууму.

27. Способ по любому из вариантов осуществления 1-26, где модифицированные TR клетки хранят в условиях замораживания в течение по меньшей мере 24 часов перед введением модифицированных TR клеток индивидууму.

28. Способ по варианту осуществления 27, где модифицированные TR клетки культивируют в течение одного или более дней перед хранением в условиях замораживания.

29. Способ по любому из вариантов осуществления 1-28, где гемоглинопатия представляет собой заболевание, выбранное из группы, состоящей из серповидно-клеточной анемии, носительства признака «серповидных клеток», гемоглиноза С, носительства признака гемоглиноза С, гемоглиноза S/C, гемоглиноза D, гемоглиноза E, талассемии, расстройства, связанного с гемоглином, с повышенным сродством к кислороду, расстройства, связанного с гемоглином, с пониженным сродством к кислороду, болезни нестабильного гемоглибина и метгемоглинемии.

30. Способ по варианту осуществления 29, где гемоглинопатия выбрана из группы, состоящей из β -талассемии и серповидно-клеточной анемии.

31. Способ по варианту осуществления 30, где гемоглинопатия представляет собой β^0 - или β^+ -талассемию.

32. Способ по любому из вариантов осуществления 1-31, где индивидуум представляет собой человека.

33. Способ по любому из вариантов осуществления 1-32, где этап лечения выполняют сразу после этапа оценки.

В некоторых конкретных вариантах осуществления всех вышеупомянутых вариантов осуществления оценка способности первой популяции модифицированных CD34-положительных HSPC продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглибина (HbF) после дифференцировки относится к: оценке того, увеличивается ли уровень γ -глобина или фетального гемоглибина (HbF), продуцируемый модифицированными CD34-положительными HSPC с пониженной функцией BCL11A после дифференцировки по меньшей мере примерно на 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 120 %, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550% или 600% от

уровня γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемого немодифицированными CD34-положительными HSPC после дифференцировки.

Настоящая заявка также включает следующие варианты осуществления

1. Применение модифицированных TR клеток для получения лекарственного средства для применения в способе лечения гемоглобинопатии у индивидуума, где способ включает:

а) этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников («CD34-положительные HSPC») продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»), и

б) этап лечения, включающий: введение второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC индивидууму, где модифицированные CD34-положительные HSPC происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные TR клетки»).

2. Применение модифицированных TR клеток для получения лекарственного средства для применения в способе лечения гемоглобинопатии у индивидуума, где способ включает этап лечения, включающий: введение второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC индивидууму, где модифицированные CD34-положительные HSPC происходят от индивидуума и модифицированы для уменьшения функции BCL11A («модифицированные TR клетки»), и

где индивидуум выбран для лечения на основе функциональной оценки на этапе оценки, включающем: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников («CD34-положительные HSPC») продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»).

3. Применение модифицированных EV клеток для получения продукта для применения в способе определения того, является ли подходящим или неподходящим индивидуум, страдающий гемоглобинопатией, для лечения второй популяцией модифицированных CD34-положительных HSPC («модифицированные TR клетки»), полученных от индивидуума и модифицированных для снижения функции BCL11A, где

способ включает этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных HSPC продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A («модифицированные EV клетки»), и если первая популяция модифицированных CD34-положительных HSPC продуцирует желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) индивидуум является подходящим для лечения, где, если первая популяция модифицированных CD34-положительных HSPC не продуцирует желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), индивидуум является неподходящим для лечения модифицированными TR клетками.

4. Применение по любому из вариантов осуществления 1-3, где этап оценки включает:

a) выделение CD34-положительных HSPC из образца костного мозга или периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC («выделенные EV клетки»),

b) модификацию выделенных EV клеток для получения первой популяции модифицированных CD34-положительных клеток HSPC с пониженной функцией BCL11A («модифицированные EV клетки»), и

c) оценку способности модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки.

5. Применение по любому из вариантов осуществления 1-4, где этап лечения включает:

a) мобилизацию CD34-положительных HSPC в костном мозге индивидуума для увеличения количества CD34-положительных HSPC в периферической крови,

b) выделение CD34-положительных HSPC из периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC («выделенные TR клетки»),

c) модификацию выделенных TR клеток для получения второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC с пониженной функцией BCL11A («модифицированные TR клетки»), и

d) введение индивидууму эффективного количества модифицированных TR клеток.

6. Применение по любому из вариантов осуществления 1-5,

1) этап оценки включает:

а) выделение CD34-положительных HSPC из образца костного мозга или периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC («выделенные EV клетки»),

б) модификацию выделенных EV клеток для получения первой популяции модифицированных CD34-положительных клеток HSPC с пониженной функцией BCL11A («модифицированные EV клетки»), и

с) оценку способности модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, и

2) этап лечения включает:

а) мобилизацию CD34-положительных HSPC у индивидуума в периферической крови,

б) выделение CD34-положительных HSPC из периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC («выделенные TR клетки»),

с) модификацию выделенных TR клеток для получения второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC с пониженной функцией BCL11A («модифицированные TR клетки»), и

д) введение индивидууму эффективного количества модифицированных TR клеток.

7. Применение по любому из вариантов осуществления 1-6, где модифицированные EV клетки модифицированы путем генетической модификации.

8. Применение по любому из вариантов осуществления 4-6, где модификация выделенных EV клеток включает генетическую модификацию выделенных EV клеток.

9. Применение по варианту осуществления 7 или 8, где выделенные EV клетки генетически модифицированы способом, выбранным из группы, состоящей из: нуклеазы с «цинковыми пальцами» (ZFN), эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), и коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), редактирования РНК, интерференции РНК.

10. Применение по любому из вариантов осуществления 1-9, где способность модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки оценивают на этапе оценки, включающем: 1) культивирование модифицированных EV клеток в условиях, позволяющих дифференцировку для получения популяции эритроцитов, и 2) определение уровня γ -глобулина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемого эритроцитами.

11. Применение по любому из вариантов осуществления 1-10, где способность модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки оценивают на этапе оценки, включающем: определение уровня мРНК γ -глобулина.

12. Применение по любому из вариантов осуществления 1-10, где способность модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки оценивают на этапе оценки, включающем: определение уровня белка фетального гемоглобина (HbF).

13. Применение по любому из вариантов осуществления 1-12, где индивидуума не подвергают мобилизации или предварительного лечения перед этапом оценки.

14. Применение по любому из вариантов осуществления 1-13, где этап оценки повторяют по меньшей мере один раз перед этапом лечения.

15. Применение по любому из вариантов осуществления 1-14, где модифицированные TR клетки модифицированы путем генетической модификации.

16. Применение по любому из вариантов осуществления 5-14, где модификация выделенных TR клеток включает генетическую модификацию выделенных TR клеток.

17. Применение по варианту осуществления 15 или 16, где выделенные TR клетки генетически модифицированы способом, выбранным из группы, состоящей из: нуклеазы с «цинковыми пальцами» (ZFN), эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), и коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), редактирования РНК, интерференции РНК.

18. Применение по любому из вариантов осуществления 5-17, где мобилизация CD34-положительных HSPC на этапе лечения включает: лечение индивидуума гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (GCSF) и/или плериксафором.

19. Применение по любому из вариантов осуществления 1-18, где этап лечения дополнительно включает: предварительную обработку индивидуума перед введением модифицированных TR клеток.

20. Применение по варианту осуществления 19, где предварительное лечение включает химиотерапию, терапию моноклональными антителами или системное облучение.

21. Применение по варианту осуществления 20, где предварительное лечение включает химиотерапию.

22. Применение по варианту осуществления 21, где химиотерапия включает введение индивидууму одного или более химиотерапевтических агентов, выбранных из группы, состоящей из: бусульфана, циклофосфида и флударабина.

23. Применение по любому из вариантов осуществления 5-22, где выделенные TR клетки культивируют в течение одного или более дней перед модификацией.

24. Применение по любому из вариантов осуществления 5-23, где модифицированные TR клетки культивируют в течение одного или более дней перед введением индивидууму.

25. Применение по любому из вариантов осуществления 1-24, где модифицированные TR клетки хранят в условиях замораживания в течение по меньшей мере 24 часов перед введением модифицированных TR клеток индивидууму.

26. Применение по варианту осуществления 25, где модифицированные TR клетки культивируют в течение одного или более дней перед хранением в условиях замораживания.

27. Применение по любому из вариантов осуществления 1-26, где гемоглобинопатия представляет собой заболевание, выбранное из группы, состоящей из: серповидно-клеточной анемии, носительства признака «серповидных клеток», гемоглобиноза C, носительства признака гемоглобиноза C, гемоглобиноза S/C, гемоглобиноза D, гемоглобиноза E, талассемии, расстройства, связанного с гемоглобином, с повышенным сродством к кислороду, расстройства, связанного с гемоглобином, с пониженным сродством к кислороду, болезни нестабильного гемоглобина и метгемоглобинемии.

28. Применение по варианту осуществления 27, где гемоглобинопатия выбрана из группы, состоящей из β -талассемии и серповидно-клеточной анемии.

29. Применение по варианту осуществления 28, где гемоглобинопатия представляет собой β^0 - или β^+ -талассемию.

30. Применение по любому из вариантов осуществления 1-29, где индивидуум представляет собой человека.

31. Применение по любому из вариантов осуществления 1-30, где этап лечения выполняют сразу после этапа оценки.

В некоторых конкретных вариантах осуществления всех вышеупомянутых вариантов осуществления оценка способности первой популяции модифицированных CD34-положительных HSPC продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки относится к: оценке того, увеличивается ли уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемый модифицированными CD34-положительными HSPC с пониженной функцией BCL11A после дифференцировки, по меньшей мере примерно на 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19 %, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%,

34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 120%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550% или 600% от уровня γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемого немодифицированными CD34-положительными HSPC после дифференцировки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Редактирование генов энхансера BCL11A гемопоэтических стволовых клеток.

Данный пример включает редактирование генов сайтов эритроидного энхансера BCL11A CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток, полученных из мобилизованной периферической крови пациента с талассемией и здорового донора с помощью системы CRISPR/Cas9.

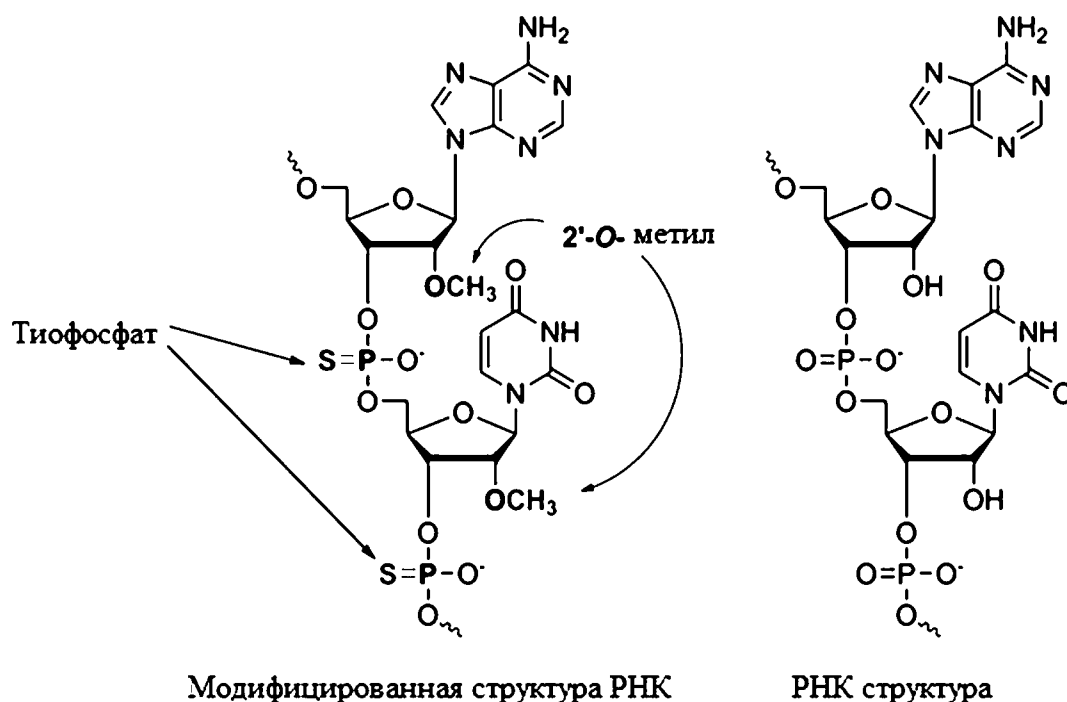
Программное обеспечение «CRISPR RGEN TOOLS» применяют для разработки sgPHK, нацеленной на сайт BCL11A(+58), и синтезируют две химически модифицированные sgPHK. Информация о последовательности следующая: sgPHK-1: ctaacagttgctttatcac (SEQ ID NO: 5), sgPHK-2: atcagaggccaaacccttc (SEQ ID NO: 4). Информация о кодирующей последовательности мPHK Cas9 представлена далее:

