

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290164** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.04.08

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.06.26

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ Т-КЛЕТОК С ХИМЕРНЫМ АНТИГЕННЫМ РЕЦЕПТОРОМ И ИНГИБИТОРОВ НК-КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

(31) **62/867,764; 62/951,732**

(32) **2019.06.27; 2019.12.20**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2020/056085**

(87) **WO 2020/261219 2020.12.30**

(71) Заявитель:

КРИСПР ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)

(72) Изобретатель:

**Терретт Джонатан Александр, Клейн
Лоуренс, Морава Эвелина (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Способы улучшения клинического исхода у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в лечении, популяции генетически сконструированных иммунных клеток (например, Т-клеток), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), и ингибитора натуральных киллерных (NK) клеток (например, даратумумаба). Генетически сконструированные иммунные клетки могут содержать нарушенный ген TRAC, нарушенный ген B2M или и тот и другой. В настоящем изобретении также представлены композиции для применения в способах.

A1

202290164

202290164

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572423EA/022

ПРИМЕНЕНИЕ Т-КЛЕТОК С ХИМЕРНЫМ АНТИГЕННЫМ РЕЦЕПТОРОМ И ИНГИБИТОРОВ НК-КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет дат подачи предварительной заявки на патент США № 62/867764, поданной 27 июня 2019 г., и предварительной заявки на патент США № 62/951732, поданной 20 декабря 2019 г. Полное содержание каждой из предшествующих заявок включено в данный документ посредством ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Виды терапии на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR) представляют собой терапевтические средства на основе адоптивных Т-клеток, применяемые для лечения злокачественных новообразований у человека. Несмотря на то, что терапия на основе CAR-Т-клеток привела к большому клиническому успеху, включая длительную ремиссию при рецидивирующей/рефрактерной неходжкинской лимфоме (NHL) и остром лимфобластном лейкозе у детей (ALL), одобренные продукты являются аутологичными и требуют сбора и получения клеток для конкретного пациента. В связи с этим у некоторых пациентов в ожидании лечения наблюдалось прогрессирование заболевания или летальный исход. Терапия на основе аллогенных CAR-Т-клеток, содержащих нарушенные комплексы МНС-1, представляет собой перспективный готовый вариант терапии аутологичными CAR-Т-клетками. Однако нарушенный МНС класса I в аллогенных Т-клетках делает CAR-Т-клетки подверженными элиминации иммунной системой хозяина, например посредством иммунного ответа, опосредованного натуральными киллерными (NK) клетками. Соответственно, остается потребность в улучшенной терапии на основе CAR-Т-клеток.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на неожиданном обнаружении того, что антитело к CD38 (даратумумаб), которое является иллюстративным ингибитором NK-клеток, успешно истощало NK-клетки как *in vitro*, так и *in vivo*, но не влияло на количества Т-клеток, включая количества генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), и не активировало CAR-Т-клетки. Дополнительно, неожиданно обнаружили, что предварительная обработка даратумумабом значительно снижала лизис CAR-Т-клеток, опосредованный NK-клетками (например, на примерно 50%), и сохраняла жизнеспособность и количество аллогенных CAR-Т-клеток. Более того, комбинированная терапия даратумумабом и CAR-Т-клетками продемонстрировала синергический эффект в снижении опухолевой нагрузки и увеличении выживаемости в мышинной модели ксенотрансплантата даже в присутствии NK-клеток.

Соответственно, один аспект настоящего изобретения характеризует комбинированную терапию для улучшения клинического исхода, где комбинированная

терапия предусматривает генетически сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор ("CAR" и "CAR-Т-клетки"), и ингибитор NK-клеток (например, антитело к CD38, такое как даратумумаб или его функциональный вариант).

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ улучшения клинического исхода у субъекта, получающего терапию на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), при этом способ включает введение субъекту эффективного количества популяции сконструированных CAR-Т-клеток человека, где сконструированные CAR-Т-клетки человека содержат нарушенный MHC класса I, и где субъект получил или получает эффективное количество ингибитора NK-клеток, за счет чего обеспечивается улучшение клинического исхода у субъекта.

В некоторых примерах способ улучшения клинического исхода у субъекта включает применение в отношении субъекта терапии на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), предусматривающей популяцию сконструированных CAR-Т-клеток человека, где сконструированные CAR-Т-клетки человека содержат (i) нарушенный ген B2M; (ii) нарушенный ген TRAC и (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, и где субъект получил или получает эффективное количество антитела к CD38, за счет чего обеспечивается улучшение клинического исхода у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ улучшения клинического исхода у субъекта, получающего терапию на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), при этом способ включает введение субъекту эффективного количества ингибитора NK-клеток, где субъект получил или получает эффективное количество популяции сконструированных CAR-Т-клеток человека, и где сконструированные CAR-Т-клетки человека содержат нарушенный MHC класса I, вследствие чего снижается активность NK-клеток у субъекта, за счет чего обеспечивается улучшение клинического исхода у субъекта.

В некоторых примерах способ улучшения клинического исхода у субъекта включает введение субъекту эффективного количества антитела к CD38, где субъект получил или получает терапию на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), предусматривающую популяцию сконструированных CAR-Т-клеток человека, где сконструированные CAR-Т-клетки человека содержат (i) нарушенный ген B2M; (ii) нарушенный ген TRAC и (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, за счет чего обеспечивается улучшение клинического исхода у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ улучшения клинического исхода у субъекта, получающего терапию на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), при этом способ включает введение субъекту эффективного количества (a) эффективного количества ингибитора NK-клеток; и (b) эффективного количества популяции сконструированных CAR-Т-клеток человека, где сконструированные CAR-Т-клетки человека содержат нарушенный MHC класса I, за счет чего обеспечивается улучшение клинического исхода у субъекта.

В некоторых примерах представлен способ улучшения клинического исхода у

субъекта, при этом способ включает введение субъекту (а) эффективного количества популяции сконструированных CAR-T-клеток человека, где сконструированные CAR-T-клетки человека содержат (i) нарушенный ген B2M; (ii) нарушенный ген TRAC и (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR; и (b) эффективного количества моноклонального антитела к CD38, за счет чего обеспечивается улучшение клинического исхода у субъекта.

В любом из описанных в данном документе способов улучшенный клинический исход может включать одно или несколько из следующего: (i) снижение активности натуральных киллерных (NK) клеток у субъекта; (ii) повышение у субъекта клинического ответа на терапию CAR-T-клетками; (iii) повышение у субъекта степени сохраняемости сконструированных CAR-T-клеток человека и (iv) уменьшение у субъекта клеточного лизиса сконструированных CAR-T-клеток человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с раком, и улучшенный клинический исход предусматривает одно или несколько из следующего: (i) уменьшение у субъекта размера опухоли или количеств опухолевых клеток и (ii) повышение у субъекта противоопухолевого ответа.

В некоторых примерах клинический ответ на терапию CAR-T-клетками (например, противоопухолевый ответ) у субъекта можно повысить по сравнению с терапией только CAR-T-клетками. В качестве альтернативы клинический ответ на терапию CAR-T-клетками у субъекта можно повысить по сравнению с терапией, содержащей только ингибитор NK-клеток. В еще других примерах повышение клинического ответа может являться аддитивным. В качестве альтернативы повышение клинического ответа может быть синергическим.

В некоторых примерах у субъекта клеточный лизис сконструированных CAR-T-клеток человека можно снижать на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% по сравнению с субъектом, получающим сконструированные CAR-T-клетки человека без ингибитора NK-клеток.

В любом из раскрытых в данном документе способов экспрессия МНС класса I в сконструированных CAR-T-клетках человека является подавленной. В некоторых случаях сконструированные CAR-T-клетки человека могут содержать нарушенный ген бета-2-микроглобулина (B2M). В качестве альтернативы или в дополнение сконструированные CAR-T-клетки человека могут содержать нарушенный ген HLA-A, HLA-B или HLA-C.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные CAR-T-клетки человека содержат (i) нарушенный ген константной области альфа-цепи T-клеточного рецептора (TRAC); (ii) нарушенный ген B2M (например, описанный в данном документе) и (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR. Например, нарушенный ген B2M может предусматривать вставку, делецию и/или замену по меньшей мере одной пары нуклеотидных оснований. В конкретных примерах нарушенный ген B2M сконструированных CAR-T-клеток человека может содержать по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11;

SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14. В качестве альтернативы или в дополнение сконструированные Т-клетки человека могут предусматривать делецию нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 29 в гене TRAC по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых случаях нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, может находиться внутри нарушенного гена TRAC.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток человека могут экспрессировать CAR на обнаруживаемом уровне. В качестве альтернативы или в дополнение менее 0,5% популяции клеток экспрессируют TCR на обнаруживаемом уровне. Дополнительно, по меньшей мере 50% сконструированных CAR-Т-клеток человека могут не экспрессировать поверхностный белок B2M на обнаруживаемом уровне.

В некоторых примерах сконструированные CAR-Т-клетки человека экспрессируют CAR, содержащий эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает опухолевый антиген. Примерные опухолевые антигены включают без ограничений CD19, CD33, CD70 и BCMA. В некоторых примерах опухолевый антиген представляет собой CD19, а антигенсвязывающий фрагмент к CD19 в CAR представляет собой scFv к CD19. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент к CD19 представляет собой человеческий или гуманизированный антигенсвязывающий фрагмент к CD19. В некоторых примерах опухолевый антиген представляет собой BCMA, а антигенсвязывающий фрагмент к BCMA в CAR представляет собой scFv к BCMA. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент к CD19 представляет собой человеческий или гуманизированный антигенсвязывающий фрагмент к BCMA. В некоторых примерах опухолевый антиген представляет собой CD70, а антигенсвязывающий фрагмент к CD70 в CAR представляет собой scFv к CD70. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент к CD70 представляет собой человеческий или гуманизированный антигенсвязывающий фрагмент к CD70. В некоторых примерах опухолевый антиген представляет собой CD33, а антигенсвязывающий фрагмент к CD33 в CAR представляет собой scFv к CD33. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент к CD33 представляет собой человеческий или гуманизированный антигенсвязывающий фрагмент к CD33.

В любом из описанных в данном документе способов ингибитор NK-клеток может уменьшать количество NK-клеток, ингибировать активность NK-клеток или обеспечивать и то и другое. В некоторых примерах ингибитор NK-клеток может уменьшать количество NK-клеток на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%. Не ограничиваясь теорией, ингибитор NK-клеток уменьшает количество NK-клеток посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплементзависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или любых их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток не приводит к существенному уменьшению количеств эндогенных Т-клеток. В качестве альтернативы

или в дополнение ингибитор NK не активирует в значительной степени сконструированные CAR-T-клетки человека.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток может представлять собой малую молекулу, моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, полинуклеотид или их комбинации. В некоторых примерах ингибитор NK-клеток может представлять собой антитело, которое специфически связывает CD38. Например, ингибитор NK-клеток может представлять собой даратумумаб, SAR650984 или MOR202 или их антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых случаях ингибитор NK-клеток представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и даратумумаб, и/или конкурирует с даратумумабом за связывание с CD38. В конкретных примерах антитело может содержать такие же определяющие комплементарность области тяжелой цепи и легкой цепи, что и даратумумаб. Например, антитело может содержать такую же переменную область тяжелой цепи и такую же переменную область легкой цепи, что и даратумумаб.

В любом из описанных в данном документе способов ингибитор NK-клеток можно вводить одновременно с введением популяции сконструированных CAR-T-клеток человека. В качестве альтернативы популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека вводят перед введением ингибитора NK-клеток. В других примерах ингибитор NK-клеток вводят перед введением популяции сконструированных CAR-T-клеток человека.

Любой из раскрытых в данном документе способов может дополнительно включать схему предварительной подготовки перед введением популяции сконструированных CAR-T-клеток человека. Такая схема предварительной подготовки включает схему лимфодеплеции. В некоторых примерах схема лимфодеплеции может включать введение по меньшей мере одного химиотерапевтического средства. Примеры включают циклофосфамид, флударабин или их комбинацию. В конкретных примерах схема лимфодеплеции может включать комбинацию флударабина и циклофосфамида, вводимых посредством внутривенной инфузии.

В некоторых случаях популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека можно вводить через по меньшей мере 48 часов после применения схемы лимфодеплеции. В некоторых примерах популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека можно вводить через по меньшей мере два дня, по меньшей мере три дня (например, по меньшей мере четыре дня, по меньшей мере пять дней, по меньшей мере шесть дней или по меньшей мере семь дней) после применения схемы лимфодеплеции. В некоторых примерах популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека можно вводить не более чем через семь дней после применения схемы лимфодеплеции.

В некоторых случаях схему лимфодеплеции можно применять в течение по меньшей мере одного дня (например, по меньшей мере двух дней, по меньшей мере трех дней или по меньшей мере четырех дней). В конкретных примерах популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека можно вводить в период от 48 часов до семи

дней после применения схемы лимфодеплеции, а схему лимфодеплеции можно применять в течение двух-трех дней.