gacaagaagtagcatcggcctggacatcgccaccaactctgtgggtgggcccgtgatcaccgacgagtacaaggtgccca
gcaagaaattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaac
agccgaggccacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaaccggatctgctatctgcaagagatcttcagc
aacgagatggccaaggtggacgacagcttctccacagactggaagagtccttctggtggaaggataagaagcacgagcggcacc
catcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtacccaccatctaccacctgagaaagaaactggtggacgacccg
acaaggccgacctgcggctgatctatctggccctggcccacatgatcaagttccggggccacttctgatcgaggcgacctgaacccg
acaacagcgacgtggacaagctgttcacagctggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaaccccatcaacgccagcggcgtg
gacgccaaggccatcctgtctgccagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgccagctgcccggcgagaagaagaatg
gcctgttcggcaacctgattgccctgagcctgggcctgaccccaacttcaagagcaacttcgacctggccgaggatgccaactgcagct
gagcaaggacacctacgacgacacctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccccaagaac
ctgtccgacgccatcctgtgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggccccctgagcgctctatgatcaagagatac
gacgagcaccaccaggacctgacctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagattttctcgaccagagc
aagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccaggaaggttctacaagttcatcaagccatcctggaaaagatggacgg
caccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatccccaccagatc
cacctgggagagctgcacgccattctcggcgggcaggaagattttaccattcctgaaggacaacggggaaaagatcgagaagatcctg
accttcgcatccctactacgtgggccccttgccaggggaaacagcagattcgctggatgaccagaaagagcgaggaaacctcac
cccctggaacttcgaggaagtgggtggacaagggcgcttcgcccagagcttcatcgagcggatgaccaacttcgataagaacctgccaa
cgagaaggtgctgccaagcacagcctgctgtacgagtactcaccgtgtataacgagctgaccaaagtgaatacgtgaccgagggaat

gagaaagcccgccttctgagcggcgagcagaaaaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgacctgaagcag
ctgaaagaggactacttcaagaaaatcgagtgttcgactccgtggaaatctccggcggtgaagatcggttcaacgcctccctgggcacat
accacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttctggacaatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgacctgac
actgtttgaggacagagagatgatcgaggaacgggtgaaaacctatgccacctgttcgacgacaaagtgatgaagcagctgaagcggc
ggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccgggacaagcagtcggcaagacaatcctggatttctt
gaagtccgacggcttcgccaacagaaattcatgcagctgatccacgacgacagcctgaccttaagaggacatccagaaagcccaggt
gtccggccaggcgcatagcctgcacgagcacattgccaatctggccggcagccccgccattaagaagggcacatcctgcagacagtgaag
gtggtggacgagctcgtgaaagtgtggccggcacaagcccagaaacatcgtgatcgaaatggccagagagaaccagaccaccag
aaggacagagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagaggcatcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccc
cgtggaaaacaccagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatggcggggatgtgtgctggaccaggaactggacat
caaccggctgtccgactacgatgtggaccatatcgtgcctcagagctttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagc
gacaagaaccggggcaagagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagctgctgaacgcc
aagctgattaccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaagag
acagctggtggaaacccggcagatcacaagcacgtggcacagatcctggactcccggatgaacactaagtacgacgagaatgacaag
ctgatccgggaagtgaagtgtaccctgaagtccaagctggtgtccgatttccggaaggatttccagtttacaaagtgcgcgagatcaa
caactaccaccacgcccacgacgcctacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaagcgagttcgt
gtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttcta
cagcaacatcatgaacttttcaagaccgagattacctggccaacggcgagatccggaagcggcctctgatcgagacaaacggcgaaac
cggggagatcgtgtgggataaggcggggatttgcaccgtgcggaaagtgtgagcatgccccaaagtgaatatcgtgaaaaagaccg
aggtgcagacaggcggcttcagcaaagagtctatcctgccaaagaggaaacagcgataagctgatcgccagaaaagaaggactgggaccc
taagaagtacggcggcttcgacagccccaccgtggcctattctgtgctggtgggccaagtggaaaagggaagtccaagaaactgaa
gagtgtgaaagagctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatccatcgactttctggaagccaagggtacaa
agaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgttcgagctggaaaacggccggaagagaatgctggcctctgccgg
cgaactgcagaagggaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttctgtacctggccagccactatgagaagctgaagggtc
ccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagtttccaa
gagagtgtcctggccgacgctaattcggacaaagtgtgtccgcctacaacaagcaccgggataagcccatcagagagcaggccgaga
atatcatccacctgtttacctgaccaatctgggagcccctgccgccttaagtactttgacaccaccatcgaccggaagaggtacaccagc
accaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacacggatcgacctgtctcagctgggaggcga
c (SEQ ID NO: 1).

Химический синтез sgPHK означает, что первые три основания на 5'-конце и последние три основания на 3'-конце sgPHK модифицированы с помощью модификации 2'-О-метильного аналога и межнуклеотидной 3'-тио модификации. Как показано в следующей химической формуле, левая сторона представляет собой химически модифицированную sgPHK, а правая часть представляет собой немодифицированную

sgРНК. Как мРНК Cas9, так и sgРНК приобретены в компании Trilink Biotechnologies, США.



Авторами изобретения выделены CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки из мобилизованной периферической крови 5 пациентов с талассемией и 2 здоровых доноров (образцы мобилизованной периферической крови взяты из Детского института гематологии и онкологии Нанфанг-Чуньфу). При выборе условий электропорации «300 В 1 мс» в электропораторе ВТХ ЕСМ830, синтезированные мРНК Cas9 и sgРНК-1 и sgРНК-2, синтезированные химической модификацией, соответственно вводят в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки от 5 пациентов и 2 здоровых доноров с помощью электропорации, через 4 дня после электропорации геном CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток экстрагируют и выбирают фрагмент общей длиной 903 п.о. (453 п.о. с левой стороны и 450 п.о. с правой стороны сайта расщепления sgРНК) для амплификации и секвенирования по Сэнгеру.

Прямой праймер: cacctcagcagaacaaagtatc (SEQ ID NO: 26)

Обратный праймер: gggaagctccaaactctcaa (SEQ ID NO: 27)

Статистический анализ эффективности генерации инсерционно-делеционных мутаций (Indels) выполняют на основе результатов секвенирования с помощью онлайн-программного обеспечения «Synthego ICE Analysis», где онлайн-программное обеспечение «Synthego ICE Analysis» представляет собой онлайн-программное обеспечение для анализа эффективности инсерционно-делеционных мутаций. Эффективность двухпиковых мутаций, вызванных инсерционно-делеционными

мутациями, анализируют на основе результатов секвенирования первого поколения со ссылкой на следующий сайт с сети Интернет:

<https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-analysis>.

Ссылаясь на фиг. 1, результаты показывают, что две sgPНК, синтезированные в данном примере, успешно выполняют генное редактирование CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток, полученных из мобилизованной периферической крови различных пациентов с талассемией и здоровых доноров, где эффективность редактирования генов sgPНК-1 составляет от 30 до 70%, и эффективность инсерционно-делеционных мутаций значительно варьируется между разными донорами. Напротив, существенно отличается то, что sgPНК-2 может редактировать клетки более эффективно и стабильно для генерации инсерционно-делеционных мутаций, тем самым разрушая эритроидный энхансер BCL11A, в отношении 5 пациентов доноров и 2 здоровых доноров, эффективность редактирования генов достигает от 60 до 80%.

Пример 2: Экспрессия мPНК γ -глобина и белков, связанных с дифференцировкой эритроидных клеток

В данном эксперименте проверяют экспрессию мPНК γ -глобина (ген HBG) в генетически отредактированных гемопоэтических стволовых клетках после дифференцировки, где гемопоэтические стволовые клетки получены из мобилизованной периферической крови пациентов с талассемией и здоровых доноров.

2.1 Дифференцировка эритроцитов

При выборе условий электропорации «300 В 1 мс» мPНК Cas9 и sgPНК-1, мPНК Cas9 и sgPНК-2 соответственно вводят в гемопоэтические стволовые клетки из мобилизованной периферической крови 5 пациентов с талассемией и 2 здоровых доноров путем электропорации. Клетки контрольной группы не проходят этап электропорации. После этого проводят эксперимент по дифференцировке эритроцитов по протоколу дифференцировки следующего «двухэтапного способа».

В «двухэтапном способе» дифференцировки сначала применяют среду для экспансии эритроидных клеток и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток, чтобы индуцировать дифференцировку CD34⁺ HSPC в клетки-предшественники эритроидных клеток для дифференцировки, и затем среду для дифференцировки эритроидных клеток и денуклеации гемопоэтических стволовых клеток применяют для индукции эритроидных клеток-предшественников к дифференцировке в зрелые эритроциты.

Базальная среда в среде для экспансии эритроидных клеток и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток представляет собой StemSpanTM SFEM II, факторы роста: от 50 до 200 нг/мл SCF, от 10 до 100 нг/мл IL-3 и от 1 до 10 ед. ЕРО/мл; условия культивирования: CD34⁺ HSPC культивируют в среде для экспансии эритроидных клеток и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток при плотности клеток $1,0 \times 10^5$ клеток/мл. Через 7 дней после дифференцировки CD34⁺ HSPC дифференцируются в эритроидные клетки-предшественники.

Базальная среда в среде для дифференцировки эритроидных клеток и денуклеации гемопоэтических стволовых клеток представляет собой StemSpanTM SFEM II, факторы роста: от 1 до 10 ед. ЕРО, от 100 до 1000 мкг/мл человеческого трансферрина и от 0,5 до 10 мкМ небольшой химической молекулы мифепристона. Эритроидные клетки-предшественники, культивированные на предыдущем этапе, применяют для дифференцировки в среде для дифференцировки и денуклеации эритроидных клеток гемопоэтических стволовых клеток при плотности клеток $1,0 \times 10^6$ клеток/мл, через 11 дней эритроидные клетки-предшественники дифференцируются и созревают в зрелые эритроциты.

Авторами изобретения обнаружили экспрессию белков клеточной мембраны CD71 и CD235a, экспрессируемых эритроцитами, и двойное положительное соотношение экспрессии CD71 и CD235a применяют для определения эффективности дифференцировки CD34⁺ HSPC в эритроциты, как показано на фиг. 2. Экспериментальная группа включает: все sgPНК-1 и sgPНК-2, и контрольная группа эффективно дифференцируется в эритроциты, соотношение экспрессии обоих CD71 и CD235a выше примерно 80%, и эффективность дифференцировки высока, что указывает на то, что sgPНК-1 и sgPНК-2 оказывают относительно хорошее влияние на редактирование генов.

2.2 Обнаружение экспрессии мРНК гена γ -глобина (HBG) в эритроцитах, дифференцированных из гемопоэтических стволовых клеток

мРНК клеток экстрагируют из зрелых эритроцитов, дифференцированных от гемопоэтических стволовых клеток в примере 2.1, и получают кДНК путем обратной транскрипции, и экспрессию мРНК гена HBG определяют с помощью флуоресцентной количественной ПЦР. Как показано на фиг. 3.

Результаты экспериментов показывают, что:

1) В CD34-положительных гемопоэтических стволовых клетках из мобилизованных образцов пациентов с талассемией и здоровых доноров выполняют редактирование генов сайта эритроидного энхансера BCL11A для ослабления ингибирования BCL11A на γ -глобин (HBG) и фетальный гемоглобин HbF, в клетках двух

экспериментальных групп sgPНК-1 и sgPНК-2 уровни экспрессии мPНК γ -глобина (HBG) повышены.

2) в частности:

a. у пациента 1 sgPНК-1 увеличивается примерно в 4,2 раза, и sgPНК-2 увеличивается примерно в 3,8 раза.

b. у пациента 2 sgPНК-1 увеличивается примерно в 1,8 раза, и sgPНК-2 увеличивается примерно в 2 раза.

c. у пациента 3, sgPНК-1 увеличивается примерно в 2,1 раза, и sgPНК-2 увеличивается примерно в 3,1 раза.

d. у пациента 4 sgPНК-1 увеличивается на примерно в 4 раза, и sgPНК-2 увеличивается примерно в 5,8 раза.

e. у пациента 5 sgPНК-1 увеличивается примерно в 1,6 раза, и sgPНК-2 увеличивается примерно в 2,2 раза.

f. у здорового донора 1 sgPНК-1 увеличивается примерно в 3,0 раза, и sgPНК-2 увеличивается примерно в 6,1 раза.

g. у здорового донора 2 sgPНК-1 увеличивается примерно в 1,7 раза, и sgPНК-2 увеличивается примерно в 1,7 раза.

Комбинируя приведенные выше данные, можно обнаружить, что независимо от группы sgPНК-1 или sgPНК-2, у разных доноров (пациентов и здоровых доноров) повышенный уровень γ -глобина (HBG) варьируется от донора к донору, при том, что генное редактирование эритроидного энхансерного сайта BCL11A выполняют для ослабления ингибирования BCL11A на γ -глобин (HBG) и фетальный гемоглобин HbF.

Кроме того, хотя повышенные уровни γ -глобина (HBG), вызванные sgPНК-1 и sgPНК-2, различаются по сравнению с донорами с низким повышенным уровнем γ -глобина (HBG), у доноров с более высокими повышенными уровнями γ -глобина (HBG), sgPНК-1 и sgPНК-2 имеют одинаковую тенденцию с высокой степенью согласованности и стабильности. Например, у донора пациента 1 как sgPНК-1, так и sgPНК-2 увеличиваются примерно в 4 раза, в то время как у донора пациента 2 как sgPНК-1, так и sgPНК-2 увеличиваются только примерно в 2 раза; у здорового донора 1 как sgPНК-1, так и sgPНК-2 увеличиваются в 3,0-6,0 раз, в то время как у здорового донора 2 как sgPНК-1, так и sgPНК-2 увеличиваются менее чем в 2 раза.

Пример 3. Эксперимент по проверке нескольких серий для определения эффективности редактирования генов.

3.1 Мобилизованная периферическая кровь от здоровых доноров

Данный эксперимент включает эксперимент по проверке нескольких серий для эффективного редактирования генов сайта эритроидного энхансера BCL11A CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток из мобилизованной периферической крови 2 здоровых доноров с помощью системы CRISPR/Cas9.

Из результатов примера 1 и примера 2 видно, что мРНК Cas9 и sgРНК-2 можно применять для эффективного и стабильного редактирования генов сайта эритроидного энхансера BCL11A, и эффективность редактирования генов составляет от 60 до 80%, что выше, чем для sgРНК-1; более того, после снятия ингибирования BCL11A на γ -глобин (HBG) и фетальный гемоглобин HbF, повышенный уровень мРНК γ -глобина (HBG), вызванный sgРНК-2, может быть выше, чем для sgРНК-1. Следовательно, в данном примере sgРНК-2 выбрана в качестве предпочтительной мишени для последующих экспериментов.

При выборе условий электропорации «300 В 1 мс» в электропораторе ВТХ ЕСМ830 синтезированные мРНК Cas9 и sgРНК-2, синтезированные путем химической модификации, соответственно вводят в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки от 2 здоровых доноров путем электропорации; через 4 дня после электропорации геном CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток экстрагируют и фрагмент общей длиной 903 п.о. (примерно 450 п.о. слева и справа от сайта расщепления sgРНК) отбирают для амплификации и секвенирования по Сэнгеру. Праймеры для секвенирования и способ анализа эффективности редактирования генов, приведены в примере 1. Результаты экспериментов показаны на фиг. 4А.

Результаты экспериментов показывают, что в условиях электропорации sgРНК-2, синтезированная в данном примере, успешно и эффективно выполняет генное редактирование CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток из мобилизованной периферической крови различных доноров и эффективно продуцирует инсерционно-делеционные мутации, в 3-х сериях экспериментов на 2-х здоровых донорах эффективность редактирования генов достигает от 70 до 80%. Где «3 серии экспериментов» означает, что от каждого здорового донора получают 1 образец мобилизованной периферической крови и выделяют CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки, однако для этих клеток проводят 3 независимых эксперимента по редактированию генов.

3.2 Источники мобилизованной периферической крови пациентов с талассемией

При выборе условий электропорации «300 В 1 мс» в электропораторе ВТХ ЕСМ830 мРНК Cas9 и sgРНК-2, синтезированные путем химической модификации, соответственно вводят в CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки от 10

пациентов с талассемией путем электропорации. Клетки контрольной группы не проходят этап электропорации. Через 2 дня геном экстрагируют, и фрагмент общей длиной 903 п.о. (примерно 450 п.о. с левой и правой стороны сайта расщепления sgРНК) отбирают для амплификации ПЦР, и продукты ПЦР применяют для секвенирования по Сэнгеру. Праймеры для секвенирования и способ анализа эффективности редактирования генов, приведены в примере 1. Результаты экспериментов показаны на фиг. 4В.

Результаты экспериментов показывают, что в условиях электропорации sgРНК-2, синтезированная в данном примере, успешно и эффективно выполняет генное редактирование CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток из мобилизованной периферической крови различных пациентов с талассемией и эффективно продуцирует инсерционно-делеционные мутации, в нескольких сериях экспериментов с 10 пациентами с талассемией эффективность редактирования генов достигает от 60 до 80% и более; где 1 образец мобилизованной периферической крови получают от каждого из 10 пациентов с талассемией и CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки выделяют для экспериментов по редактированию генов. В отношении этих клеток, для донора пациента 1 выполнено 3 независимых эксперимента по редактированию генов; два независимых эксперимента по редактированию генов выполняют соответственно для трех доноров пациентов, донора 6, донора 9 и донора 10, в то время как для остальных доноров пациентов проводят один эксперимент по редактированию генов.

Пример 4: Экспрессия мРНК γ -глобина и фетального гемоглобина HbF гемопоэтических стволовых клеток после дифференцировки

Данный эксперимент относится к обнаружению экспрессии гена BCL11A и мРНК γ -глобина в генетически отредактированных гемопоэтических стволовых клетках после дифференцировки, где гемопоэтические стволовые клетки получены из мобилизованной периферической крови здоровых доноров.

4.1 Дифференцировка эритроцитов

4.1.1 Здоровые доноры

При выборе условий электропорации «300 В 1 мс» мРНК Cas9 и sgРНК-2 соответственно вводят в гемопоэтические стволовые клетки из мобилизованной периферической крови 2 здоровых доноров путем электропорации. Клетки контрольной группы не проходят этап электропорации. Три серии экспериментов по дифференцировке эритроцитов выполняют с помощью протокола дифференцировки следующего «двухэтапного способа».

«Двухэтапный способ» дифференцировки включает: сначала проводят дифференцировку в среде для экспансии эритроидных клеток и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток, затем проводят дифференцировку в среде для дифференцировки эритроидных клеток и денуклеации гемопоэтических стволовых клеток.

Базальная среда в среде для экспансии эритроидных клеток и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток представляет собой StemSpanTM SFEM II, факторы роста: от 50 до 200 нг/мл SCF, от 10 до 100 нг/мл IL-3 и от 1 до 10 ед. ЕРО/мл; условия культивирования: гемопоэтические стволовые клетки культивируют в среде для экспансии эритроидных клеток и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток при плотности $1,0 \times 10^5$ клеток/мл, и экспансию клеток проводят в течение 7 дней.

Базальная среда в среде для дифференцировки эритроидных клеток и денуклеации гемопоэтических стволовых клеток представляет собой StemSpanTM SFEM II; факторы роста: от 1 до 10 ед. ЕРО, от 100 до 1000 мкг/мл человеческого трансферрина и небольшая химическая молекула мифепристона от 0,5 до 10 мкм. Клетки, культивируемые на предыдущем этапе, применяют для дифференцировки в среде для дифференцировки эритроидных клеток и денуклеации гемопоэтических стволовых клеток при плотности $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в течение 11 дней.

Авторами изобретения обнаружена экспрессия CD71 и CD235a способом FACS, как показано на фиг. 5. Клетки как в экспериментальной группе, так и в контрольной группе дифференцируются в эритроциты с высокой эффективностью, коэффициенты экспрессии CD71 и CD235a выше примерно 85%, эффективность дифференцировки высока, и достигается хороший эффект. Где «3 серии экспериментов по дифференцировке эритроцитов» означает, что от каждого здорового донора получают 1 образец мобилизованной периферической крови и выделяют CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки; в то время как для этих клеток проводят 3 независимых эксперимента по редактированию генов и соответственно 3 эксперимента по дифференцировке эритроцитов.

4.1.2 Пациенты с талассемией

При выборе условий электропорации «300 В 1 мс» мРНК Cas9 и sgРНК-2 соответственно вводят в гемопоэтические стволовые клетки из мобилизованной периферической крови 10 пациентов с талассемией путем электропорации. Клетки контрольной группы не проходят этап электропорации. Множественные серии экспериментов по дифференцировке эритроцитов выполняют по протоколу дифференцировки «двухэтапного способа», описанного в 4.1.1.

Через 18 дней дифференцировки определяют экспрессию CD71 и CD235a, как показано на фиг. 6. Клетки как в экспериментальной группе, так и в контрольной группе дифференцируются в эритроциты с высокой эффективностью. Эффективность дифференцировки эритроидных клеток у разных пациентов с талассемией различается у разных индивидуумов, двойное положительное соотношение экспрессии CD71 и CD235a составляет примерно от 60 до 95%, что указывает на высокую эффективность дифференцировки и хороший эффект.

Где получают по 1 образцу мобилизованной периферической крови от каждого из 10 пациентов с талассемией и выделяли CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки; где CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки от донора пациента 1 применяют для проведения 3 независимых экспериментов по редактированию генов и 3 независимых экспериментов по дифференцировке эритроцитов; CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки от трех доноров пациентов, донора 6, донора 9 и донора 10, применяли, соответственно, для проведения 2 независимых экспериментов по редактированию генов и 2 экспериментов по дифференцировке эритроцитов, в то время как один эксперимент по редактированию гена и один эксперимент по дифференцировке эритроцитов проводили для оставшихся 6 доноров пациентов.

4.2 Обнаружение экспрессии мРНК γ -глобина и гена BCL11A в эритроцитах, дифференцированных из гемопоэтических стволовых клеток здоровых доноров

Из мРНК клеток, выделенных из зрелых эритроцитов, дифференцированных из гемопоэтических стволовых клеток в примере 4.1.1 получают кДНК с помощью обратной транскрипции, и экспрессию мРНК генов, таких как BCL11A и HBG, выявляют флуоресцентной количественной ПЦР. Как показано на фиг. 7-8.

Результаты экспериментов показывают, что:

1) для здоровых доноров 1 результаты трех серий экспериментов показывают, что после редактирования гена эритроидного энхансера гемопоэтических стволовых клеток BCL11A экспрессия гена BCL11A в экспериментальной группе снижается и составляет примерно от 40 до 80% от экспрессии в контрольной группе, в то время как экспрессия гена γ -глобина (гена HBG) значительно повышена, и повышенный уровень в трех сериях экспериментов примерно в 6-10 раз выше, чем в контрольной группе, и результаты очень последовательны и стабильны.

2) для здоровых доноров 2 результаты трех серий экспериментов показывают, что после редактирования гена эритроидного энхансера гемопоэтических стволовых клеток BCL11A экспрессия гена BCL11A в экспериментальной группе снижается и составляет

примерно от 40 до 80% от экспрессии в контрольной группе, в то время как экспрессия гена γ -глобина (гена HBG) значительно повышена, и повышенный уровень в трех сериях повторяющихся экспериментов примерно в 1,5-3,5 раза выше, чем в контрольной группе, и результаты очень последовательны и стабильны.