В некоторых вариантах осуществления популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека можно вводить посредством одной или нескольких внутривенных инфузий. В некоторых примерах популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека вводят посредством однократной внутривенной инфузии. В качестве альтернативы популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека вводят посредством более чем одной внутривенной инфузии. В некоторых примерах один контейнер содержит дозу популяции сконструированных CAR-T-клеток человека. В других примерах более чем один контейнер содержит дозу популяции сконструированных CAR-T-клеток человека.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток можно вводить посредством одной или нескольких внутривенных инфузий. В некоторых примерах ингибитор NK-клеток представляет собой даратумумаб, который можно вводить в дозе от 1 до 24 мг/кг. В конкретных примерах ингибитор NK-клеток представляет собой даратумумаб, который вводят в виде инфузии однократной дозы, составляющей 16 мг/кг. В дополнительных примерах ингибитор NK-клеток представляет собой даратумумаб, который вводят в виде инфузии дробной дозы, составляющей 8 мг/кг. Дробную дозу вводят в последовательные дни.

В некоторых случаях любой из раскрытых в данном документе способов может включать введение субъекту последующей дозы ингибитора NK-клеток. В некоторых примерах последующую дозу ингибитора NK-клеток вводят субъекту, когда количества NK-клеток у субъекта восстанавливаются до приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% от количеств NK-клеток до введения ингибитора NK-клеток.

В одном примере субъекту вводят дозу, составляющую приблизительно от 1×10^7 до 3×10^8 сконструированных CAR-T-клеток человека, экспрессирующих CAR на обнаруживаемом уровне, через по меньшей мере 48 часов, но не более чем через семь дней после терапии с применением лимфодеплеции.

Дополнительно в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая популяцию сконструированных T-клеток человека с химерным антигенным рецептором (CAR), как та, которая раскрыта в данном документе, для применения в терапии на основе CAR-T-клеток в комбинации с эффективным количеством ингибитора NK-клеток, который также раскрыт в данном документе, для лечения рака. В настоящем изобретении также предусмотрены варианты применения композиции, содержащей популяцию сконструированных T-клеток человека с химерным антигенным рецептором (CAR), как та, которая раскрыта в данном документе, для производства первого лекарственного препарата для применения в терапии на основе CAR-T-клеток для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом. Первый лекарственный препарат предусматривает популяцию клеток, включающую сконструированные CAR-T-клетки человека, и первый лекарственный препарат вводят в комбинации со вторым лекарственным препаратом,

содержащим ингибитор NK-клеток и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

Также в объем настоящего изобретения входят

(a) набор, содержащий первый лекарственный препарат, содержащий композицию, содержащую популяцию CAR-T-клеток, которые раскрыты в данном документе, и листок-вкладыш в упаковке, содержащий инструкции по введению композиции в комбинации со вторым лекарственным препаратом, содержащим композицию, которая содержит ингибитор NK-клеток, также раскрытый в данном документе, и необязательный фармацевтически приемлемый носитель, субъекту, нуждающемуся в этом;

(b) набор, содержащий первую композицию, содержащую популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека, которые раскрыты в данном документе, вторую композицию, содержащую ингибитор NK-клеток, также раскрытый в данном документе, и листок-вкладыш в упаковке, содержащий инструкции по введению первой композиции в комбинации со второй композицией субъекту, нуждающемуся в этом; и

(c) набор, содержащий первую композицию, содержащую популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека, которые раскрыты в данном документе, для применения в терапии на основе CAR-T-клеток, вторую композицию, содержащую ингибитор NK-клеток, также раскрытый в данном документе, и листок-вкладыш в упаковке, содержащий инструкции по введению первой композиции в комбинации со второй композицией субъекту для лечения рака.

Подробности одного или нескольких вариантов осуществления настоящего изобретения изложены в описании ниже. Другие особенности или преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующих графических материалов и подробного описания нескольких вариантов осуществления, а также из прилагаемой формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Следующие графические материалы составляют часть настоящего описания изобретения и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения, которое можно лучше понять, обратившись к графическим материалам в комбинации с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в данном документе.

На **фиг. 1A-1B** представлены графики проточной цитометрии, демонстрирующие экспрессию CD38 на CAR-T-клетках. На *фиг. 1A* показана экспрессия CD38 на CAR-T-клетках к ВСМА, измеренная с помощью проточной цитометрии. На *фиг. 1B* показана экспрессия CD38 на CAR-T-клетках к CD19, измеренная с помощью проточной цитометрии. На *фиг. 1C* представлены графики проточной цитометрии, показывающие, что клетки, окрашенные по протоколу контроля флуоресценции без одного антитела (FMO), применяли с целью установления порогового значения гейтирования для измерения клеток CD38+.

На **фиг. 2A-2D** представлены графики проточной цитометрии, демонстрирующие

часов. На *фиг. 5D* показано процентное содержание NK-клеток, экспрессирующих CD38, среди PBMC, культивированных в среде, дополненной 10% комплемента в течение 72 часов.

На **фиг. 6A-6D** представлены графики, демонстрирующие влияние даратумумаба (Dara) на нормальные иммунные клетки (PBMC), полученные от здорового донора, через 96 часов после культивирования либо только в среде, либо в среде, дополненной 10% комплемента. Даратумумаб применяли в дозах 0,01, 0,1 или 1 мкг/мл. Некоторые клетки обрабатывали с использованием контрольного изотипического mAb (Hu IgG1k). На *фиг. 6A* показана частота встречаемости NK-клеток после данных обработок. На *фиг. 6B* показано количество NK-клеток после данных обработок. На *фиг. 6C* показана частота встречаемости T-клеток после данных обработок. На *фиг. 6D* показано количество T-клеток после данных обработок.

На **фиг. 7A-7B** представлены графики, демонстрирующие частоту встречаемости и количество CAR-T-клеток к ВСМА после 72 часов культивирования с даратумумабом (Dara) или контрольным изотипическим mAb (Hu IgG1k) с добавлением 10% комплемента или без него. Даратумумаб применяли в дозах 0,01, 0,1 или 1 мкг/мл. На *фиг. 7A* показана частота встречаемости CAR-T-клеток к ВСМА после данных обработок. На *фиг. 7B* показано количество CAR-T-клеток к ВСМА после данных обработок.

На **фиг. 8A-8N** представлены графики проточной цитометрии, демонстрирующие измерение экспрессии маркера ранней активации CD69 в CAR-T-клетках к CD19 после 24-часового совместного культивирования с даратумумабом в концентрациях 0,01, 0,1 или 1 мкг/мл и с добавлением 2 мкг/мл антитела козы к антителу человека. Также измеряли экспрессию маркеров CD69 после обработки контрольным изотипическим mAb (IgG1k) и с добавлением 2 мкг/мл антитела козы к антителу человека. На *фиг. 8A* показана экспрессия CD69 в CAR-T-клетках к CD19 после 24-часового совместного культивирования без обработки. На *фиг. 8B* показана экспрессия CD69 в CAR-T-клетках к CD19 после 24-часового совместного культивирования с даратумумабом в концентрации 0,01 мкг/мл. На *фиг. 8C* показана экспрессия CD69 в CAR-T-клетках к CD19 после 24-часового совместного культивирования с даратумумабом в концентрации 0,1 мкг/мл. На *фиг. 8D* показана экспрессия CD69 в CAR-T-клетках к CD19 после 24-часового совместного культивирования с даратумумабом в концентрации 1 мкг/мл. На *фиг. 8E* показана экспрессия CD69 в CAR-T-клетках к CD19 после 24-часового совместного культивирования с добавлением 2 мкг/мл антитела козы к антителу человека. На *фиг. 8F* показана экспрессия CD69 в CAR-T-клетках к CD19 после 24-часового совместного культивирования с даратумумабом в концентрации 0,01 мкг/мл и с добавлением 2 мкг/мл антитела козы к антителу человека. На *фиг. 8G* показана экспрессия CD69 в CAR-T-клетках к CD19 после 24-часового совместного культивирования с даратумумабом в концентрации 0,1 мкг/мл и с добавлением 2 мкг/мл антитела козы к антителу человека. На *фиг. 8H* показана экспрессия CD69 в CAR-T-клетках к CD19 после 24-часового совместного культивирования с даратумумабом в концентрации 1 мкг/мл и с добавлением

2 мкг/мл антитела козы к антителу человека. На *фиг. 8I* показана экспрессия CD69 в CAR-T-клетках к CD19 после 24-часового совместного культивирования с IgG1k в концентрации 0,01 мкг/мл. На *фиг. 8J* показана экспрессия CD69 в CAR-T-клетках к CD19 после 24-часового совместного культивирования с IgG1k в концентрации 0,1 мкг/мл. На *фиг. 8K* показана экспрессия CD69 в CAR-T-клетках к CD19 после 24-часового совместного культивирования с IgG1k в концентрации 1 мкг/мл. На *фиг. 8L* показана экспрессия CD69 в CAR-T-клетках к CD19 после 24-часового совместного культивирования с IgG1k в концентрации 0,01 мкг/мл и с добавлением 2 мкг/мл антитела козы к антителу человека. На *фиг. 8M* показана экспрессия CD69 в CAR-T-клетках к CD19 после 24-часового совместного культивирования с IgG1k в концентрации 0,1 мкг/мл и с добавлением 2 мкг/мл антитела козы к антителу человека. На *фиг. 8N* показана экспрессия CD69 в CAR-T-клетках к CD19 после 24-часового совместного культивирования с IgG1k в концентрации 1 мкг/мл и с добавлением 2 мкг/мл антитела козы к антителу человека.

На **фиг. 9A-9B** представлены диаграммы, демонстрирующие лизис CAR-T-клеток в присутствии NK-клеток. На *фиг. 9A* показана частота лизиса CAR-T-клеток к ВСМА в совместной культуре CAR-T-клеток к ВСМА и очищенных NK-клеток от нормального донора, которые предварительно обработали даратумумабом или изотипическим контрольным mAb в концентрации 0,01, 0,1 или 1 мкг/мл. Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения (SEM), где $n=3$. На *фиг. 9B* представлен график проточной цитометрии, демонстрирующий уровни экспрессии TCRa/b и $\beta 2M$ в CAR-T-клетках к ВСМА перед совместным культивированием с NK-клетками, представленными на *фигуре 9A*.

На **фиг. 10A-10C** представлены диаграммы, демонстрирующие опосредованный NK-клетками лизис CAR-T-клеток в присутствии или в отсутствие даратумумаба. На *фиг. 10A* показана частота встречаемости CAR-T-клеток к ВСМА среди CAR-T-клеток после 24-часового совместного культивирования с даратумумабом в концентрации 0,1, 1 или 10 мкг/мл. Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения (SEM), где $n=3$. На *фиг. 10B* показана защита от NK-опосредованного лизиса клеток в совместных культурах CAR-T-клеток к ВСМА с дефицитом B2M и обработанных даратумумабом NK-клеток с соотношением 1:1. NK-клетки получили от нормального донора и предварительно обработали в течение 60 часов даратумумабом или изотипическим контрольным mAb в концентрации 0,1, 1 или 10 мкг/мл. На *фиг. 10C* показана защита от NK-опосредованного лизиса клеток в совместных культурах с соотношением обработанных даратумумабом NK-клеток и CAR-T-клеток к ВСМА, составляющим 3:1. Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения (SEM), где $n=3$.

На **фиг. 11A-11B** представлены графики, демонстрирующие количества NK- и CAR-T-клеток после совместного культивирования CAR-T-клеток к ВСМА с дефицитом B2M с очищенными NK-клетками, которые предварительно обработали в течение 60 часов даратумумабом в любой концентрации из 0,01, 0,1, 1, 10, 100 или 300 мкг/мл.

Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения (SEM), где $n=3$. На *фиг. 11A* показаны количества НК-клеток после совместного культивирования в течение 72 часов. На *фиг. 11B* показаны количества Т-клеток после совместного культивирования в течение 72 часов.

На **фиг. 12** представлен график, демонстрирующий количества НК-клеток, измеренные с помощью проточной цитометрии крови, полученной от мышей, которым инъецировали 100 мкг даратумумаба на мышь и/или $0,4 \times 10^6$ НК-клеток на мышь. Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения (SEM), где $n=3$.

На **фиг. 13** представлен график, демонстрирующий еженедельные измерения биолюминесценции у мышей с иммунодефицитом, которым внутривенно инъецировали $0,5 \times 10^6$ клеток Nalm6/мышь, измерения, полученные после другой внутривенной инъекции НК-клеток, PBS, даратумумаба (DARA), IgG1 и/или CAR-T-клеток к CD19 (4×10^6 клеток/мышь) мышам. Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения (SEM), где $n=3$.