Результаты данного эксперимента дополнительно подтверждают, что, в отношении различных доноров, после электропорации sgPНК и мPНК Cas9, нацеленной на эритроидный энхансер BCL11A, скорость подавления экспрессии гена BCL11A составляет от 20 до 60%, в то время как повышенные уровни экспрессии γ -глобина значительно различаются. У здорового донора 1 экспрессия γ -глобина увеличивается в 6-10 раз, а у здорового донора 2 экспрессия γ -глобина увеличивается в 1,5-3,5 раза. В данном контексте «3 серии экспериментов по дифференцировке эритроцитов» означает, что соответственно получают 1 образец мобилизованной периферической крови от каждого здорового донора и выделяют CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки, в то время как для этих клеток выполняли 3 независимых эксперимента по редактированию генов и соответственно выполняли 3 эксперимента по дифференцировке эритроцитов, и определяли уровень экспрессии мPНК гена BCL11A и γ -глобина (гена HBG).

4.3 Определение экспрессии фетального гемоглобина HbF в эритроцитах, полученных из гемопоэтических стволовых клеток пациентов с талассемией

Положительный коэффициент экспрессии фетального гемоглобина HbF в зрелых эритроцитах, дифференцированных из гемопоэтических стволовых клеток в примере 4.1.2, определяют с помощью проточной цитометрии. Как показано на фиг. 9А, 9В и 10.

Результаты экспериментов показывают, что:

1) по сравнению с контрольной группой без редактирования гена экспрессия HbF в эритроцитах, дифференцированных от CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток, подвергающихся редактированию гена, повышена.

2) повышенные уровни экспрессии HbF значительно различаются у разных пациентов с талассемией, где в 3 сериях экспериментов уровни экспрессии HbF для донора пациента 1 и донора пациента 7 примерно в 1,3 раза выше, чем в контрольной группе, а уровни экспрессии HbF для донора пациента 2 примерно в 2,3 раза выше, чем в контрольной группе. Однако уровни экспрессии HbF для одного и того же пациента с талассемией в разных сериях экспериментов очень похожи, где в 2 сериях экспериментов уровни экспрессии HbF для донора пациента 1 примерно в 1,3 раза выше, чем в контрольной группе, уровни экспрессии HbF для донора пациента 9 примерно в 1,4 раза

выше, чем в контрольной группе, и уровни экспрессии HbF для пациента-донора 10 примерно в 1,5–1,6 раза выше, чем в контрольной группе.

3) уровень экспрессии HbF у донора пациента 1 в экспериментальной группе в $1,29 \pm 0,12$ раза выше, чем в контрольной группе. Таким образом, авторы настоящего изобретения полагают, что если уровень экспрессии HbF после редактирования гена увеличивается по меньшей мере примерно на 12% по сравнению с контрольной группой, то есть на величину одного стандартного отклонения, то это эффективно для данного пациента с талассемией.

Пример 5: Лечение гемоглобинопатии редактированием генов эритроидного энхансера BCL11A

Из результатов Примера 2.2, Примера 4.2 и Примера 4.3 нетрудно обнаружить, что после электропорации мРНК Cas9 и той же самой sgРНК для эритроидного энхансера BCL11A повышенные уровни экспрессии γ -глобина и фетального гемоглобина HbF значительно различаются у разных доноров. Основная причина заключается в том, что, как описано в предшествующем уровне техники настоящей заявки, механизм регуляции и ингибирования экспрессии γ -глобина и фетального гемоглобина HbFb в зрелых эритроцитах сложен, он включает LCR в удаленной регуляторной области, и есть также несколько факторов транскрипции, таких как BCL11A, MYB, KLF1 и другие, объединяющиеся для формирования комплекса в качестве переключателя для регуляции γ -глобина и фетального гемоглобина HbF (G. Lettre, et al. PNAS. 2008, 11869-11874; Marina et al, Molecular Therapy. 2017; Megan D, et al. Blood. 2015). Это означает, что ингибирующее действие BCL11A на γ -глобин и фетальный гемоглобин HbF значительно различается между индивидуумами.

Кроме того, хотя регуляторный механизм для γ -глобина и фетального гемоглобина HbF сложен, для одного и того же человека от стадии плода до рождения и до стадии взрослого человека регуляторный механизм γ -глобина и фетального гемоглобина HbF является относительно постоянным, что означает, что степень ингибирования и влияние гена BCL11A на γ -глобин и фетальный гемоглобин HbF в основном не меняются (Paikari A, et al. Br J Haematol. 2018; Lettre G, et al. Lancet. 2016; G. Lettre, et al. PNAS .2008,11869-11874; Marina et al, Molecular Therapy. 2017; Megan D, et al. Blood. 2015), и это дополнительно подтверждается результатами в примерах 4.2 и 4.3. Для одного и того же донора после редактирования гена сайта эритроидного энхансера BCL11A и дифференцировки эритроцитов в нескольких сериях экспериментов по обнаружению и

анализу экспрессии мРНК γ -глобина (ген HBG) и фетального гемоглобина HbF их повышенные уровни являются последовательными и стабильными.

Следовательно, комбинируя экспериментальные результаты и явления настоящей заявки, текущая стратегия лечения генного редактирования эритроидных энхансеров BCL11A для лечения гемоглобинопатии имеет очевидные потенциальные недостатки, т.е. в предшествующем уровне техники не предсказан уровень регуляции и влияние BCL11A на γ -глобин и фетальный гемоглобин HbF заранее, после того, как пациент получил лечение большой дозой агента для очистки костного мозга и трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, очень вероятно, что терапевтический протокол будет неэффективным или эффект не будет значительным, что принесет потенциально огромный вред пациенту. Настоящее изобретение обеспечивает эффективный способ прогнозирования, т.е. повышенные уровни и эффект γ -глобина и фетального гемоглобина HbF у разных людей различаются, а результаты являются последовательными и стабильными; в то время как в разных сериях экспериментов с гемопоэтическими стволовыми клетками одного и того же индивидуума после выполнения редактирования гена для подавления экспрессии BCL11A повышенные уровни и эффект γ -глобина и фетального гемоглобина HbF являются последовательными и стабильными; если фетальный гемоглобин HbF может быть увеличен по меньшей мере примерно на 12% после редактирования гена, терапевтический протокол считается эффективным для пациентов с талассемией.

Основываясь на результатах экспериментов, в настоящее изобретение обеспечивает новый способ лечения гемоглобинопатии путем редактирования генов эритроидного энхансера BCL11A, то есть терапия сопутствующей диагностики плюс редактирование генов аутологичных гемопоэтических стволовых клеток. Как показано на фиг. 11.

Сопутствующая диагностика: перед лечением пациента с гемоглобинопатией путем редактирования генов эритроидного энхансера BCL11A можно заранее спрогнозировать эффективность терапевтического протокола, т.е. заблаговременно извлекают небольшое количество костного мозга или периферической крови у пациента и выделяют CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки, затем выполняют редактирование гена сайта эритроидного энхансера BCL11A и дифференцировку генетически отредактированных клеток в зрелые эритроциты, где уровни экспрессии γ -глобина (ген HBG) и фетального гемоглобина HbF оценивают сериями показателей, и пациента с более высокими повышенными уровнями экспрессии γ -глобина и фетального гемоглобина HbF выбирают в качестве предпочтительного субъекта для лечения, таким

образом, вероятность высокой эффективности терапевтического протокола будет выше. Где по сравнению с контрольной группой без редактирования генов экспрессия фетального гемоглобина HbF в экспериментальной группе увеличивается по меньшей мере примерно на 12%, тогда пациенту, получающему лечение, может быть полезно клиническое лечение. Поскольку, с одной стороны, клинически считается, что пациент с содержанием гемоглобина 90 г/л может избавиться от зависимости от переливания крови, если для лечения выбран пациент с более высоким повышенным уровнем γ -глобина и фетального гемоглобина HbF, вероятность избавления от зависимости от переливания крови выше. С другой стороны, хотя пациент с показателем 90 г/л может избавиться от переливания крови, легкие проявления анемии все еще присутствуют (от 90 до 110 г/л), и может быть нарушено развитие костей (обычно диапазон содержания гемоглобина для мужчины составляет от 120 до 160 г/л, и для женщины от 110 до 150 г/л), если для лечения выбран пациент с более высокими повышенными уровнями γ -глобина и фетального гемоглобина HbF, вероятность полного выздоровления пациента выше. Таким образом, цель терапевтической стратегии лечения гемоглобинопатии путем редактирования генов эритроидного энхансера BCL11A состоит в том, чтобы сделать общую экспрессию гемоглобина пациента как можно более высокой, и если она достигает уровня нормального человека, терапевтический эффект более значительный, и пациент получает больше преимуществ. Кроме того, в способе прогнозирования, разработанном в настоящей заявке, для извлечения требуется лишь небольшое количество костного мозга или периферической крови, и этот процесс прост. Пациенту не нужно проходить сложный процесс введения мобилизационного агента, заставляющий костный мозг производить большое количество гемопоэтических стволовых клеток, и во время периода скрининга пациенту не будут вводить большую дозу агента для очистки костного мозга и лимфы, такого как бусульфан и флударабин, таким образом, здоровье пациента гарантировано.

Терапия по редактированию генов аутологичных гемопоэтических стволовых клеток: субъект с гемоглобинопатией, который, наконец, поступает на лечение, определяется сопутствующим диагностическим способом, разработанным в настоящей заявке, затем вводится процесс терапии генного редактирования аутологичных гемопоэтических стволовых клеток: 1. Субъекту вводят гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) или/и плериксафор (антагонист для удаления хемокинового рецептора CXCR4) для мобилизации костного мозга, так что большое количество гемопоэтических стволовых клеток продуцируется костным мозгом и высвобождается в периферическую систему кровообращения. 2. После завершения мобилизации запускается процесс продуцирования терапевтических клеточных продуктов

редактирования генов; во-первых, CD34-положительные гемопоэтические стволовые клетки получают и культивируют посредством маркировки и разделения на основе магнитных частиц CD34; во-вторых, сайт эритроидного энхансера BCL11A генетически редактируют путем введения Cas9 и sgРНК путем электропорации; наконец, клетки подвергают криоконсервации, переходя на этап контроля качества и оценки безопасности, и после достижения стандартов доставки клетки готовы к введению обратно пациенту. 3. После того, как продукт будет успешно получен и будет соответствовать стандартам доставки, врач уведомит пациента, который будет госпитализирован, и получит предварительную химиотерапию (введение агентов для очистки костного мозга, например, бусульфана, и агентов для очистки лимфы, например, циклофосфамида и флударабина). Следует отметить, что в разных клинических учреждениях могут применяться разные протоколы предварительной обработки. Некоторые клинические учреждения могут применять только агенты для очистки костного мозга, например, бусульфан, в то время как другие клинические учреждения могут применять агенты для очистки костного мозга и агенты для очистки лимфы, например, циклофосфамид и флударабин. После завершения предварительной обработки генетически отредактированные аутологичные гемопоэтические стволовые клетки вводят и возвращают пациенту посредством однократной внутривенной инъекции в дозе 2×10^6 или более активных CD34-положительных клеток/кг. 4. После проведения инъекции за пациентом будут наблюдать не менее 2 лет для оценки показателей, касающихся безопасности, переносимости, эффективности и т.д.

ПРОМЫШЛЕННАЯ ПРИМЕНИМОСТЬ

Согласно настоящей заявке способ по настоящему изобретению имеет следующие преимущества. Во-первых, в настоящей заявке впервые обнаружены следующие явления: у разных индивидуумов после генного редактирования гемопоэтических стволовых клеток для подавления экспрессии BCL11A повышенные уровни и влияние γ -глобина и фетального гемоглобина HbF различаются, в то время как у одного и того же индивидуума после генного редактирования гемопоэтических стволовых клеток для подавления экспрессии BCL11A повышенные уровни и эффект γ -глобина и фетального гемоглобина HbF являются последовательными и стабильными, и это восполняет пробел в уровне техники. Во-вторых, порог эффективности повышенного уровня фетального гемоглобина HbF после генного редактирования эритроидного энхансера BCL11A (т.е. уровень HbF увеличивается по меньшей мере примерно на 12% после генного редактирования) установлен впервые в настоящей заявке, затем, после того как пациент

получает лечение, можно значительно улучшить течение болезни, можно уменьшить частоту переливаний крови или отказаться от переливаний крови. В-третьих, сопутствующий диагностический способ, обеспеченный в настоящей заявке, прост в применении, и требуется лишь небольшое количество костного мозга или периферической крови от пациента, который будет включен в период скрининга (период скрининга пациента обычно длится от 2 до 3 месяцев), затем выделение CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток, редактирование гена эритроидного энхансера BCL11A и дифференцировку эритроцитов, и обнаружение повышенных уровней γ -глобина и фетального гемоглобина HbF, для завершения всего процесса оценки требуется всего от 3 до 4 недель, что позволяет избежать риска неэффективного способа лечения или незначительных эффектов для пациента, вызванных индивидуальными различиями в регуляции гена BCL11A на γ -глобин и фетальный гемоглобин HbF. В-четвертых, способ, обеспеченный в настоящей заявке, будет полезен для стратификации и классификации пациентов в терапевтическом протоколе лечения гемоглобинопатии с помощью технологии редактирования генов, то есть пациенты с более высокими повышенными уровнями γ -глобина и фетального гемоглобина HbF находятся на приоритетном уровне лечения. В-пятых, в настоящей заявке обеспечен новый терапевтический протокол, сочетающий сопутствующую диагностику и терапию редактирования генов аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, тем самым повышая безопасность и эффективность лечения гемоглобинопатии путем генного редактирования.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения гемоглобинопатии у индивидуума, включающий:

а) этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников ("CD34-положительные HSPC" (HSPC - гемопоэтические стволовые клетки)) продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A ("модифицированные EV (оценочные) клетки"), и

б) этап лечения, включающий: введение второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC индивидууму, где модифицированные CD34-положительные HSPC происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A ("модифицированные TR клетки (регуляторные Т-клетки)").

2. Способ лечения гемоглобинопатии у индивидуума, включающий этап лечения, включающий: введение индивидууму второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC, где модифицированные CD34-положительные HSPC происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A ("модифицированные TR клетки"), и

где индивидуум выбран для лечения на основе функциональной оценки на этапе оценки, включающем: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников ("CD34-положительные HSPC") продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A ("модифицированные EV клетки").

3. Способ определения, является ли индивидуум, страдающий гемоглобинопатией, подходящим или неподходящим для лечения второй популяцией модифицированных CD34-положительных HSPC ("модифицированные TR клетки"), полученных от индивидуума и модифицированных для снижения функции BCL11A, где способ включает этап оценки, включающий: оценку способности первой популяции модифицированных CD34-положительных HSPC продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, где модифицированные CD34-положительные HSPC первой популяции происходят от индивидуума и модифицированы для снижения функции BCL11A ("модифицированные EV клетки"), и где, если первая

популяция модифицированных CD34-положительных HSPC продуцирует желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), индивидуум является подходящим для лечения, где, если первая популяция модифицированных CD34-положительных HSPC не продуцирует желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF), индивидуум является неподходящим для лечения модифицированными TR клетками.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где этап оценки включает:

a) выделение CD34-положительных HSPC из образца костного мозга или периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC ("выделенные EV клетки"),

b) модификацию выделенных EV клеток для получения первой популяции модифицированных CD34-положительных клеток HSPC с пониженной функцией BCL11A ("модифицированные EV клетки") и

c) оценку способности модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где этап лечения включает:

a) мобилизацию CD34-положительных HSPC в костном мозге индивидуума для увеличения количества CD34-положительных HSPC в периферической крови,

b) выделение CD34-положительных HSPC из периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC ("выделенные TR клетки"),

c) модификацию выделенных TR клеток для получения второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC с пониженной функцией BCL11A ("модифицированные TR клетки") и

d) введение индивидууму эффективного количества модифицированных TR клеток.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где:

1) этап оценки включает:

a) выделение CD34-положительных HSPC из образца костного мозга или периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC ("выделенные EV клетки"),

b) модификацию выделенных EV клеток для получения первой популяции модифицированных CD34-положительных клеток HSPC с пониженной функцией BCL11A ("модифицированные EV клетки") и

c) оценку способности модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки, и

2) этап лечения включает:

a) мобилизацию CD34-положительных HSPC у индивидуума в периферической крови,

b) выделение CD34-положительных HSPC из периферической крови индивидуума для получения популяции выделенных CD34-положительных HSPC ("выделенные TR клетки"),

c) модификацию выделенных TR клеток для получения второй популяции модифицированных CD34-положительных HSPC с пониженной функцией BCL11A ("модифицированные TR клетки") и

d) введение индивидууму эффективного количества модифицированных TR клеток.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где модифицированные EV клетки модифицированы путем генетической модификации.

8. Способ по любому из пп. 4-6, где модификация выделенных EV клеток включает генетическую модификацию выделенных EV клеток.

9. Способ по п. 7 или п. 8, где выделенные EV клетки генетически модифицированы способом, выбранным из группы, состоящей из: нуклеазы с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), и коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), редактирования РНК, интерференции РНК.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где способность модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки оценивают на этапе оценки, включающем: 1) культивирование модифицированных EV клеток в условиях, позволяющих дифференцировку для получения популяции эритроцитов, и 2) определение уровня γ -глобулина или фетального гемоглобина (HbF), продуцируемого эритроцитами.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где способность модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки оценивают на этапе оценки, включающем: определение уровня мРНК γ -глобулина.

12. Способ по любому из пп. 1-10, где способность модифицированных EV клеток продуцировать желаемый уровень γ -глобина или фетального гемоглобина (HbF) после дифференцировки оценивают на этапе оценки, включающем: определение уровня белка фетального гемоглобина (HbF).

13. Способ по любому из пп. 1-12, где индивидуума не подвергают мобилизации или предварительному лечению перед этапом оценки.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где этап оценки повторяют по меньшей мере один раз перед этапом лечения.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где модифицированные TR клетки модифицированы путем генетической модификации.

16. Способ по любому из пп. 5-14, где модификация выделенных TR клеток включает генетическую модификацию выделенных TR клеток.

17. Способ по п. 15 или п. 16, где выделенные TR клетки генетически модифицированы способом, выбранным из группы, состоящей из: нуклеазы с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), редактирования РНК и интерференции РНК.

18. Способ по любому из пп. 5-17, где мобилизация CD34-положительных HSPC на этапе лечения включает: лечение индивидуума гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (GCSF) и/или плериксафором.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где этап лечения дополнительно включает: предварительное лечение индивидуума перед введением модифицированных TR клеток.

20. Способ по п. 19, где предварительное лечение включает химиотерапию, терапию моноклональными антителами или системное облучение.

21. Способ по п. 20, где предварительное лечение включает химиотерапию.

22. Способ по п. 21, где химиотерапия включает введение индивидууму одного или более химиотерапевтических агентов, выбранных из группы, состоящей из бусульфана, циклофосфида и флударабина.

23. Способ по любому из пп. 5-22, где выделенные TR клетки культивируют в течение одного или более дней перед модификацией.

24. Способ по любому из пп. 5-23, где модифицированные TR клетки культивируют в течение одного или более дней перед введением индивидууму.

25. Способ по любому из пп. 1-24, где модифицированные TR клетки хранят в условиях замораживания в течение по меньшей мере 24 часов перед введением модифицированных TR клеток индивидууму.

26. Способ по п. 25, где модифицированные TR клетки культивируют в течение одного или более дней перед хранением в условиях замораживания.

27. Способ по любому из пп. 1-26, где гемоглобинопатия представляет собой заболевание, выбранное из группы, состоящей из: серповидно-клеточной анемии,

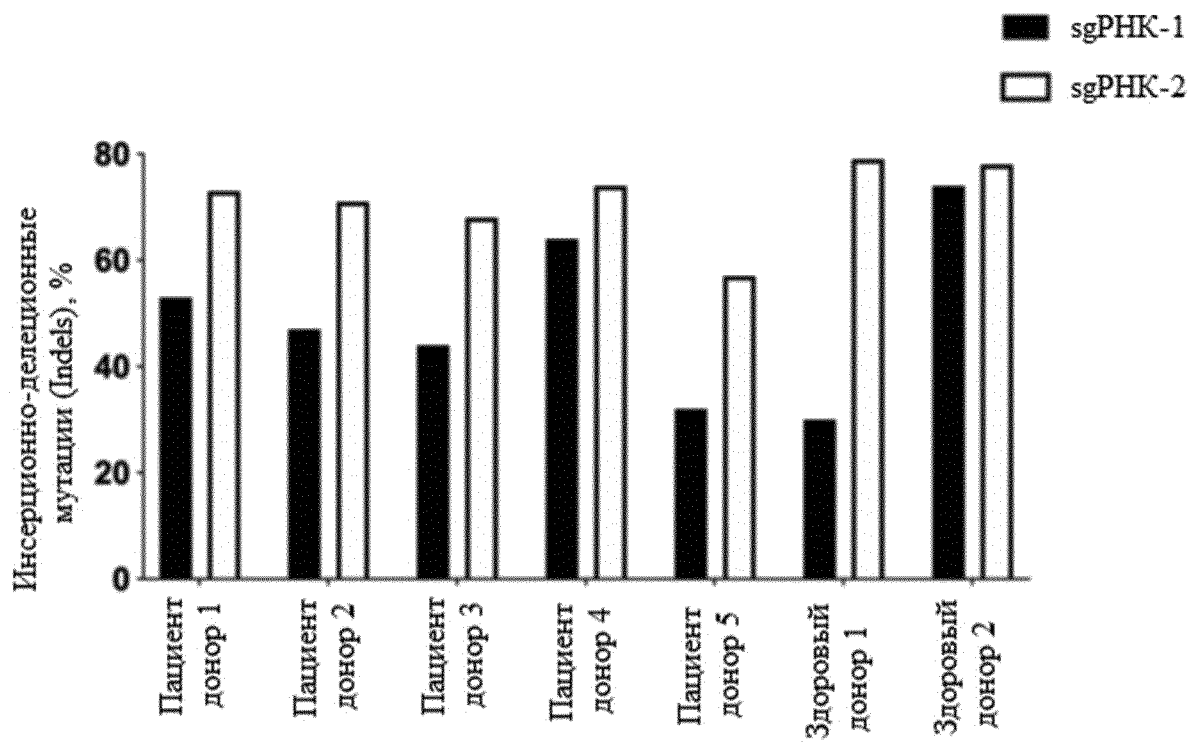
носительства признака "серповидных клеток", гемоглобиноза С, носительства признака гемоглобиноза С, гемоглобиноза S/C, гемоглобиноза D, гемоглобиноза E, талассемии, расстройства, связанного с гемоглобином, с повышенным сродством к кислороду, расстройства, связанного с гемоглобином, с пониженным сродством к кислороду, болезни нестабильного гемоглобина и метгемоглобинемии.

28. Способ по п. 27, где гемоглобинопатия выбрана из группы, состоящей из: β -талассемии и серповидно-клеточной анемии.