На **фиг. 14A-14C** представлены графики, демонстрирующие объем опухоли и выживаемость мышей с иммунодефицитом, которым внутривенно инъецировали 5×10^6 клеток MM.1S/мышь и которых подвергали обработке даратумумабом, CAR-T-клетками к ВСМА или их комбинацией. На *фиг. 14A* представлены графики, демонстрирующие объем опухоли (вверху) и выживаемость (внизу) мышей, которых подвергали обработке низкой дозой CAR-T-клеток к ВСМА ($0,8 \times 10^6$ CAR⁺-Т-клеток) отдельно или в комбинации с даратумумабом (15 мг/кг). На *фиг. 14B* представлены графики, демонстрирующие объем опухоли (вверху) и выживаемость (внизу) мышей, которых подвергали обработке высокой дозой CAR-T-клеток к ВСМА ($2,4 \times 10^6$ CAR⁺-Т-клеток) отдельно или в комбинации с даратумумабом (15 мг/кг). На *фиг. 14C* представлен график, демонстрирующий объем опухоли в день 26 у мышей, которых подвергали обработке высокой дозой CAR-T-клеток к ВСМА отдельно или в комбинации с даратумумабом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Не желая ограничиваться теорией полагают, что CAR-T-клетки с нарушенным МНС класса I не способны обеспечить необходимое связывание молекул МНС класса I с KIR-рецепторами НК, которое позволяет НК-клеткам элиминировать клетки с достаточной экспрессией МНС-класса I, т. е. аутоантигенные клетки. Таким образом, аллогенные CAR-T-клетки с нарушенным МНС класса I подвержены элиминации посредством НК-опосредованного иммунологического надзора. Обнаружили, что введение ингибитора НК-клеток, с использованием моноклонального антитела к CD38 в качестве примера, приводило к уменьшению количеств НК-клеток. Истощение НК-клеток, в свою очередь, защищает аллогенные CAR-T-клетки от клеточного лизиса, опосредованного НК хозяина. Таким образом, комбинация терапии на основе CAR-T-клеток и ингибиторов НК-клеток представляет собой усовершенствование по сравнению с существующей терапией на основе CAR-T-клеток.

Было показано, что Т-клетки, выделенные из РВМС, также экспрессируют белок CD38 на поверхности клетки. Неожиданно добавление моноклонального антитела к CD38 в дозах, которые истощали NK-клетки, не повлияло на количества Т-клеток, даже после многодневного культивирования с моноклональным антителом к CD38. Добавление моноклонального антитела к CD38 в дозах, которые истощают количества NK-клеток, также не вызывает активацию CAR-T-клеток. Соответственно, не желая ограничиваться теорией полагают, что обработка моноклональными антителами к CD38 является специфической в отношении NK-клеток и индуцирует сокращение NK-клеток, не вызывая нежелательной неспецифической активации или элиминации CAR-T-клеток. Добавление ингибитора NK-клеток, такого как моноклональное антитело к CD38, представляет собой усовершенствование существующей терапии на основе CAR-T-клеток.

Дополнительно продемонстрировали, что влияние антитела к CD38 на NK-клетки не являлось зависимым от комплемента, поскольку добавление комплемента к совместной культуре антитела к CD38 и РВМС не влияло на величину истощения NK-клеток. Более важно, что добавление комплемента не приводило к истощению Т-клеток и не влияло на статус активации CAR-T-клеток. Соответственно, не желая ограничиваться теорией полагают, что введение ингибитора NK-клеток, такого как антитело к CD38, в комбинации с терапией на основе CAR-T-клеток улучшает сохраняемость и эффективность CAR-T-клеток. Более того, в животной модели наблюдали, что антитело к CD38 успешно усиливает противоопухолевый эффект CAR-T-клеток, нацеленных на опухолевый антиген (например, CD19 или BCMA). Не желая ограничиваться теорией полагают, что комбинированная терапия улучшает клинический ответ у субъекта, например посредством повышения противоопухолевой активности терапии на основе CAR-T-клеток.

В настоящем изобретении предусмотрены способы и/или композиции на основе сконструированных Т-клеток, содержащих нарушенный главный комплекс гистосовместимости (МНС) и экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), для применения в комбинации с ингибитором NK-клеток в лечении рака. В некоторых вариантах осуществления данные сконструированные Т-клетки лишены функционального Т-клеточного рецептора (TCR) и содержат нарушенный МНС класса I для снижения риска отторжения субъектом.

Соответственно, один аспект настоящего изобретения характеризует комбинированную терапию для улучшения клинического исхода, где комбинированная терапия предусматривает генетически сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор ("CAR" и "CAR-T-клетки"), и ингибитор NK-клеток (например, антитело к CD38, такое как даратумумаб или его функциональный вариант).

I. Генетически сконструированные Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR)

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены сконструированные Т-клетки человека, экспрессирующие химерный антигенный рецептор

(CAR) (т. е. сконструированные CAR-T-клетки человека). Способы получения CAR-T-клеток известны специалистам средней квалификации в данной области и более подробно описаны ниже. Терапия на основе CAR-T-клеток относится к композициям и/или способам, включающим применение популяции сконструированных CAR-T-клеток человека (т. е. сконструированных CAR-T-клеток человека), для применения в лечении целевого заболевания, такого как рак, у субъекта, нуждающегося в лечении. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе CAR-T-клеток может дополнительно включать схему предварительной подготовки, которая может включать схему лимфодеплеции. Иллюстративная схема лимфодеплеции может включать введение химиотерапевтических лекарственных средств в качестве части схемы лимфодеплеции. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе CAR-T-клеток может включать одну дозу сконструированных CAR-T-клеток человека. В других вариантах осуществления терапия на основе CAR-T-клеток, раскрытая в данном документе, может включать многократные дозы (например, 2 дозы или 3 дозы) сконструированных CAR-T-клеток человека.

Генетически сконструированные CAR-T-клетки (например, CAR-T-клетки человека, раскрытые в данном документе) экспрессируют химерный антигенный рецептор, обладающий специфичностью в отношении представляющего интерес антигена (например, ракового или опухолевого антигена). В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные CAR-T-клетки могут содержать дополнительные генетические редактирования в одном или нескольких целевых генах, например в гене МНС класса I (например, B2M) и/или гене T-клеточного рецептора (например, TRAC).

А. Химерный антигенный рецептор (CAR)

Химерный антигенный рецептор относится к искусственному рецептору иммунных клеток, который сконструирован для распознавания и связывания антигена, экспрессируемого опухолевыми клетками. Как правило CAR конструируют для T-клетки, и он представляет собой химеру из сигнального домена комплекса T-клеточного рецептора (TCR) и антигенраспознающего домена (например, одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv) антитела или другого антигенсвязывающего фрагмента) (Enblad et al., Human Gene Therapy. 2015; 26(8):498-505). T-клетка, которая экспрессирует CAR, называется CAR-T-клеткой. CAR обладают способностью перенаправлять специфичность и реактивность T-клеток в направлении выбранной мишени без рестриктирования по МНС. Распознавание антигена без рестриктирования по МНС придает T-клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антиген независимо от процессинга антигена, тем самым обходя основной механизм ускользания опухоли. Более того, при экспрессии в T-клетках CAR преимущественно не димеризуются с альфа- и бета-цепями эндогенного T-клеточного рецептора (TCR).

Существует четыре поколения CAR, каждое из которых содержит различные компоненты. В CAR первого поколения соединены scFv, полученный из антитела, и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета (ζ или z) T-клеточного рецептора через

шарнирный и трансмембранный домены. В CAR второго поколения включен дополнительный домен, например CD28, 4-1BB (41BB) или ICOS, для обеспечения костимулирующего сигнала. В CAR третьего поколения содержатся два костимулирующих домена, слитых с цепью CD3- ζ TCR. Костимулирующие домены в молекулах третьего поколения могут включать, например, комбинацию CD3 ζ , CD27, CD28, 4-1BB, ICOS или OX40. В некоторых вариантах осуществления CAR содержат эктодомен (например, CD3 ζ), обычно полученный из одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), шарнирный участок, трансмембранный домен и эндодомен с одним (первое поколение), двумя (второе поколение) или тремя (третье поколение) сигнальными доменами, происходящими из CD3z и/или костимулирующих молекул (Maude et al., Blood. 2015; 125(26):4017-4023; Kakarla and Gottschalk, Cancer J. 2014; 20(2):151-155).

Как правило, CAR отличаются по своим функциональным свойствам. Сигнальный домен CD3 ζ T-клеточного рецептора, когда он задействован, будет активировать и индуцировать пролиферацию T-клеток, но может приводить к анергии (отсутствие реакции со стороны защитных механизмов организма, что приводит к прямой индукции толерантности периферических лимфоцитов). Лимфоциты считаются анергическими, когда они не отвечают на специфический антиген. Добавление костимулирующего домена в CAR второго поколения улучшило репликативную способность и сохраняемость модифицированных T-клеток. Аналогичные противоопухолевые эффекты наблюдают *in vitro* касательно CAR к CD28 или 4-1BB. Клинические испытания показывают, что оба данных CAR второго поколения способны индуцировать значительную пролиферацию T-клеток *in vivo*. В CAR третьего поколения объединено несколько сигнальных (костимулирующих) доменов для усиления эффективности.

В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор представляет собой CAR первого поколения. В других вариантах осуществления химерный антигенный рецептор представляет собой CAR второго поколения. В еще одних вариантах осуществления химерный антигенный рецептор представляет собой CAR третьего поколения.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный (экто) домен, содержащий антигенсвязывающий домен (например, антитело, такое как scFv), трансмембранный домен и цитоплазматический (эндо) домен.

(i) Эктодомен

Эктодомен представляет собой область CAR, которая подвергается воздействию внеклеточной жидкости, и в некоторых вариантах осуществления он включает антигенсвязывающий домен и необязательно сигнальный пептид, спейсерный домен и/или шарнирный домен. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который включает VL и VH иммуноглобинов, соединенные коротким линкерным пептидом. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидрофильные остатки с фрагментами из глицина и серина для гибкости, а также фрагментами из глутамата и

лизна для дополнительной растворимости. Одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) представляет собой слитый белок из вариабельных областей тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей иммуноглобулинов, соединенных коротким линкерным пептидом длиной от десяти до приблизительно 25 аминокислот. Обычно линкер богат глицином для придания гибкости, а также серином или треонином для обеспечения растворимости и может соединять либо N-конец VH с C-концом VL, либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера.

В некоторых вариантах осуществления scFv по настоящему изобретению является гуманизированным. В других вариантах осуществления scFv является полностью человеческим. В еще других вариантах осуществления scFv представляет собой химеру (например, из мышиной и человеческой последовательностей).

В некоторых примерах эктодомен CAR, раскрытый в данном документе, представляет собой scFv к CD19, например scFv к CD19, включающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 54 (VH) и SEQ ID NO: 55 (VL). В одном примере scFv к CD19 может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50.

В некоторых примерах эктодомен CAR, раскрытый в данном документе, представляет собой scFv к CD70, например scFv к CD70, включающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 81 (VH) и SEQ ID NO: 82 (VL). В одном примере scFv к CD70 может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 78 или SEQ ID NO: 80.

В других примерах эктодомен CAR, раскрытый в данном документе, представляет собой scFv к BCMA, например scFv к BCMA, включающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 89 (VH) и SEQ ID NO: 90 (VL). В одном примере scFv к BCMA может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 88.

В еще других примерах эктодомен CAR, раскрытый в данном документе, может представлять собой scFv к CD33, например scFv к CD33, включающий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 116 (VH) и SEQ ID NO: 117 (VL). В одном примере scFv к CD33 может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 113.

Дополнительную информацию относительно последовательностей scFv для применения при конструировании CAR, раскрытого в данном документе, например CAR, нацеливающегося на CD19, BCMA, CD70 или CD33, можно найти в WO2019/097305, WO2019/215500 и WO2020/095107, соответствующие раскрытия каждого из которых включены посредством ссылки в отношении цели и предмета изобретения, упоминаемых в данном документе.

Сигнальный пептид может усиливать антигенную специфичность связывания CAR. Сигнальные пептиды могут быть получены из антител, таких как без ограничения CD8, а также эпитопных меток, таких как без ограничения GST или FLAG. Примеры сигнальных пептидов включают MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP (SEQ ID NO: 30) и MALPVTALLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 31). Можно использовать другие

сигнальные пептиды.

В некоторых вариантах осуществления спейсерный домен или шарнирный домен расположены между внеклеточным доменом (содержащим антигенсвязывающий домен) и трансмембранным доменом CAR или между цитоплазматическим доменом и трансмембранным доменом CAR. Спейсерный домен представляет собой любой олигопептид или полипептид, функции которого заключаются в связывании трансмембранного домена с внеклеточным доменом и/или цитоплазматическим доменом в полипептидной цепи. Шарнирный домен представляет собой любой олигопептид или полипептид, функции которого заключаются в обеспечении гибкости CAR или его доменов или в предупреждении стерических затруднений у CAR или его доменов. В некоторых вариантах осуществления спейсерный домен или шарнирный домен могут содержать не более 300 аминокислот (например, от 10 до 100 аминокислот или от 5 до 20 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления один или несколько спейсерных доменов могут быть включены в другие области CAR. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой шарнирный домен CD8. Можно применять другие шарнирные домены.