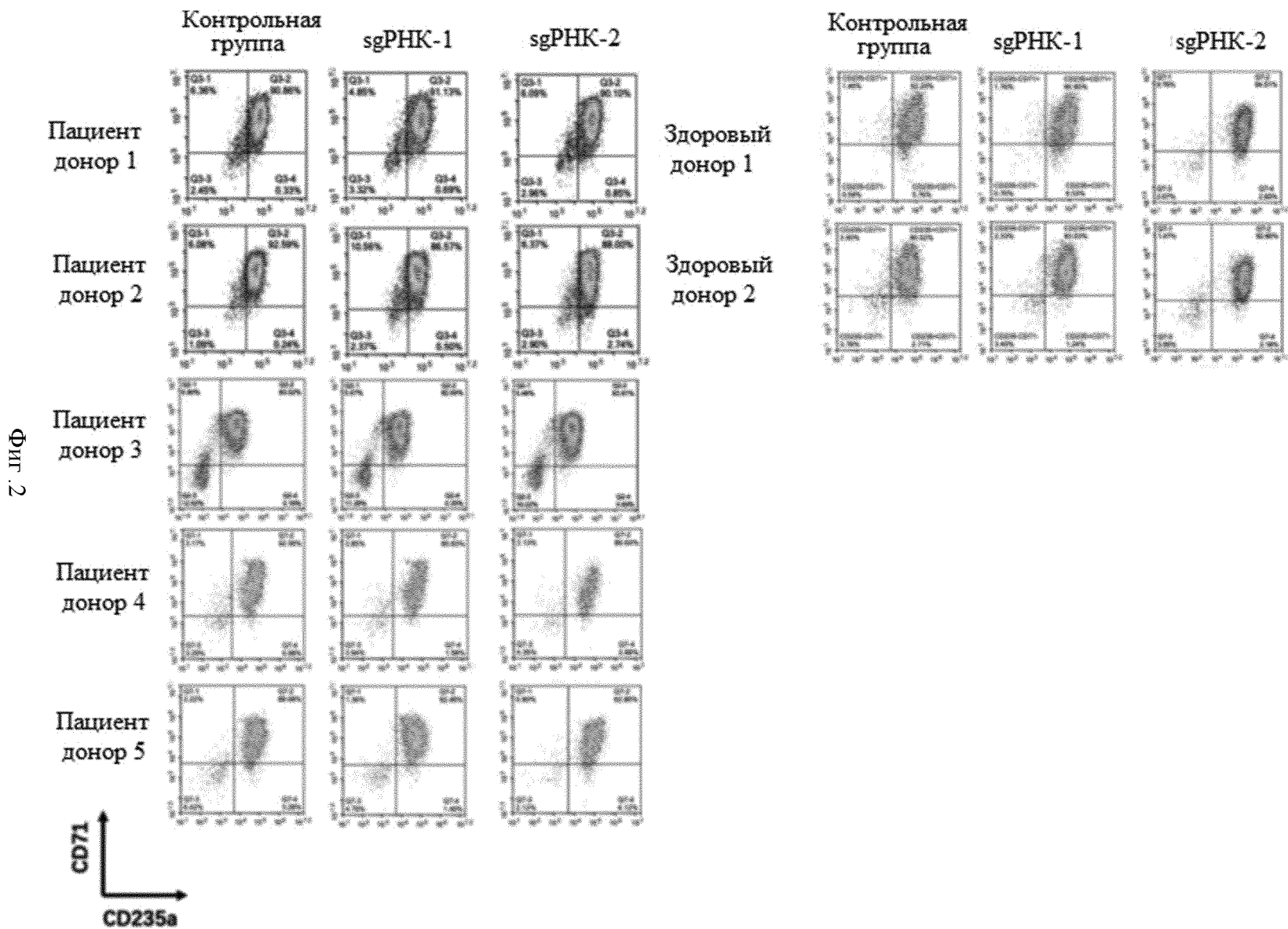
29. Способ по п. 28, где гемоглобинопатия представляет собой β^0 - или β^+ -талассемию.

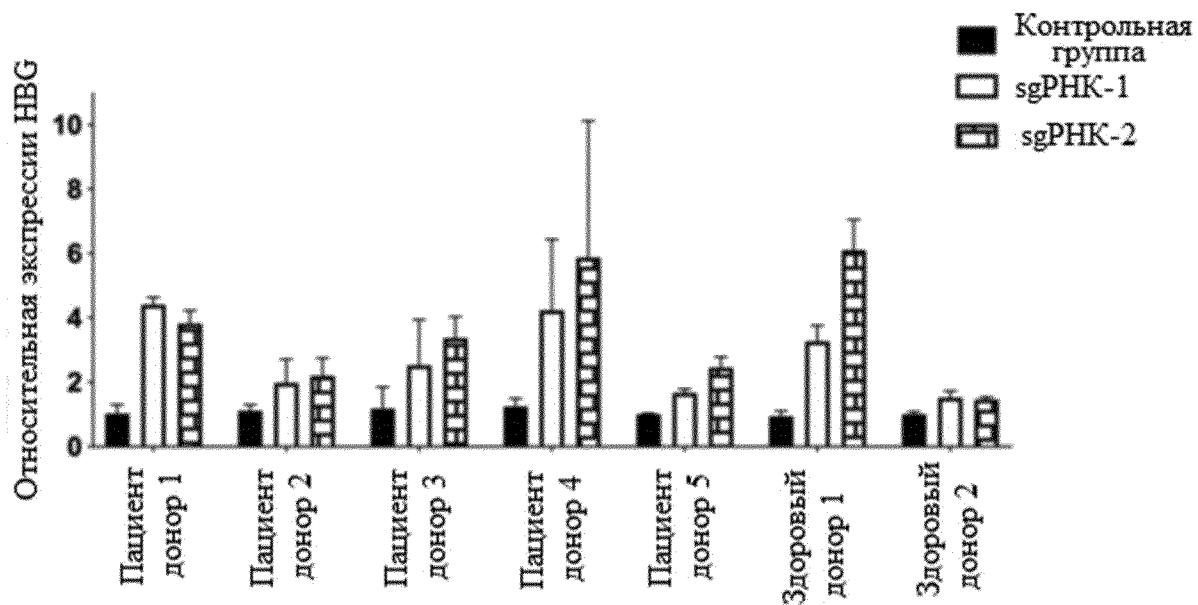
30. Способ по любому из пп. 1-29, где индивидuum представляет собой человека.

31. Способ по любому из пп. 1-30, где этап лечения выполняют сразу после этапа оценки.



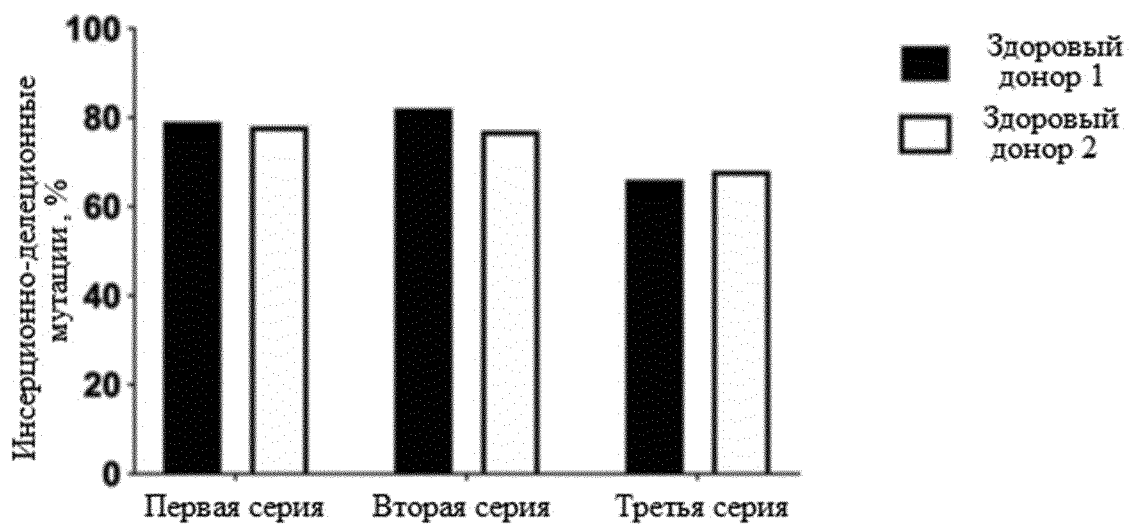
Фиг. 1



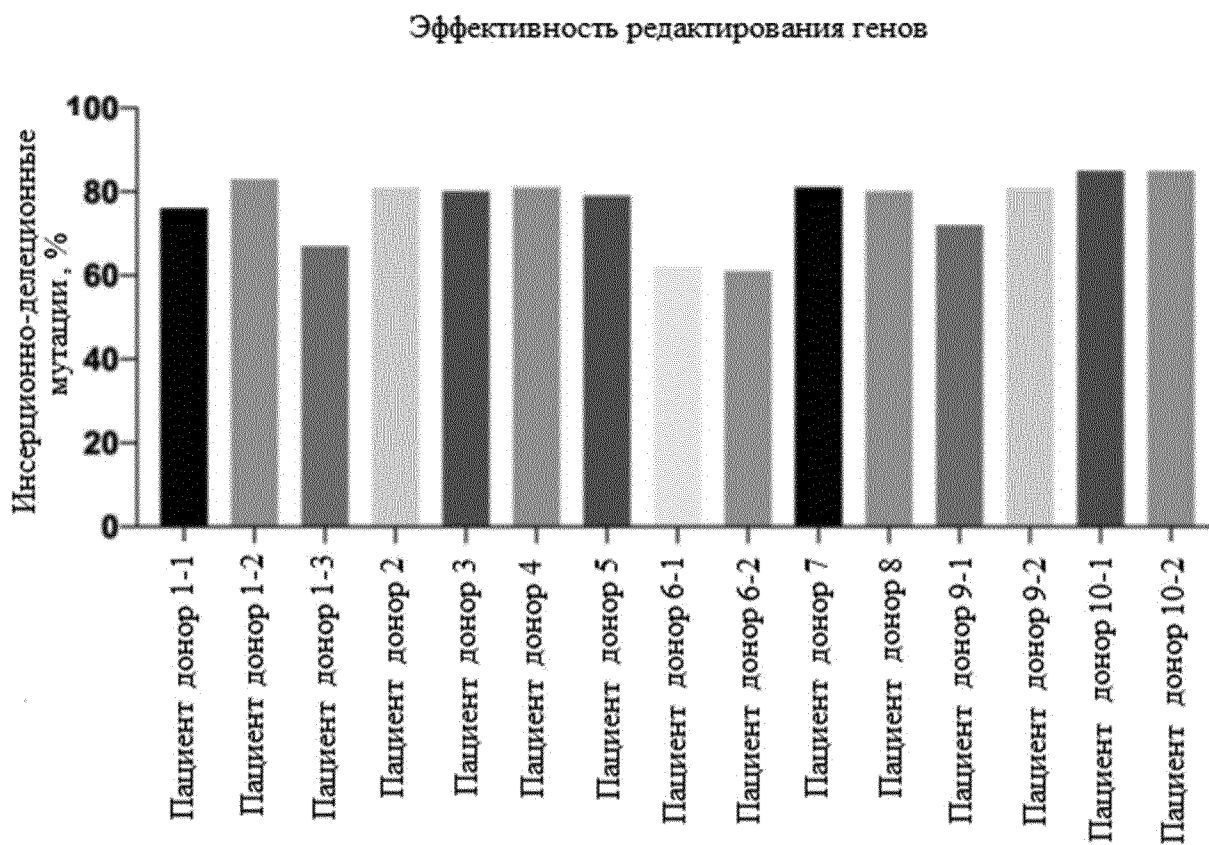


Фиг. 3

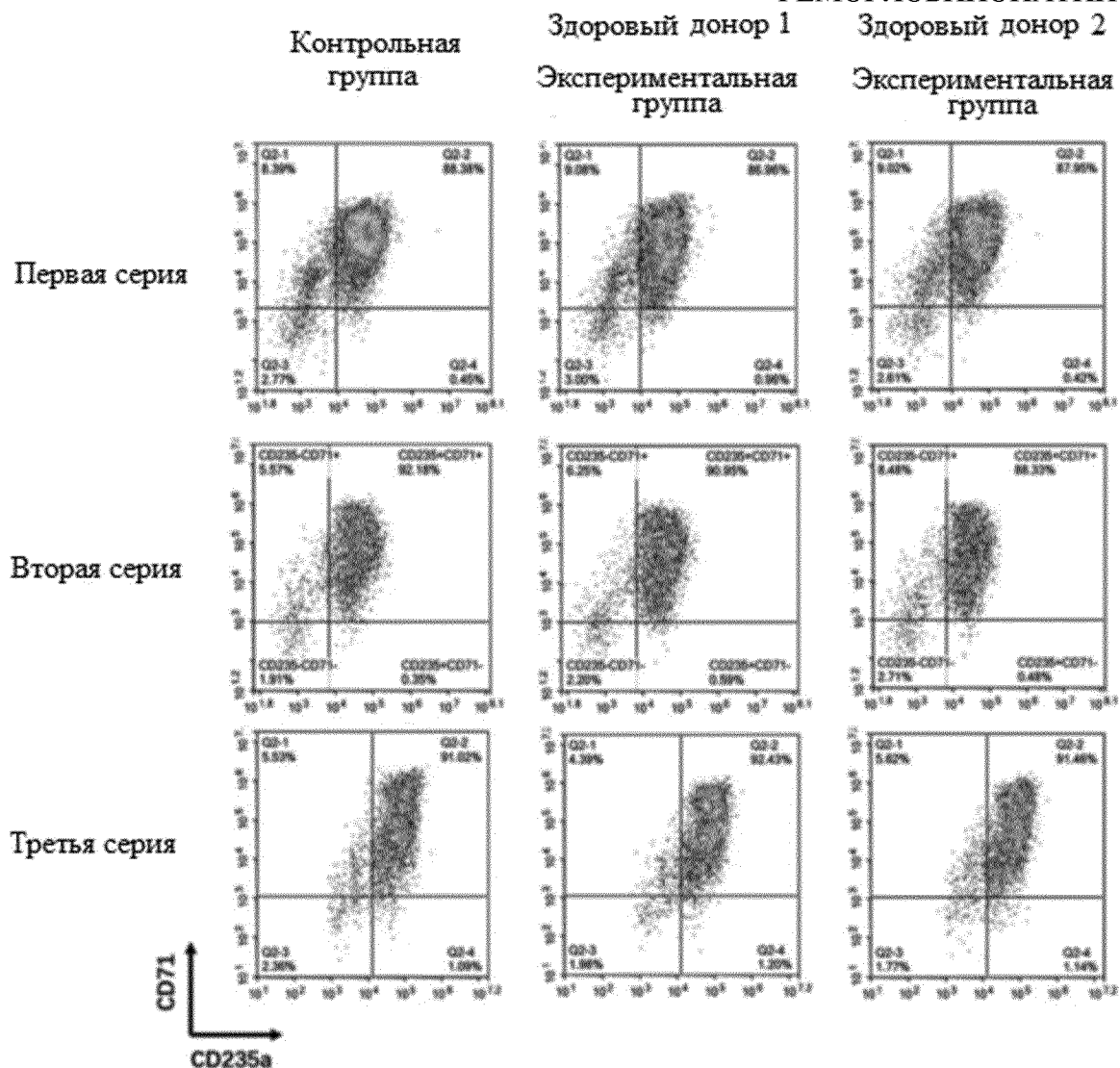
Эффективность редактирования генов



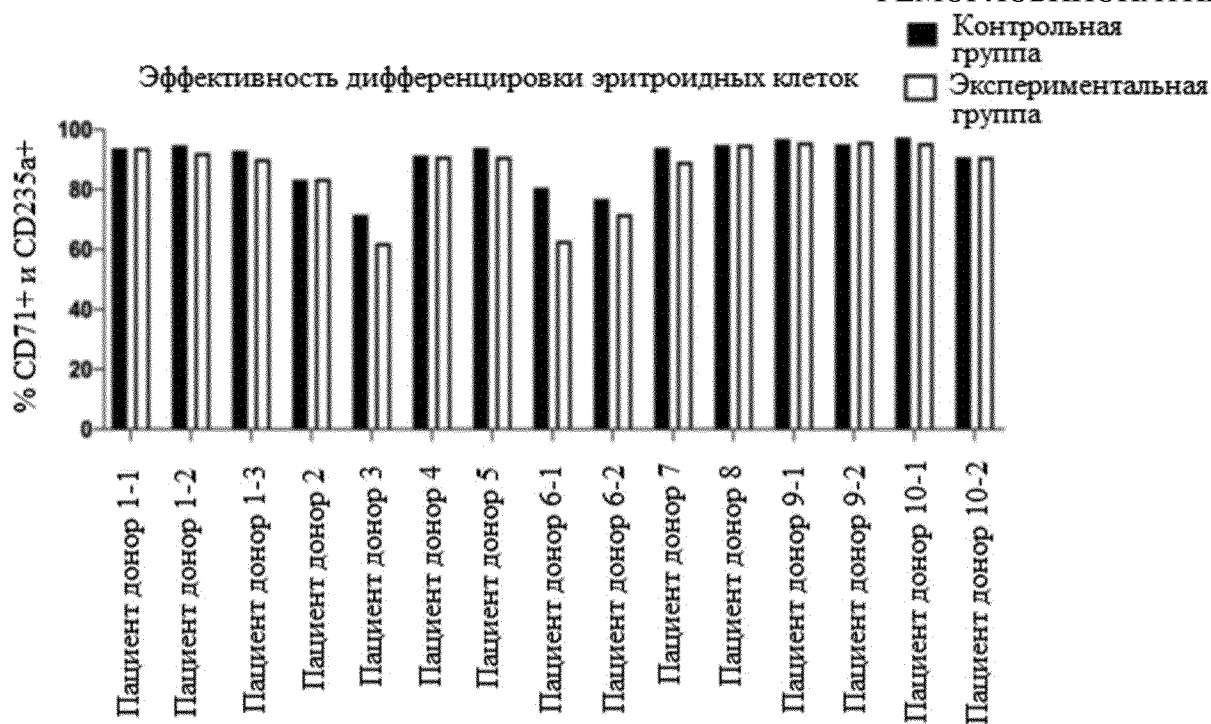
Фиг. 4А



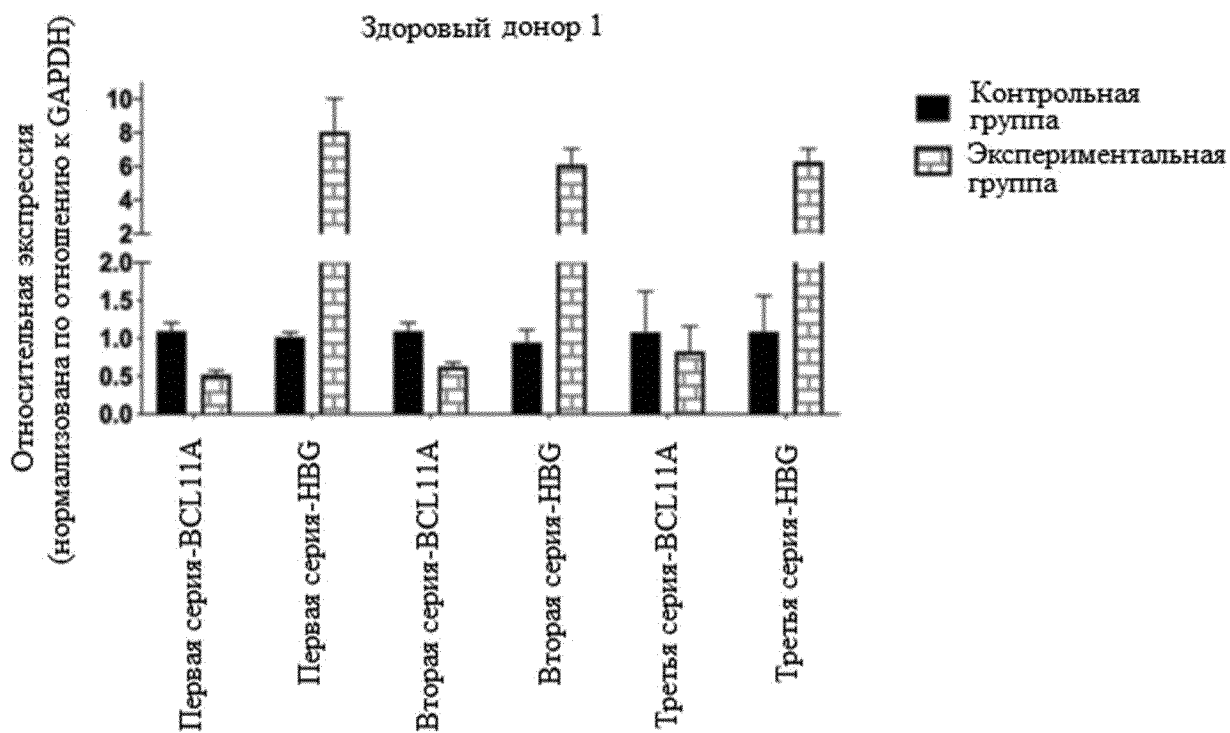
Фиг. 4В



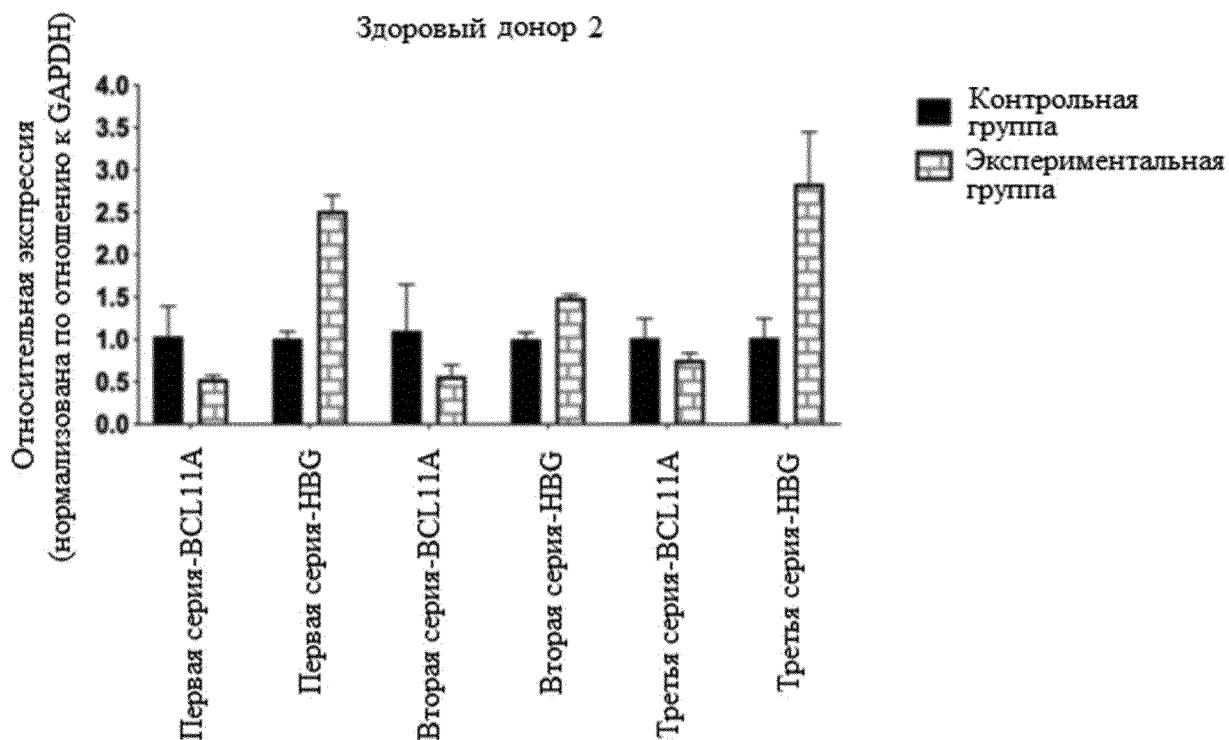
Фиг. 5



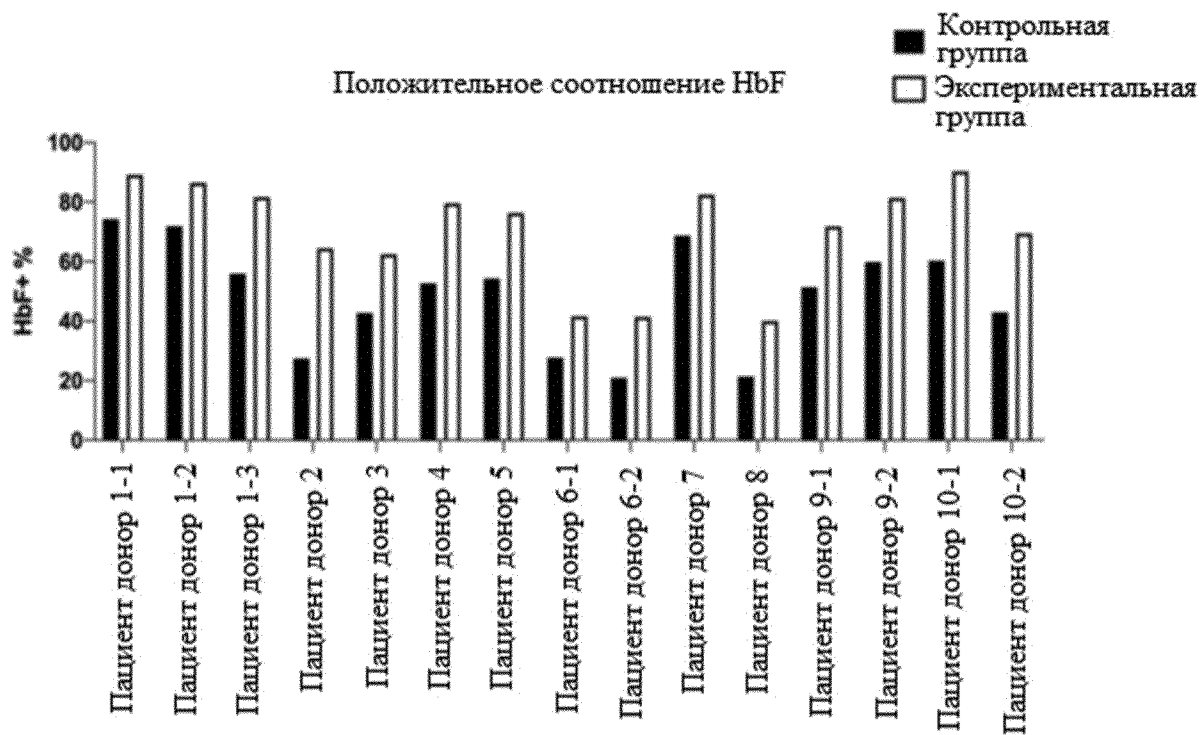