В некоторых вариантах осуществления эктодомен любой из конструкций CAR, раскрытых в данном документе, нацелен на (например, специфически связывается с) раковый или опухолевый антиген. Термины "раковый антиген" и "опухолевый антиген" используются в данном документе взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления опухолевый или раковый антиген представляет собой "ассоциированный с опухолью антиген", относящийся к иммуногенной молекуле, такой как белок, которая обычно экспрессируется на более высоком уровне в опухолевых клетках, чем в отличных от опухолевых клетках, в которых она может не экспрессироваться вообще или экспрессироваться только на низких уровнях. В некоторых вариантах осуществления ассоциированные с опухолью структуры, которые распознаются иммунной системой хозяина, несущего опухоль, называются ассоциированными с опухолью антигенами. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с опухолью антиген представляет собой универсальный опухолевый антиген, который широко экспрессируется большинством опухолей. В некоторых вариантах осуществления ассоциированные с опухолью антигены представляют собой дифференцировочные антигены, мутационные антигены, сверхэкспрессированные клеточные антигены или вирусные антигены. В некоторых вариантах осуществления опухолевый или раковый антиген представляет собой "опухолеспецифический антиген" или "TSA," относящийся к иммуногенной молекуле, такой как белок, которая является уникальной для опухолевой клетки. Опухолеспецифические антигены экспрессируются исключительно в опухолевых клетках. Примеры раковых антигенов представлены ниже.

CD19

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют с химерным антигенным рецептором (CAR), разработанным

для нацеливания на CD19. Кластер дифференцировки 19 (CD19) представляет собой антигенную детерминанту, обнаруживаемую на лейкозных клетках-предшественниках. Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот человека и мыши можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотная последовательность CD19 человека может быть найдена под номером доступа в UniProt/Swiss-Prot P15391, а нуклеотидная последовательность, кодирующая CD19 человека, может быть найдена под номером доступа NM-001178098. CD19 экспрессируется при большинстве видов рака, ассоциированного с линией дифференцировки В-клеток, включая, например, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз и неходжкинскую лимфому. Он также является ранним маркером предшественников В-клеток. См., например, Nicholson et al. *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157-1165 (1997).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют для экспрессии CAR, содержащего антитело к CD19 (например, scFv к CD19). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, содержащий вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD19, кодируется нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD19, содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, кодируемый нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 49 и необязательно кодирующей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, содержащий VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD19, кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 39 и необязательно кодирующей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD19, содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 40.

BCMA

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют с CAR, разработанным для нацеливания на BCMA. Антиген созревания В-клеток (BCMA, CD269) является представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF). BCMA связывает активирующий В-клетки фактор (BAFF) и индуцирующий пролиферацию лиганд (APRIL). Среди незлокачественных клеток BCMA экспрессируется в основном плазматическими клетками и подгруппами зрелых В-клеток. BCMA селективно экспрессируется линией дифференцировки В-клеток, включая клетки множественной миеломы и неходжкинской лимфомы, поэтому BCMA также является привлекательной терапевтической мишенью.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют для экспрессии CAR, содержащего антитело к BCMA (например, scFv к BCMA). В некоторых вариантах осуществления антитело к BCMA представляет собой scFv к BCMA, кодируемый нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления антитело к BCMA представляет собой scFv к BCMA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления антитело к BCMA представляет собой scFv к BCMA, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 89. В качестве альтернативы или в дополнение антитело к BCMA представляет собой scFv к BCMA, содержащий VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к BCMA, кодируется последовательностью под SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащей антитело к BCMA, содержит последовательность под SEQ ID NO: 86.

В некоторых вариантах осуществления антитело к BCMA представляет собой scFv к BCMA, кодируемый нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 87 и необязательно кодирующей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:88. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА представляет собой scFv к ВСМА, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА представляет собой scFv к ВСМА, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 89. В качестве альтернативы или в дополнение антитело к ВСМА представляет собой scFv к ВСМА, содержащий VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к ВСМА, кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 85 и необязательно кодирующей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:86. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к ВСМА, содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 86.

CD33

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют с CAR, разработанным для нацеливания на CD33. CD33, также известный как Siglec3, представляет собой трансмембранный рецептор, экспрессируемый на клетках миелоидного происхождения, который, как известно, связывает сиаловые кислоты. Поскольку CD33 экспрессируется в раковых клетках (например, при остром миелоидном лейкозе), считается, что CD33 представляет собой маркер клеточной поверхности для нацеливания на эти злокачественные опухоли.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют для экспрессии CAR, содержащего антитело к CD33 (например, scFv к CD33). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD33, кодируемый нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD33, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD33, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 116. В качестве альтернативы или в дополнение антитело к CD33 представляет собой

scFv к CD33, содержащий VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 117. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD33, кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 115.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD33, кодируемый нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 114 и необязательно кодирующей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD33, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD19, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 116. В качестве альтернативы или в дополнение антитело к CD33 представляет собой scFv к CD33, содержащий VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 117. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD33, кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 112 и необязательно кодирующей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD33, содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 115.

CD70

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют с химерным антигенным рецептором (CAR), разработанным для нацеливания на CD70. CD70 сперва идентифицировали как лиганд для CD27, костимулирующий рецептор, вовлеченный в пролиферацию и выживание Т-клеток. CD70 обнаруживается только на небольшом проценте активированных Т-клеток и антигенпрезентирующих клеток в дренирующих лимфатических узлах во время вирусной инфекции. Многие опухоли человека также экспрессируют CD70, в том числе без ограничения виды солидного рака, такие как светлоклеточный рак почки, рак молочной

железы, рак желудка, рак яичника, глиобластома и гематологические злокачественные опухоли. Из-за ограниченного паттерна экспрессии в нормальных тканях и сверхэкспрессии при многих видах рака CD70 является привлекательной терапевтической мишенью.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют для экспрессии CAR, содержащего антитело к CD70 (например, scFv к CD70). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, кодируемый нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 77 или 79. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 78 или 80. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 81. В качестве альтернативы или в дополнение антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, содержащий VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD70, кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD70, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, кодируемый нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 77 или 79 и необязательно кодирующей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 78 и 80, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 78 или 80. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 81. В качестве альтернативы или в дополнение антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, содержащий VL, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD70, кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 75 и необязательно кодирующей

аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:76. В некоторых вариантах осуществления CAR, содержащий антитело к CD70, содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 76.

(ii) Трансмембранный домен

Трансмембранный домен представляет собой гидрофобную альфа-спираль, которая пронизывает мембрану. Трансмембранный домен обеспечивает стабильность CAR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR, представленный в данном документе, представляет собой трансмембранный домен CD8. В других вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28. В еще одних вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой химеру из трансмембранного домена CD8 и CD28. Могут применяться другие трансмембранные домены. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8a, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32.

(iii) Эндодомен

Эндодомен представляет собой функциональный конец рецептора. После распознавания антигена рецепторы образуют кластер и сигнал передается в клетку. Наиболее часто используемым компонентом эндодомена является CD3-дзета, который содержит три (3) иммунорецепторных мотива активации на основе тирозина (ITAM). Он передает сигнал активации Т-клетке после связывания антигена. Иллюстративный CD3-дзета содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, которая может кодироваться нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 37. Во многих случаях CD3-дзета не может обеспечить полностью компетентный сигнал активации и, таким образом, применяется костимулирующая передача сигнала. Например, для передачи пролиферативного сигнала/сигнала выживания с CD3-дзета (CD3 ζ) можно применять CD28 и/или 4-1BB. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен CAR, предусмотренный в данном документе, состоит из костимулирующей молекулы CD28 (например, костимулирующий домен, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36, которая может кодироваться нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 35). В других вариантах осуществления костимулирующий домен может состоять из костимулирующей молекулы 4-1BB (например, костимулирующий домен, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, которая может кодироваться нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления CAR включает CD3 ζ и костимулирующий домен CD28. В других вариантах осуществления CAR включает CD3-дзета и костимулирующий домен 4-1BB. В еще других вариантах осуществления CAR включает CD3 ζ , костимулирующий домен CD28 и костимулирующий домен 4-1BB.

(iv) Иллюстративные конструкции CAR

Ниже представлен ряд иллюстративных конструкций CAR, которые могут экспрессироваться в генетически сконструированных CAR-T-клетках для применения в комбинированной терапии, раскрытой в данном документе. Дополнительную информацию относительно конструкций CAR для применения согласно настоящему изобретению, например CAR, нацеливающегося на CD19, BCMA, CD70 или CD33, можно найти в WO2019/097305, WO2019/215500 и WO2020/095107, соответствующие раскрытия каждого из которых включены посредством ссылки в отношении цели и предмета изобретения, упоминаемых в данном документе.

CAR к CD19

В некоторых вариантах осуществления сконструированные T-клетки, описанные в данном документе, содержат нацеливающийся на CD19 химерный антигенный рецептор (CAR), также называемый в данном документе CAR к CD19 или CAR-T-клетки к CD19. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент к CD19, (ii) трансмембранный домен и (iii) эндодомен, содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент к CD19, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28 или 41BB и костимулирующий домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент к CD19, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28 и костимулирующий домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент к CD19, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB и костимулирующий домен CD3-дзета.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит антитело к CD19 (например, scFv к CD19), которое содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 54 и 55, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 (например, scFv к CD19) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) в VH, изложенной под SEQ ID NO: 54, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) в VL, изложенной под SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 (например, scFv к CD19) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) в VH, изложенной под SEQ ID NO: 54, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) в VL, изложенной под SEQ ID NO: 55, где CDR определяют по Kabat. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 (например, scFv к CD19) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) в VH, изложенной под SEQ ID NO: 54, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) в VL, изложенной под SEQ ID NO: 55, где CDR определяют по Chothia. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 (например, scFv к CD19) содержит три CDR (CDR1,

CDR2 и CDR2) в VH, изложенной под SEQ ID NO: 54, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) в VL, изложенной под SEQ ID NO: 55, где CDR определяют по AbM. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 (например, scFv к CD19) содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 127, 128 и 129, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 124, 125 и 126. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 (например, scFv к CD19) содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 130, 131 и 129, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 124, 125, 126. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой scFv к CD19, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 49.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент к CD19, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 36, и костимулирующий домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент к CD19, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 50, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 36, и костимулирующий домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент к CD19, содержащий переменные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 54 и 55, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 36, и костимулирующий домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент к CD19, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность,

изложенную под SEQ ID NO: 32, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 35, и костимулирующий домен CD3-дзета, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент к CD19, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 49, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 35, и костимулирующий домен CD3-дзета, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент к CD19, содержащий переменные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 54 и 55, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 35, и костимулирующий домен CD3-дзета, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 кодируется нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 39 и необязательно кодирующей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40.

CAR к CD33

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, содержат нацеливающийся на CD33 CAR, также называемый в данном документе как CAR для CD33, CAR к CD33 или CAR-Т-клетки к CD33. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен к CD33, (ii) трансмембранный домен и (iii) эндодомен, содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен к CD33, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28 или 41BB и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33

содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен к CD33, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен к CD33, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB и сигнальный домен CD3-дзета.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 (например, scFv к CD33) в CAR к CD33, раскрытом в данном документе, содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 116 и 117, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 (например, scFv к CD33) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) в VH, изложенной под SEQ ID NO: 116, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) в VL, изложенной под SEQ ID NO: 117. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 (например, scFv к CD33) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) в VH, изложенной под SEQ ID NO: 116, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) в VL, изложенной под SEQ ID NO: 117, где CDR определяют по Kabat. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 (например, scFv к CD33) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) в VH, изложенной под SEQ ID NO: 116, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) в VL, изложенной под SEQ ID NO: 117, где CDR определяют по Chothia. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 (например, scFv к CD33) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) в VH, изложенной под SEQ ID NO: 116, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) в VL, изложенной под SEQ ID NO: 117, где CDR определяют по AbM. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 (например, scFv к CD33) содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 118, 119 и 120, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 121, 122 и 123. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 (например, scFv к CD33) содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 132, последовательность CDR2 тяжелой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 94, и последовательность CDR3 тяжелой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 120, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 121, 122 и 123 (см. таблицу последовательностей). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD33, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 представляет собой scFv к CD33, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 114.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен к CD33, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 34, и сигнальный

домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 содержит (i) эктодомен, который содержит scFv к CD33, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:113, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 34, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:38.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 содержит (i) эктодомен, который содержит scFv к CD33, содержащий вариабельные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 116 и 117, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 34, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 кодируется нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD33 кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 112 и необязательно кодирующей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:115.

CAR к BCMA

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, содержат нацеливающийся на BCMA CAR, также называемый в данном документе как CAR для BCMA, CAR к BCMA или CAR-Т-клетки к BCMA. В некоторых вариантах осуществления CAR к BCMA содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен к BCMA, (ii) трансмембранный домен и (iii) эндодомен, содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления CAR к BCMA содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен к BCMA, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28 или 41BB и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR к BCMA содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен к BCMA, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR к BCMA содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен к BCMA,

(ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB и сигнальный домен CD3-дзета.