Фиг. 6



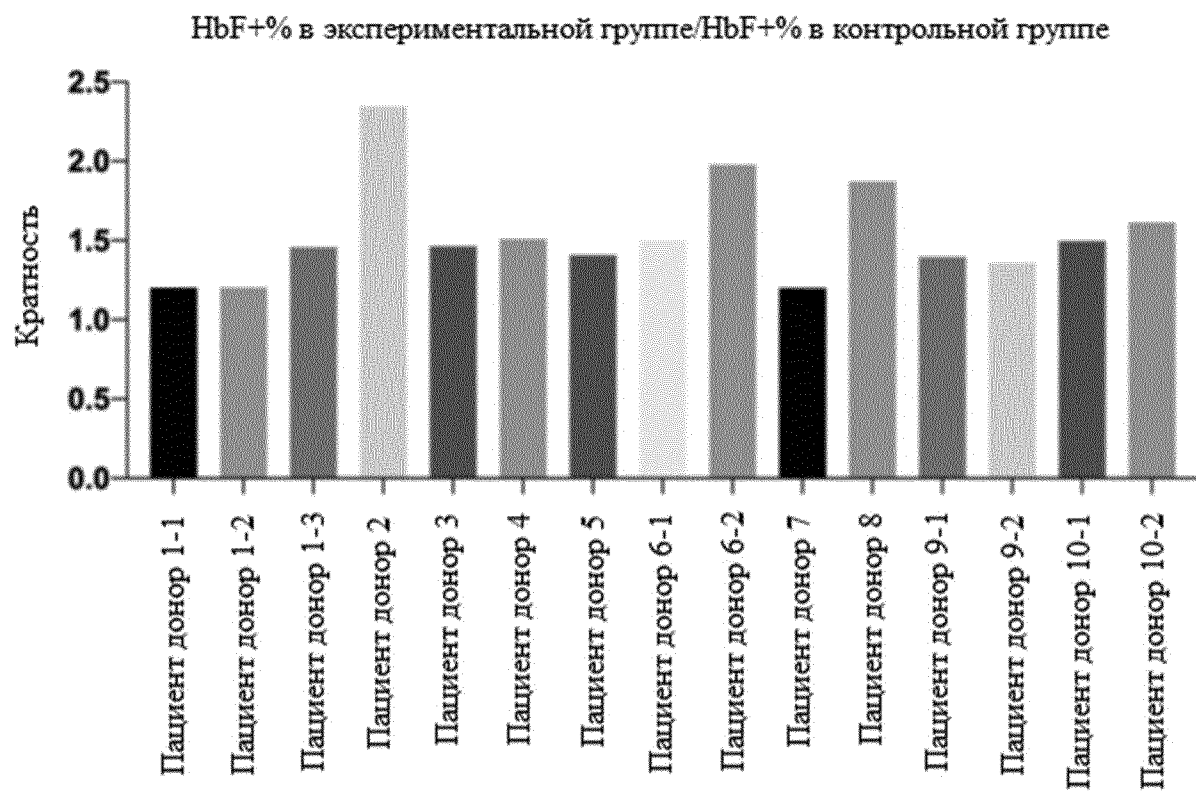
Фиг. 7



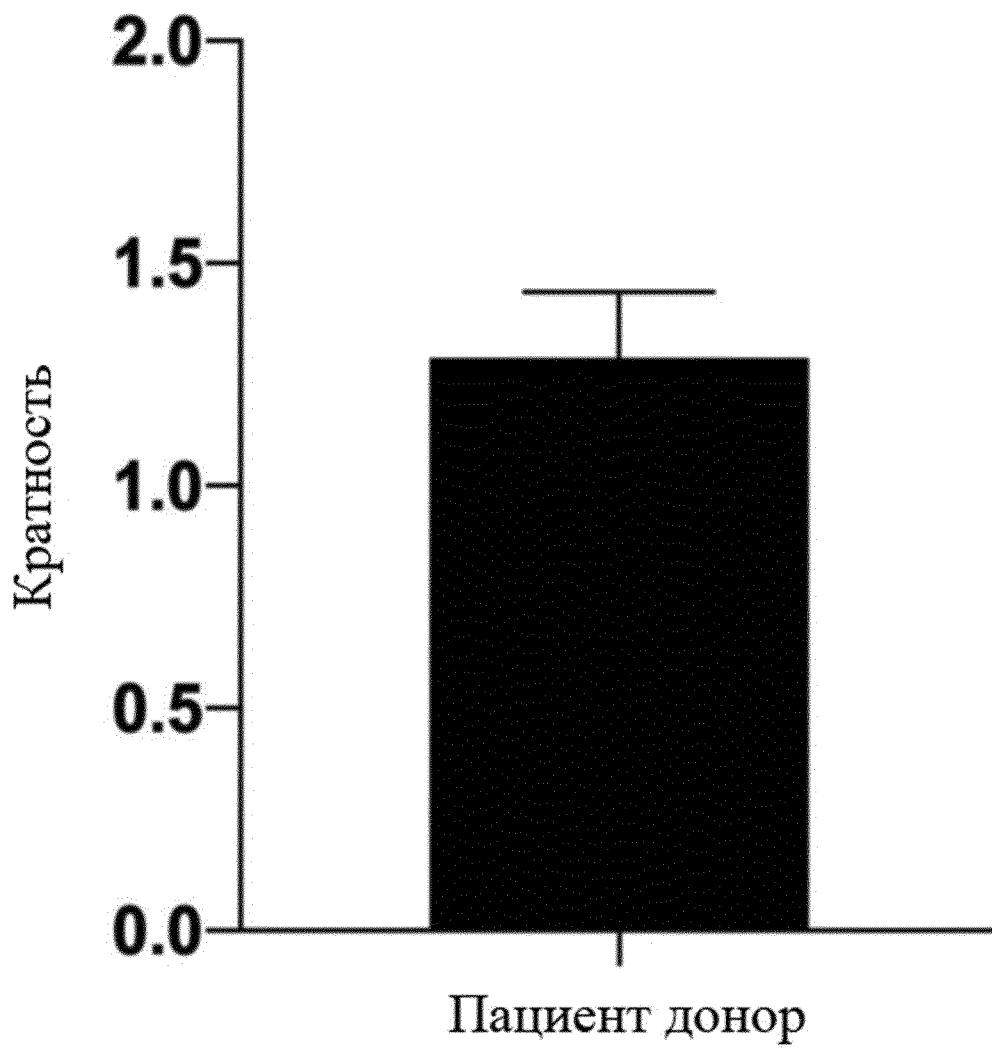
Фиг. 8



Фиг. 9А



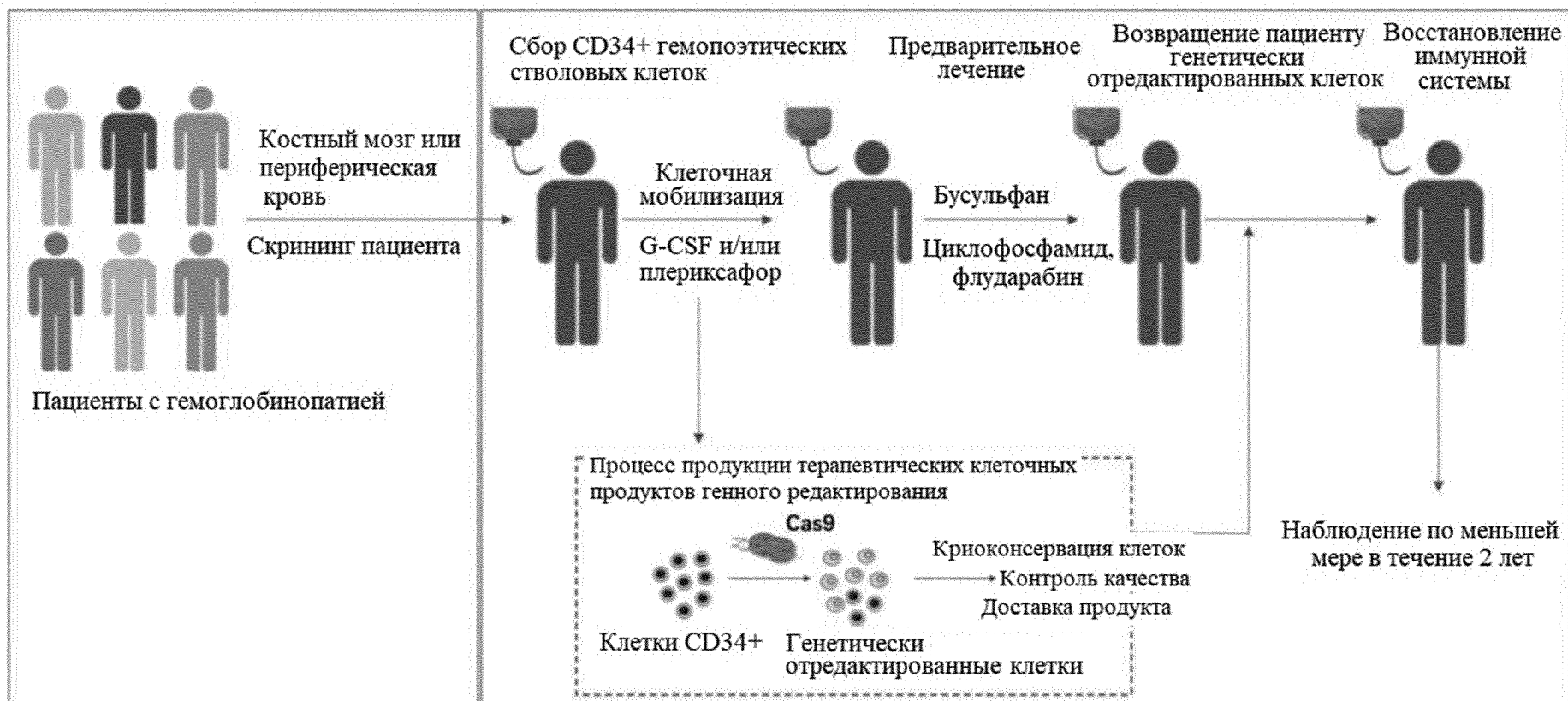
Фиг. 9В



Фиг. 10

Определение пациента по сопутствующей
диагностике

Лечение пациента путем генного редактирования аутологических
гемопоэтических стволовых клеток



Фиг. 11