В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА (например, scFv к ВСМА) в CAR к ВСМА, раскрытом в данном документе, содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 89 и 90. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА (например, scFv к ВСМА) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) в VH, изложенной под SEQ ID NO: 89, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) в VL, изложенной под SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА (например, scFv к ВСМА) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) в VH, изложенной под SEQ ID NO: 89, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) в VL, изложенной под SEQ ID NO: 90, где CDR определяют по Kabat. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА (например, scFv к ВСМА) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) в VH, изложенной под SEQ ID NO: 89, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) в VL, изложенной под SEQ ID NO: 90, где CDR определяют по Chothia. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА (например, scFv к ВСМА) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) в VH, изложенной под SEQ ID NO: 89, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) в VL, изложенной под SEQ ID NO: 90, где CDR определяют по AbM. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА (например, scFv к ВСМА) содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 106, 108 и 110, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 103, 104 и 105. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА (например, scFv к ВСМА) содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 107, 109 и 110, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 103, 104 и 105. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА представляет собой scFv к ВСМА, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА представляет собой scFv к ВСМА, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен к ВСМА, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 34, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА содержит (i) эктодомен, который содержит scFv к ВСМА, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 88, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, и (iii) эндодомен,

который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 34, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:38.

В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА содержит (i) эктодомен, который содержит scFv к ВСМА, содержащий переменные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 89 и 90, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 34, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА кодируется нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 85 и необязательно кодирующей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:86.

CAR к CD70

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, содержат нацеливающийся на CD70 CAR, также называемый в данном документе как CAR для CD70, CAR к CD70 или CAR-Т-клетки к CD70. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен к CD70, (ii) трансмембранный домен и (iii) эндодомен, содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен к CD70, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28 или 41BB и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен к CD70, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен к CD70, (ii) трансмембранный домен CD8 и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB и сигнальный домен CD3-дзета.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 (например, scFv к CD70) в CAR к CD70, раскрытом в данном документе, содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 81 и 82. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 (например, scFv к CD70)

содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) в VH, изложенной под SEQ ID NO: 81, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) в VL, изложенной под SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 (например, scFv к CD70) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) в VH, изложенной под SEQ ID NO: 81, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) в VL, изложенной под SEQ ID NO: 82, где CDR определяют по Kabat. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 (например, scFv к CD70) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) в VH, изложенной под SEQ ID NO: 81, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) в VL, изложенной под SEQ ID NO: 82, где CDR определяют по Chothia. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 (например, scFv к CD70) содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR2) в VH, изложенной под SEQ ID NO: 81, и три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) в VL, изложенной под SEQ ID NO: 82, где CDR определяют по AbM. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 (например, scFv к CD70) содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 97, 99 и 101, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 91, 93 и 95. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 (например, scFv к CD70) содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 98, 100 и 102, и последовательность CDR1 легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 92, последовательность CDR2 легкой цепи, изложенную как LAS, и последовательность CDR3 легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 96 (см. таблицу последовательностей ниже). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой scFv к CD70, кодируемый нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 содержит (i) эктодомен, который содержит антигенсвязывающий домен к CD70, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 34, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 содержит (i) эктодомен, который содержит scFv к CD70, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 80, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, и (iii) эндодомен, который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную

последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 74, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 содержит (i) эктодомен, который содержит scFv к CD70, содержащий переменные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные соответственно под SEQ ID NO: 81 и 82, (ii) трансмембранный домен CD8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, и (iii) эндомен, который содержит костимулирующий домен 41BB, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 34, и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 кодируется нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD70 кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с нуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 75 и необязательно кодирующей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 76.

(v) Экспрессия химерного антигенного рецептора в Т-клетках

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, вводят в сконструированную клетку с помощью способов, известных специалистам в данной области. Например, CAR может быть введен в сконструированную клетку с помощью вектора. Для введения любого из нуклеиновых кислот или векторов экспрессии, раскрытых в данном документе, в иммунную эффекторную клетку можно применять ряд различных способов, известных из уровня техники. Неограничивающие примеры способов введения нуклеиновой кислоты в клетку включают липофекцию, трансфекцию (например, трансфекцию с фосфатом кальция, трансфекцию с использованием широко разветвленных органических соединений, трансфекцию с использованием катионных полимеров, трансфекцию на основе дендримеров, оптическую трансфекцию, трансфекцию на основе частиц (например, трансфекцию с помощью наночастиц) или трансфекцию с использованием липосом (например, катионных липосом), микроинъекцию, электропорацию, сжатие клеток, сонопорацию, слияние протопластов, импалефекцию, гидродинамическую доставку, генную пушку, магнитофекцию, вирусную трансфекцию и нуклеофекцию.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, вводят в сконструированную клетку в качестве донорной матрицы, как описано ниже.

В. Редактирование генов Т-клеток

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки по настоящему изобретению предусматривают по меньшей мере одно редактирование гена, например нарушенный МНС класса I. Например, сконструированная Т-клетка может

содержать нарушенный ген бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$). В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки по настоящему изобретению предусматривают более одного редактирования гена, например в более чем одном гене. Например, сконструированная Т-клетка может содержать нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC), нарушенный ген $\beta 2M$ или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген TRAC и нарушенный ген $\beta 2M$.

Следует учитывать, что нарушение гена охватывает генную модификацию посредством редактирования генов (например, использование редактирования генов с помощью CRISPR/Cas для вставки или делеции одного или нескольких нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген представляет собой ген, который не кодирует функциональный белок. В некоторых вариантах осуществления клетка, которая содержит нарушенный ген, не экспрессирует (например, на клеточной поверхности) на обнаруживаемом уровне (например, с помощью антитела, например посредством проточной цитометрии) белок, кодируемый геном. Клетка, которая не экспрессирует белок на обнаруживаемом уровне, может называться нокаутной клеткой. Например, клетка с отредактированным геном $\beta 2M$ может считаться клеткой, нокаутной по $\beta 2M$, если белок $\beta 2M$ не может быть выявлен на клеточной поверхности с применением антитела, которое специфически связывает белок $\beta 2M$.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены популяции клеток, в которых определенный процент клеток был отредактирован (например, отредактирован ген $\beta 2M$), что привело к отсутствию экспрессии конкретного гена и/или белка у определенного процента клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 85%) клеток в популяции клеток с отредактированным геном являются клетками, нокаутными по $\beta 2M$. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% клеток (например, Т-клеток) популяции не экспрессируют белок $\beta 2M$ на обнаруживаемых уровнях. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток в популяции клеток с отредактированным геном могут быть клетками, нокаутными по $\beta 2M$.

Известны способы применения технологии редактирования гена с помощью CRISPR-Cas для получения геномной делеции в клетке (например, для нокаута гена в клетке) (Bauer DE et al. *Vis. Exp.* 2015;95:e52118).

(i) Нарушенный МНС класса I

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены сконструированные Т-клетки человека (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека) с нарушенным главным комплексом гистосовместимости (МНС) для применения в способах, описанных в данном документе. Термины "МНС класса I" и

"комплекс МНС класса I" используются в данном документе взаимозаменяемо. Гены HLA, которых у человека более 40, кодируют три класса белков МНС (I, II, III), которые экспрессируются на поверхности клеток или являются компонентами системы комплемента. Гены HLA весьма разнообразны, с сотнями известных аллельных вариаций. Такое генетическое разнообразие приводит к экспрессии весьма переменных молекул МНС. Молекулы МНС играют важную роль в иммунной регуляции, поскольку их основная функция заключается в связывании пептидных антигенов для презентирования иммунным клеткам. Структурно разнообразные молекулы МНС уникально связываются с белковыми антигенами, и последующая презентация антигена с помощью МНС класса I является критическим этапом в уравнивании иммунного ответа на аутоантигены (поддержание толерантности во избежание аутоиммунной реакции) по сравнению с чужеродными антигенами (усиление иммунной атаки на инфицированные или злокачественные клетки). См., например, Skelton TS et al., *Open J. Immunol.* (2011), 1(2):15-26; Petersdorf EW, *Blood* (2013), 122(11):1862-1872.

Молекулы МНС класса I присутствуют во всех ядросодержащих клетках и состоят из двух компонентов (например: субъединиц молекул МНС класса I): первой тяжелой цепи α , содержащей аминокислотные последовательности (т. е. $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$), кодируемые генами HLA-A, B и C, нековалентно связанной со вторым пептидом $\beta 2$ -микроглобулина ($\beta 2M$). Эти два компонента образуют уникальную пептид-связывающую бороздку, по которой связывается собственный или чужеродный пептидный антиген, образуя молекулу МНС класса I. В контексте трансплантации, МНС класса I от аллогенного (не совместимого по HLA) донора представляет отличающийся, не свой МНС класса I, который вызывает иммунную реакцию для отражения "чужеродных агентов".

Для предотвращения распознавания аллогенного (не своего) МНС класса I и последующей элиминации клеток, содержащих аллогенный (не свой) МНС класса I, Т-клетками реципиента или хозяина, аллогенные CAR-T-клетки конструируют с нарушением или удалением одной или нескольких субъединиц молекул МНС класса I. Нарушение субъединицы молекулы МНС класса I на аллогенных сконструированных CAR-T-клетках предотвращает иммунную активацию, вызываемую соединением чужеродного МНС класса I с иммунными Т-клетками хозяина. В дополнение, сконструированные CAR-T-клетки с нарушенным МНС класса I не могут соединяться с ингибирующими рецепторами NK-клеток хозяина (например, Ig-подобными рецепторами киллерных клеток (KIR)), необходимыми для поддержания ауто толерантности. В отсутствие взаимодействия МНС класса I с рецепторами NK-клеток сконструированные CAR-T-клетки подвержены элиминации, опосредованной NK хозяина/реципиента.

Соответственно, в некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрены способы снижения NK-опосредованной элиминации сконструированных CAR-T-клеток. В некоторых аспектах настоящее изобретение также предусматривает способы снижения активности NK-клеток у субъекта, получающего сконструированные CAR-T-клетки человека. В некоторых вариантах осуществления сконструированные CAR-T-клетки

человека содержат нарушенный МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления экспрессия МНС класса I в сконструированных CAR-T-клетках человека ингибируется. В некоторых вариантах осуществления ингибирование МНС класса I осуществляется посредством генетической инактивации или мутации генов HLA. В некоторых вариантах осуществления ингибирование МНС класса I осуществляется посредством генетической инактивации или мутации гена $\beta 2M$.

В некоторых вариантах осуществления клетки, содержащие нарушенный МНС класса I, характеризуются потерей функции МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления нарушенный комплекс МНС класса I делает сконструированные CAR-T-клетки неаллореактивными и пригодными для аллогенной трансплантации. В некоторых вариантах осуществления нарушенный комплекс МНС класса I минимизирует риск реакций трансплантат против хозяина.

В некоторых вариантах осуществления нарушение гена предусматривает модификацию гена посредством редактирования гена (например, с применением редактирования гена с помощью CRISPR/Cas). Способы редактирования генов известны из уровня техники и предусмотрены в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген представляет собой ген, который не кодирует функциональный белок. В некоторых вариантах осуществления клетка, которая содержит нарушенный ген, не экспрессирует (например, на клеточной поверхности) на обнаруживаемом уровне (например, с помощью антитела, например посредством проточной цитометрии) белок, кодируемый геном. Клетка, которая не экспрессирует белок на обнаруживаемом уровне, может называться нокаутной клеткой. Например, клетка, содержащая отредактированный ген МНС класса I, может считаться клеткой, нокаутной по МНС класса I, если комплекс или субъединица МНС класса I не могут быть выявлены на поверхности клетки с использованием антитела, которое специфически связывает один или несколько белков МНС класса I.

В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген представляет собой ген, который кодирует меньшее количество копий кодируемого белка. Клетка, которая экспрессирует пониженный уровень белка, может называться клеткой с нокадауном. Например, клетка, содержащая отредактированный ген МНС класса I, может считаться клеткой с нокадауном МНС класса I, если молекула МНС класса I, выявляемая на поверхности клетки с использованием антитела, которое специфически связывает один или несколько белков в молекуле МНС класса I, характеризуется более низкой экспрессией по сравнению с немодифицированной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления нарушенная субъединица МНС класса I представляет собой α -цепь (например: HLA-A, HLA-B, HLA-C). В некоторых вариантах осуществления нарушенная субъединица МНС класса I представляет собой пептид $\beta 2M$. В некоторых вариантах осуществления нарушенный МНС класса I представляет собой α -цепь, связанную с пептидом $\beta 2M$. В некоторых вариантах осуществления нарушенный МНС класса I представляет собой α -цепь, связанную с пептидом $\beta 2M$, дополнительно

содержащим пептидный антиген, связанный в пределах пептид-связывающей бороздки. В некоторых вариантах осуществления нарушение МНС класса I вызвано мутацией (например, вставкой, делецией и/или заменой) в гене $\beta 2M$. В некоторых вариантах осуществления нарушение МНС класса I вызвано мутацией (например, вставкой, делецией и/или заменой) в гене HLA-A, HLA-B и/или HLA-C.

В некоторых вариантах осуществления менее приблизительно 10% сконструированных CAR-T-клеток человека экспрессируют нарушенный МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления менее приблизительно 50% сконструированных CAR-T-клеток человека экспрессируют нарушенный МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления менее приблизительно 90%, 80%, 70%, 60%, 40%, 30% или 20% сконструированных CAR-T-клеток человека экспрессируют нарушенный МНС класса I.

(ii) Редактирование гена TRAC

В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген TRAC. Это нарушение приводит к потере функции TCR и делает сконструированную Т-клетку неаллореактивной и пригодной для аллогенной трансплантации, сводя к минимуму риск развития заболевания "хозяин против трансплантата". В некоторых вариантах осуществления экспрессия эндогенного гена TRAC элиминируется с предупреждением реакции "хозяин против трансплантата". В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область TRAC, обуславливают возникновение инсерционно-делеционных мутаций в гене TRAC, нарушая экспрессию mRNA или белка. В некоторых вариантах осуществления нарушение экспрессии гена TRAC вызывают с помощью gRNA, нацеливающих на геномную область TRAC. В некоторых вариантах осуществления нарушение экспрессии гена TRAC получают путем нокина экзогенной последовательности (например, нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор) в ген TRAC (например, с использованием аденоассоциированного вирусного (AAV) вектора и донорной матрицы). В некоторых вариантах осуществления геномную делецию в гене TRAC получают с помощью gRNA и/или нокина экзогенной последовательности (например, нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор) в ген TRAC (например, с использованием AAV вектора и донорной матрицы). В некоторых вариантах осуществления нарушение в экспрессии гена TRAC получают с помощью gRNA, нацеливающих на геномную область TRAC, и нокина химерного антигенного рецептора (CAR) в гене TRAC.

Неограничивающие примеры модифицированных и немодифицированных последовательностей gRNA TRAC, которые можно применять, как предусмотрено в данном документе, для получения геномного нарушения в гене TRAC, включают последовательности, содержащие нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19. См. также международную заявку № PCT/US2018/032334, поданную 11 мая 2018 года, включенную в данный документ посредством ссылки. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с использованием последовательности гена TRAC, расположенной на хромосоме 14 (GRCh38: хромосома 14: 22 547 506-22 552

154; Ensembl; ENSG00000277734).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% популяции сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок Т-клеточного рецептора (TCR) на обнаруживаемом уровне. Например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% популяции могут не экспрессировать поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90% или 90%-100% популяции сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления менее 0,5% популяции сконструированных Т-клеток экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область TRAC, обуславливают возникновение инсерционно-делеционных мутаций в гене TRAC, содержащем по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO: 1-8 ("-" обозначает делеции, а нуклеотид, выделенный жирным шрифтом, обозначает вставки). См. таблицу 1 ниже. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген TRAC содержит делецию целевой последовательности гена TRAC, например нарушенный ген TRAC содержит делецию нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 28.

Таблица 1 Иллюстративные отредактированные последовательности гена TRAC.

Последовательность	SEQ ID NO:
AA-----GAGCAACAAATCTGACT	1
AAGAGCAACAGTGCTGT-GCCTGGAGCAACAAATCTGACT	2
AAGAGCAACAGTG-----CTGGAGCAACAAATCTGACT	3
AAGAGCAACAGT-----GCCTGGAGCAACAAATCTGACT	4
AAGAGCAACAGTG-----CTGACT	5
AAGAGCAACAGTGCTGTGGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT	6
AAGAGCAACAGTGC--TGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT	7
AAGAGCAACAGTGCTGTGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT	8

(iii) Редактирование гена $\beta 2M$

В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген $\beta 2M$. $\beta 2M$ представляет собой общий (инвариантный) компонент комплексов МНС I. Нарушение его экспрессии вследствие редактирования генов будет предотвращать реакции "хозяин против терапевтических аллогенных Т-клеток", что приведет к повышению степени сохраняемости аллогенных Т-клеток. В некоторых

вариантах осуществления экспрессия эндогенного гена $\beta 2M$ элиминируется с предупреждением реакции "хозяин против трансплантата".

Неограничивающие примеры модифицированных и немодифицированных последовательностей gRNA $\beta 2M$, которые можно применять, как предусмотрено в данном документе, для получения геномного нарушения в гене $\beta 2M$, включают последовательности, содержащие нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:20 или SEQ ID NO:21. См. также международную заявку № PCT/US2018/032334, поданную 11 мая 2018 года, включенную в данный документ посредством ссылки. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с использованием последовательности гена $\beta 2M$, расположенной на хромосоме 15 (координаты GRCh38: хромосома 15: 44 711 477-44 718 877; Ensembl: ENSG00000166710).

В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область $\beta 2M$, обуславливают возникновение инсерционно-делеционных мутаций в гене $\beta 2M$, нарушающих экспрессию mRNA или белка.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции клеток не экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. Например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% сконструированных Т-клеток популяции могут не экспрессировать поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90% или 90%-100% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления менее чем 50% сконструированных Т-клеток популяции клеток экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления менее чем 30% сконструированных Т-клеток популяции клеток экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. Например, менее чем 50%, менее чем 30%, менее чем 25%, менее чем 20%, менее чем 15%, менее чем 10% или менее чем 5% сконструированных Т-клеток популяции клеток экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления 40% - 30%, 40%-20%, 40% - 10%, 40%-5%, 30%-20%, 30%-10%, 30%-5%, 20%-10%, 20%-5% или 10%-5% сконструированных Т-клеток популяции клеток экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область $\beta 2M$, обуславливают возникновение инсерционно-делеционных мутаций в гене $\beta 2M$. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген $\beta 2M$ может содержать по меньшей мере одну последовательность, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO: 9-14 ("-" обозначает делеции, а нуклеотид, выделенный жирным шрифтом, обозначает вставки). См. таблицу 2 ниже.

Таблица 2 Иллюстративные отредактированные последовательности гена $\beta 2M$.

Последовательность (делеции обозначены тире (-); вставки обозначены жирным шрифтом)	SEQ ID NO:
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT- GCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	9
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTC-- GCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	10
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTT----- CTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	11
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGATAGCCTGGA GGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	12
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGC----- GCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	13
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGTGGCCTGGAGG CTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	14

(iv) Способы редактирования генов

Редактирование генов (включая редактирование генома) представляет собой тип генной инженерии, при котором нуклеотид(-ы)/нуклеиновую(-ые) кислоту(-ы) вставляют, удаляют и/или замещают в последовательности ДНК, например в геноме целевой клетки. Целевое редактирование гена позволяет осуществлять вставку, делецию и/или замену в предварительно выбранных сайтах в геноме целевой клетки (например, в целевом гене или целевой последовательности ДНК). При редактировании последовательности эндогенного гена, например путем делеции, вставки или замены нуклеотида(-ов)/нуклеиновой(-ых) кислоты(-от) эндогенный ген, содержащий затронутую последовательность, может быть подвергнут нокауту или нокдауну из-за изменения последовательности. Следовательно, целевое редактирование можно применять для нарушения экспрессии эндогенных генов. "Целевая интеграция" относится к процессу, предусматривающему вставку одной или нескольких экзогенных последовательностей с или без делеции эндогенной последовательности в сайте вставки. Целевая интеграция может быть результатом целевого редактирования гена, если присутствует донорная матрица, содержащая экзогенную последовательность.

Целевое редактирование может быть достигнуто либо с помощью независимого от нуклеазы подхода, либо с помощью зависимого от нуклеазы подхода. В подходе независимого от нуклеазы целевого редактирования гомологичная рекомбинация управляется гомологичными последовательностями, фланкирующими экзогенный полинуклеотид, который вводится в эндогенную последовательность посредством ферментативного механизма клетки-хозяина. С помощью экзогенного полинуклеотида

можно осуществлять введение делеций, вставок или замены нуклеотидов в эндогенную последовательность.

В качестве альтернативы, зависимый от нуклеазы подход может обеспечить целевое редактирование с более высокой частотой за счет специфического введения двухнитевых разрывов (DSB) с помощью определенных редкощепящих нуклеаз (например, эндонуклеаз). В таком зависимом от нуклеазы целевом редактировании также используются механизмы репарации ДНК, например, негомологичное соединение концов (NHEJ), которое происходит в ответ на DSB. Репарация ДНК с помощью NHEJ часто приводит к случайным вставкам или делециям (инсерционно-делеционным мутациям) небольшого числа эндогенных нуклеотидов. В отличие от опосредованной NHEJ репарации репарация также может представлять собой репарацию, направляемую гомологией (HDR). Если присутствует донорная матрица, содержащая экзогенный генетический материал, фланкированный парой плеч гомологии, экзогенный генетический материал может быть введен в геном с помощью HDR, что приводит к целевой интеграции экзогенного генетического материала.

Доступные эндонуклеазы, способные вводить специфические и нацеленные DSB, включают без ограничения нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN), и нуклеазу CRISPR-Cas9, направляемую РНК (CRISPR/Cas9; нуклеаза 9, ассоциированная с кластеризованными регулярно-расположенными короткими палиндромными повторами). Кроме того, для целевой интеграции также может использоваться система DICE (обмен кассетами с помощью двойной интегразы), использующая интегразы ϕ C31 и Vxb1.

ZFN представляют собой целевые нуклеазы, включающие нуклеазу, слитую с ДНК-связывающим доменом "цинковый палец" (ZFBD), представляющим собой полипептидный домен, который связывает ДНК специфическим для последовательности образом через один или несколько "цинковых пальцев". "Цинковый палец" представляет собой домен из приблизительно 30 аминокислот в связывающем домене "цинковый палец", структура которого стабилизируется за счет координации иона цинка. Примеры "цинковых пальцев" включают без ограничения "цинковые пальцы" C2H2, "цинковые пальцы" C3H и "цинковые пальцы" C4. Сконструированный домен "цинковый палец" представляет собой домен, не встречающийся в природе, конструкция/состав которого является главным образом результатом рациональных критериев, например применения правил замещения и компьютеризированных алгоритмов для обработки информации в базе данных, хранящей информацию о существующих конструкциях ZFP и данных связывания. См., например, патенты США №№ 6140081, 6453242 и 6534261, см. также WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 и WO 03/016496. Выбранный домен "цинковый палец" представляет собой домен, не встречающийся в природе, получение которого в основном является результатом эмпирического процесса, такого как фаговый дисплей, интерактивная ловушка или гибридный отбор. ZFN более подробно описаны в патенте США № 7888121 и в патенте США № 7972854. Наиболее известным

примером ZFN является результат слияния нуклеазы FokI с ДНК-связывающим доменом "цинковый палец".

TALEN представляет собой целевую нуклеазу, содержащую нуклеазу, слитую с эффекторным ДНК-связывающим доменом TAL. "Подобный активатору транскрипции эффекторный ДНК-связывающий домен", "эффекторный ДНК-связывающий домен TAL" или "ДНК-связывающий домен TALE" представляет собой полипептидный домен эффекторных белков TAL, который отвечает за связывание эффекторного белка TAL с ДНК. Эффекторные белки TAL секретируются растительными патогенами рода *Xanthomonas* во время инфицирования. Эти белки проникают в ядро растительной клетки, связывают специфические в отношении эффектора последовательности ДНК через свой ДНК-связывающий домен и активируют транскрипцию генов на этих последовательностях через их трансактивирующие домены. Специфичность эффекторного ДНК-связывающего домена TAL зависит от вариабельного среди эффекторов количества несовершенных повторов 34 аминокислот, которые содержат полиморфизмы в выбранных положениях повторов, называемые повторами, содержащими вариабельные последовательности из двух остатков (RVD). Более подробно TALEN описаны в заявке на патент США № 2011/0145940. Наиболее известным примером TALEN в уровне техники является полипептид, образующийся в результате слияния нуклеазы FokI с эффекторным ДНК-связывающим доменом TAL.

Дополнительные примеры целевых нуклеаз, подходящих для применения, как предусмотрено в данном документе, включают без ограничения Vxb1, phiC31, R4, PhiBT1 и Wβ/SPBc/TP901-1, независимо от того, используются они по отдельности или в комбинации.

Другие неограничивающие примеры целевых нуклеаз включают встречающиеся в природе и рекомбинантные нуклеазы, например CRISPR/Cas9, рестрикционные эндонуклеазы, мегануклеазы, хоуминг-эндонуклеазы и т. п.

(v) Редактирование генов с помощью CRISPR-Cas9

Система CRISPR-Cas9 представляет собой встречающийся в природе защитный механизм у прокариот, который был переориентирован в направляемую РНК платформу для нацеливания на ДНК, применяемую для редактирования гена. Она основана на ДНК-нуклеазе Cas9 и двух некодирующих РНК-crisprRNA (crRNA) и транс-активирующей РНК (tracrRNA) для нацеливания на расщепление ДНК.

crRNA управляет распознаванием последовательности и специфичностью комплекса CRISPR-Cas9 посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику, как правило, с 20-нуклеотидной (нукл.) последовательностью в целевой ДНК. Изменение последовательности из 20 нуклеотидов на 5'-конце в crRNA позволяет нацеливать комплекс CRISPR-Cas9 на конкретные локусы. Комплекс CRISPR-Cas9 связывает только последовательности ДНК, которые содержат последовательность, соответствующую первым 20 нуклеотидам crRNA, одиночной направляющей РНК (sgRNA), если за целевой последовательностью следует определенный короткий мотив ДНК (с

последовательностью NGG), называемый мотивом, примыкающим к протоспейсеру (PAM).

ТracrRNA гибридизуется с 3'-концом crRNA с образованием структуры РНК-дуплекса, которая связывается эндонуклеазой Cas9 с образованием каталитически активного комплекса CRISPR-Cas9, который затем может расщеплять целевую ДНК.

Как только комплекс CRISPR-Cas9 связывается с ДНК в целевом сайте, каждый из двух независимых нуклеазных доменов в ферменте Cas9 расщепляет одну из нитей ДНК выше сайта PAM, оставляя двухнитевый разрыв (DSB), при этом обе нити ДНК заканчиваются парой оснований (тупым концом).

После связывания комплекса CRISPR-Cas9 с ДНК в конкретном целевом сайте и образования сайт-специфического DSB следующим ключевым шагом является репарация DSB. Клетки используют два основных пути репарации ДНК для репарации DSB: негомологичное соединение концов (NHEJ) и направляемая гомологией репарация (HDR).

NHEJ представляет собой надежный механизм репарации, который проявляет высокую активность в большинстве типов клеток, включая неделящиеся клетки. NHEJ подвержен ошибкам и часто может приводить к удалению или добавлению от одного до нескольких сотен нуклеотидов в сайте DSB, хотя такие модификации обычно составляют < 20 нуклеотидов. Полученные в результате вставки и делеции (инсерционно-делеционные мутации) могут нарушать кодирующие или некодирующие области генов. В качестве альтернативы, при HDR используется длинный отрезок гомологичной донорной ДНК, представленной эндогенно или экзогенно, для репарации DSB с высокой точностью. HDR активна только в делящихся клетках и происходит с относительно низкой частотой в большинстве типов клеток. Во многих вариантах осуществления настоящего изобретения NHEJ используется в качестве операнта репарации.

В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза Cas9 (CRISPR-ассоциированный белок 9) происходит из *Streptococcus pyogenes*, хотя могут быть использованы другие гомологи Cas9. Следует учитывать, что могут быть использованы Cas9 дикого типа или могут быть использованы модифицированные версии Cas9 (например, развитые версии Cas9 или ортологи или варианты Cas9), представленные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть замещена другой РНК-направляемой эндонуклеазой, такой как Cpf1 (из системы CRISPR/Cas II класса).

Направляющие РНК

В настоящем изобретении предусмотрена нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, которая может направлять виды активности ассоциированного с ней полипептида (например, сайт-направленного полипептида) на конкретную целевую последовательность в целевой нуклеиновой кислоте. Нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, может представлять собой РНК. РНК, нацеливающаяся на геном, в данном документе называется "направляющей РНК" или "gRNA". Направляющая РНК содержит по меньшей мере спейсерную последовательность, которая

гибридизируется с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, и последовательность повтора CRISPR. В системах типа II gRNA также содержит вторую РНК, называемую последовательностью *tracrRNA*. В направляющей РНК (gRNA) типа II последовательность повтора CRISPR и последовательность *tracrRNA* гибридизируются друг с другом с образованием дуплекса. В направляющей РНК (gRNA) типа V *crRNA* образует дуплекс. В обеих системах дуплекс связывает сайт-направленный полипептид таким образом, что направляющая РНК и сайт-направленный полипептид образуют комплекс. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, обеспечивает специфичность комплекса в отношении мишени благодаря его ассоциации с сайт-направленным полипептидом. Таким образом, нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, направляет активность сайт-направленного полипептида.

Как понятно специалисту в данной области, каждая направляющая РНК сконструирована таким образом, что она содержит спейсерную последовательность, которая комплементарна ее геномной целевой последовательности. См. Jinek et al., *Science*, 337, 816-821 (2012) и Deltcheva et al., *Nature*, 471, 602-607 (2011).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, представляет собой направляющую РНК, состоящую из двух молекул. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, представляет собой направляющую РНК, состоящую из одной молекулы.

Направляющая РНК, состоящая из двух молекул, содержит две нити РНК. Первая нить содержит в направлении 5'-3' необязательную последовательность, удлиняющую спейсер, спейсерную последовательность и минимальную последовательность повтора CRISPR. Вторая нить содержит минимальную последовательность *tracrRNA* (комплементарную минимальной последовательности повтора CRISPR), 3'-последовательность *tracrRNA* и необязательную последовательность, удлиняющую *tracrRNA*.

Направляющая РНК, состоящая из одной молекулы (sgRNA), в системе типа II содержит в направлении 5'-3' необязательную последовательность, удлиняющую спейсер, спейсерную последовательность, минимальную последовательность повтора CRISPR, линкер направляющей молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей из одной молекулы, минимальную последовательность *tracrRNA*, 3'-последовательность *tracrRNA* и необязательную последовательность, удлиняющую *tracrRNA*. Необязательная последовательность, удлиняющая *tracrRNA*, может содержать элементы, которые придают направляющей РНК дополнительные функциональные свойства (например, стабильность). Линкер направляющей нуклеиновой кислоты, состоящей из одной молекулы, связывает минимальный повтор CRISPR и минимальную последовательность *tracrRNA* с образованием шпильчатой структуры. Необязательная последовательность, удлиняющая *tracrRNA*, содержит одну или несколько шпилек.

Направляющая РНК, состоящая из одной молекулы (называемая "sgRNA" или

"gRNA"), в системе типа V содержит в направлении 5'-3' минимальную последовательность повтора CRISPR и спейсерную последовательность.

sgRNA может содержать спейсерную последовательность из 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать спейсерную последовательность из менее чем 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать спейсерную последовательность из более чем 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать спейсерную последовательность переменной длины с 17-30 нуклеотидами на 5'-конце последовательности sgRNA (см., например, последовательность под SEQ ID NO: 15-17).

sgRNA может не содержать ни одного остатка урацила на 3'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать один или несколько остатков урацила на 3'-конце последовательности sgRNA. Например, sgRNA может содержать 1 остаток урацила (U) на 3'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать 2 остатка урацила (UU) на 3'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать 3 остатка урацила (UUU) на 3'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать 4 остатка урацила (UUUU) на 3'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать 5 остатков урацила (UUUUU) на 3'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать 6 остатков урацила (UUUUUU) на 3'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать 7 остатков урацила (UUUUUUU) на 3'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать 8 остатков урацила (UUUUUUUU) на 3'-конце последовательности sgRNA.

sgRNA может быть немодифицированной или модифицированной. Например, модифицированные sgRNA могут содержать один или несколько 2'-О-метилмодифицированных нуклеотидов с фосфоротиоатными связями.

В качестве иллюстрации, направляющие РНК, используемые в системе CRISPR/Cas/Cpf1, или другие РНК меньшего размера можно легко синтезировать химическими способами, как проиллюстрировано ниже и описано в уровне техники. Несмотря на то, что возможности процедур химического синтеза постоянно расширяются, очистка таких РНК с помощью таких процедур, как высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC, при которой не используются гели, такие как в PAGE), как правило, становится более сложной, поскольку значения длины полинуклеотидов значительно увеличиваются, выходя за пределы примерно сотни нуклеотидов. Один из подходов, используемых для образования РНК большей длины, заключается в получении двух или более молекул, которые лигируются друг с другом. Гораздо более длинные РНК, такие как кодирующие эндонуклеазу Cas9 или Cpf1, образуются более легко ферментативным путем. Различные типы модификаций РНК могут быть введены во время или после химического синтеза и/или ферментативного образования РНК, например модификации, которые повышают стабильность, уменьшают вероятность или степень формирования врожденного иммунного ответа и/или усиливают другие признаки, как описано в уровне техники.

Спейсерная последовательность

gRNA содержит спейсерную последовательность. Спейсерная последовательность представляет собой последовательность (например, последовательность из 20 нуклеотидов), которая определяет целевую последовательность (например, последовательности ДНК-мишени, такие как геномная целевая последовательность) целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность содержит 15-30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность содержит 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность содержит 20 нуклеотидов.

"Целевая последовательность" прилегает к последовательности PAM и представляет собой последовательность, модифицируемую РНК-направляемой нуклеазой (например, Cas9). "Целевая нуклеиновая кислота" представляет собой двухнитевую молекулу: одна нить содержит целевую последовательность и называется "нитью, содержащей PAM", а другая комплементарная нить называется "нитью, не содержащей PAM". Специалист в данной области поймет, что спейсерная последовательность gRNA гибридизируется с последовательностью, обратной комплементарной целевой последовательности, которая расположена в нити, не содержащей PAM, целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. Таким образом, спейсерная последовательность gRNA представляет собой РНК-эквивалент целевой последовательности. Например, если целевая последовательность представляет собой 5'-AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3' (SEQ ID NO: 28), то спейсерная последовательность gRNA представляет собой 5'-AGAGCAACAGUGCUGUGGCC-3' (SEQ ID NO: 19). Спейсер gRNA взаимодействует с целевой нуклеиновой кислотой, представляющей интерес, специфичным в отношении последовательности образом посредством гибридизации (т. е. спаривания оснований). Таким образом, нуклеотидная последовательность спейсера варьируется в зависимости от целевой последовательности целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес.

В системе CRISPR/Cas, описанной в данном документе, спейсерная последовательность предназначена для гибридизации с областью целевой нуклеиновой кислоты, которая расположена в 5'-направлении от PAM для фермента Cas9, используемого в системе. Спейсер может полностью соответствовать целевой последовательности или может иметь несоответствия. Для каждого фермента Cas9 имеется конкретная последовательность PAM, которую он распознает в целевой ДНК. Например, *S. pyogenes* распознает в целевой нуклеиновой кислоте PAM, который содержит последовательность 5'-NRG-3', где R представляет собой A либо G, где N представляет собой любой нуклеотид, и при этом N находится непосредственно рядом с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, на которую нацеливается спейсерная последовательность, в 3'-направлении от нее.

В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой

кислоты содержит 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит менее чем 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит более чем 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления целевая нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления целевая нуклеиновая кислота содержит не более 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит 20 оснований непосредственно рядом с первым нуклеотидом PAM в 5'-направлении от него. Например, в последовательности, содержащей 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3', целевая нуклеиновая кислота содержит последовательность, которая соответствует множеству N, где N представляет собой любой нуклеотид, а подчеркнутая последовательность NRG представляет собой PAM *S. pyogenes*.

Неограничивающие примеры gRNA TRAC, которые можно использовать как предусмотрено в данном документе, могут включать любую из последовательностей под SEQ ID NO: 18-19 и 22-23, которые нацелены на последовательность под SEQ ID NO: 26 в гене TRAC. Неограничивающие примеры gRNA β 2M, которые можно использовать как предусмотрено в данном документе, могут включать любую из последовательностей под SEQ ID NO: 20-21 и 24-25, которые нацелены на последовательность под SEQ ID NO: 27 в гене β 2M. См. **таблицу 3** ниже. См. также публикацию заявки на патент США № 2018-0325955 (включенную в данный документ посредством ссылки в отношении цели и предмета изобретения, упоминаемых в данном документе).

Таблица 3. Последовательности gRNA/целевые последовательности

Последовательность gRNA		
Название	Немодифицированная последовательность	Модифицированная последовательность
sgRNA TRAC	AGAGCAACAGUGCUGU GGCCguuuuagagcuagaaauag caaguuaaaaagguaguccguu aucaacuugaaaaaguggcaccgag ucggugcUUUU (SEQ ID NO: 18)	A*G*A*GCAACAGUGCUGU GUGGCCguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaaagguagucc guuaucuacuugaaaaaguggcacc gagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 22)
Спейсер sgRNA TRAC	AGAGCAACAGUGCUGU GGCC (SEQ ID NO: 19)	A*G*A*GCAACAGUGCUGU GUGGCC (SEQ ID NO: 23)
sgRNA β 2M	GCUACUCUCUCUUUCUG GCCguuuuagagcuagaaauagca aguuaaaaagguaguccguuau	G*C*U*ACUCUCUCUUUC UGGCCguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaaagguaguccgu

Последовательность gRNA		
Название	Немодифицированная последовательность	Модифицированная последовательность
	caacuugaaaaaguggcaccgaguc ggugcUUUU (SEQ ID NO: 20)	uaucaacuugaaaaaguggcaccga gucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 24)
Спейсер sgRNA β2M	GCUACUCUCUCUUUCUG GCC (SEQ ID NO: 21)	G*C*U*ACUCUCUCUUUC UGGCC (SEQ ID NO: 25)
Целевые последовательности		
Название направляющей РНК	Целевая последовательность (PAM)	
sgRNA TRAC	AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (TGG) (SEQ ID NO: 26)	
sgRNA β2M	GCTACTCTCTTTCTGGCC (TGG) (SEQ ID NO: 27)	

*: остаток 2'-О-метилфосфотиоата

Донорная матрица

Нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, можно доставлять в Т-клетку с использованием вектора (например, AAV вектора), который содержит то, что в данном документе называется донорной матрицей (также называемой донорным полинуклеотидом). Донорная матрица может содержать негомологичную последовательность, такую как нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, фланкированную двумя областями гомологии, чтобы обеспечить эффективную HDR в местоположении генома, представляющем интерес. В качестве альтернативы, донорная матрица может не иметь областей гомологии с целевым местоположением в ДНК и может быть интегрирована посредством NHEJ-зависимого соединения концов после расщепления в целевом сайте.

Донорная матрица может представлять собой ДНК или РНК, быть однострэндовой и/или двухстрэндовой, и может быть введена в клетку в линейной или кольцевой форме. При введении в линейной форме концы донорной последовательности можно защитить (например, от экзонуклеолитического разрушения) с помощью способов, известных специалистам в данной области. Например, один или несколько дидезоксирибонуклеотидных остатков добавляют к 3'-концу линейной молекулы, и/или самокомплементарные олигонуклеотиды лигируются с одним или обоими концами. См., например, Chang et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al., (1996) Science 272:886-889. Дополнительные способы защиты экзогенных полинуклеотидов от разрушения включают без ограничения добавление концевой(-ых) аминогруппы(аминогрупп) и применение модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, фосфоротиоатные, фосфорамидатные, и остатки О-метилрибозы или дезоксирибозы.

Донорная матрица может быть введена в клетку как часть векторной молекулы,

содержащей дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. Более того, донорная матрица может быть введена в виде депротенизированной нуклеиновой кислоты, в виде комплекса нуклеиновой кислоты со средством, таким как липосома или поллоксамер, или может быть доставлена вирусами (например, аденовирусом, AAV, вирусом герпеса, ретровирусом, лентивирусом и лентивирусом с дефектом интегразы (IDLV)).

В некоторых вариантах осуществления донорная матрица вставляется так, что ее экспрессия управляется эндогенным промотором в сайте интеграции, а именно промотором, который управляет экспрессией эндогенного гена, в который вставлен донор. Однако в некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит экзогенный промотор и/или энхансер, например, конститутивный промотор, индуцируемый промотор или тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления экзогенный промотор представляет собой промотор EF1 α , содержащий последовательность под SEQ ID NO: 47. Можно использовать другие промоторы.

Кроме того, экзогенные последовательности также могут включать транскрипционные или трансляционные регуляторные последовательности, например промоторы, энхансеры, инсуляторы, внутренние участки посадки рибосомы, последовательности, кодирующие пептиды 2A и/или сигналы полиаденилирования.

В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 74 и необязательно кодирующую CAR к CD70, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:76. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 84 и необязательно кодирующую CAR к BCMA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:86. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 84.

В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 111 и необязательно кодирующую CAR к CD33, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:115. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 111.

В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 98% идентичностью с SEQ ID NO: 58 и необязательно кодирующую CAR к

CD19, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:40. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 58.

(vi) Способы доставки и конструкции

Нуклеазы и/или донорные матрицы могут быть доставлены с использованием векторной системы, включающей без ограничения плазмидные векторы, миникольцевые ДНК, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, поксвирусные векторы; герпесвирусные векторы и аденоассоциированные вирусные векторы и их комбинации.

Для введения нуклеиновых кислот, кодирующих нуклеазы и донорные матрицы, в клетки (например, Т-клетки) можно применять традиционные способы переноса генов на основе вирусов и без них. Невирусные векторные системы доставки включают ДНК-плазмиды, миникольцевые ДНК, депротенинизированную нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту в комплексе с носителем для доставки, таким как липосома или поллоксамер. Вирусные векторные системы доставки включают ДНК- и РНК-вирусы, которые после доставки в клетку имеют либо эписомальные, либо интегрированные геномы.

Способы невирусной доставки нуклеиновых кислот включают электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, поликатион или конъюгаты липида и нуклеиновой кислоты, депротенинизированную ДНК, депротенинизированную РНК, кэпированную РНК, искусственные вирионы и усиленный средством захват ДНК. Сонопорация с использованием, например, системы Sonitron 2000 (Rich-Mar) также может быть использована для доставки нуклеиновых кислот.

Доставка с помощью аденоассоциированного вируса

Донорная нуклеиновая кислота, кодирующая конструкцию CAR, может быть доставлена в клетку с использованием аденоассоциированного вируса (AAV). AAV представляют собой небольшие вирусы, которые сайтспецифическим образом интегрируются в геном хозяина и поэтому могут доставлять трансген, такой как CAR. Инвертированные концевые повторы (ITR) присутствуют, фланкируя геном AAV и/или представляющий интерес трансген, и служат точками начала репликации. В геноме AAV также присутствуют белки гер и сар, которые при транскрипции образуют капсиды, которые инкапсулируют геном AAV для доставки в целевые клетки. Поверхностные рецепторы на этих капсидах обеспечивают серотип AAV, который определяет, с какими целевыми органами капсиды будут в первую очередь связываться, и, таким образом, какие клетки будут наиболее эффективно заражаться AAV. В настоящее время известно двенадцать серотипов AAV человека. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV серотипа 6 (AAV6).

Аденоассоциированные вирусы входят в число наиболее часто используемых вирусов для генной терапии по нескольким причинам. Во-первых, AAV не вызывают иммунного ответа при введении млекопитающим, включая людей. Во-вторых, AAV

эффективно доставляют в целевые клетки, особенно при рассмотрении выбора подходящего серотипа AAV. Наконец, AAV обладают способностью инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, поскольку геном может сохраняться в клетке-хозяине без интеграции. Эта особенность делает их идеальным кандидатом для генной терапии.

(vii) Направляемая гомологией репарация (HDR)

Донорная нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, вставляется путем репарации, направляемой гомологией (HDR), в локус целевого гена. Обе нити ДНК в целевом локусе разрезаются ферментом CRISPR Cas9. Затем происходит HDR для репарации двухнитевого разрыва (DSB) и вставки донорной ДНК. Для того чтобы это происходило правильно, донорная последовательность конструируется с фланкирующими остатками, которые комплементарны последовательности, окружающей сайт DSB в целевом гене (далее "плечи гомологии"). Эти плечи гомологии служат матрицей для репарации DSB и позволяют HDR быть практически безошибочным механизмом. Скорость репарации, направляемой гомологией (HDR), зависит от расстояния между мутацией и участком разрезания, поэтому важно выбрать перекрывающиеся или близлежащие целевые участки. Матрицы могут содержать дополнительные последовательности, фланкированные гомологичными областями, или могут содержать последовательность, которая отличается от геномной последовательности, таким образом обеспечивая редактирование последовательности.

Целевой ген может быть ассоциирован с иммунным ответом у субъекта, при этом необратимое удаление по меньшей мере части целевого гена будет модулировать иммунный ответ. Например, для получения Т-клетки с CAR целевой ген может представлять собой константную область TCR α (TRAC). Нарушение TRAC приводит к потере функции эндогенного TCR.

В некоторых вариантах осуществления целевой ген находится в локусе "безопасной гавани".

C. Получение генетически сконструированных CAR-T-клеток

Любые из генетически сконструированных CAR-T-клеток, которые раскрыты в данном документе, можно получать с применением обычных способов и/или способов, раскрытых в данном документе.

(i) Получение генетически сконструированных CAR-T-клеток

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают путем модификации генома клеток. В некоторых вариантах осуществления индуцируют двухнитевый разрыв (DSB) по участку в целевом гене. В некоторых вариантах осуществления DSB подвергают репарации с использованием одного или нескольких путей репарации эндогенной ДНК. В некоторых вариантах осуществления для пути репарации ДНК не требуется гомологичная последовательность (например, для пути негомологичного соединения концов или пути NHEJ). В некоторых вариантах осуществления для пути репарации требуется гомологичная

последовательность (например, для направляемого гомологией пути или пути HDR).

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают путем индуцирования DSB с помощью CRISPR-Cas9 в качестве эндонуклеазы и одной или нескольких некодирующих РНК и репарации DSB с использованием HDR и донорной полинуклеотидной матрицы, описываемой в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA, комплементарной последовательности целевого гена, который представляет собой TRAC. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием спейсера gRNA TRAC, содержащего последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA TRAC, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления gRNA TRAC, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19, нацеливается на последовательность TRAC, изложенную под SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления gRNA TRAC, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18, нацеливается на последовательность TRAC, изложенную под SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием спейсера gRNA TRAC, содержащего последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA TRAC, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления gRNA TRAC, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 23, нацеливается на последовательность TRAC, изложенную под SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления gRNA TRAC, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22, нацеливается на последовательность TRAC, изложенную под SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA, комплементарной последовательности целевого гена, который представляет собой B2M. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием спейсера gRNA B2M, содержащего последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA B2M, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления gRNA B2M, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 21, нацеливается на последовательность B2M, изложенную под SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах

осуществления gRNA B2M, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20, нацеливается на последовательность B2M, изложенную под SEQ ID NO: 27.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием спейсера gRNA B2M, содержащего последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA B2M, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления gRNA B2M, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 25, нацеливается на последовательность B2M, изложенную под SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления gRNA B2M, содержащая последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 24, нацеливается на последовательность B2M, изложенную под SEQ ID NO: 27.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA TRAC, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19, и gRNA B2M, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA TRAC, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 23, и gRNA B2M, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA TRAC, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18, и gRNA B2M, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, получают с использованием gRNA TRAC, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22, и gRNA B2M, содержащей последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 24.

Для любой из последовательностей gRNA, предусмотренных в данном документе, подразумевается, что последовательности, для которых явно не указано, что они содержат модификации, охватывают как немодифицированные последовательности, так и последовательности, содержащие любые подходящие модификации.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки получают с использованием донорной матрицы, содержащей негомологичную последовательность, которая представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица состоит из плеч гомологии, которые соответствуют последовательностям в целевом гене, которым является TRAC. В некоторых вариантах осуществления 5'-плечо гомологии (левое плечо гомологии) донорной матрицы содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления 3'-плечо гомологии донорной матрицы содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 46.

В некоторых вариантах осуществления экзогенный промотор представляет собой

промотор EF1a, содержащий последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 74. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 111.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие gRNA, нуклеазы и донорные матрицы, вводят в клетки (например, Т-клетки) с использованием традиционных способов переноса генов на основе вирусов и без них.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, такой как gRNA, sgRNA, mRNA, кодирующая нуклеазу, или донорную матрицу доставляют в клетку с использованием невирусной векторной системы доставки. Примеры невирусной векторной системы доставки включают без ограничения ДНК-плазмиду, миникольцевую ДНК, депротенинированную нуклеиновую кислоту, липосому, рибонуклеопротеиновую частицу (RNP) или полоксамер. В некоторых вариантах осуществления способ введения полинуклеотидов в клетку с использованием невирусной векторной системы доставки включает электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику или усиленный средством захват.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, такой как gRNA, sgRNA, mRNA, кодирующая нуклеазу, или донорную матрицу доставляют в клетку с использованием вирусной векторной системы доставки. Примеры вирусной векторной системы доставки включают без ограничения ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, поксвирусные векторы, герпесвирусные векторы и векторы аденоассоциированного вируса (AAV).

В некоторых вариантах осуществления донорную матрицу, кодирующую конструкцию CAR, доставляют в клетку в виде одного или нескольких полинуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления донорную матрицу, кодирующую конструкцию CAR, доставляют с помощью вирусного средства доставки. В некоторых вариантах осуществления вирусное средство доставки представляет собой вектор аденоассоциированного вируса (AAV).

В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазу (например, Cas9) доставляют в клетку в виде полипептида. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазу (например, Cas9) доставляют в клетку отдельно от нацеливающейся на геном нуклеиновой кислоты (например, gRNA, sgRNA). В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазу (например, Cas9) доставляют в клетку в виде комплекса с одним или несколькими нацеливающимися на геном полинуклеотидами (например, gRNA, sgRNA). В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазу или предварительно составленную в комплекс эндонуклеазу доставляют с помощью невирусного средства доставки, которое включает без ограничения наночастицу, липосому, рибонуклеопротеин, положительно

заряженный пептид, конъюгат низкомолекулярной РНК, химеры аптамер-РНК или комплекс РНК-слитый белок. В некоторых вариантах осуществления способ введения полипептида, представляющего собой эндонуклеазу, или предварительно составленного в комплекс полипептида, представляющего собой эндонуклеазу, в клетку включает электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику или усиленный средством захват.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Cas9 предварительно составляют в комплексе с одной или несколькими sgRNA с образованием рибонуклеопротеиновой частицы (RNP). В некоторых вариантах осуществления донорную матрицу составляют с использованием AAV вектора. В некоторых вариантах осуществления доставку в клетку RNP Cas9/sgRNA выполняют путем электропорации клетки. В некоторых вариантах осуществления донорную матрицу, составленную в виде AAV вектора, доставляют до электропорации. В некоторых вариантах осуществления донорную матрицу, составленную в виде AAV вектора, доставляют в ходе электропорации. В некоторых вариантах осуществления донорную матрицу, составленную в виде AAV вектора, доставляют после электропорации.

В некоторых вариантах осуществления редактирование гена, выполненное с использованием эндонуклеазы CRISPR/Cas9, приводит к образованию сконструированной Т-клетки с нарушенным геном TRAC. В некоторых вариантах осуществления нарушение экспрессии гена TRAC вызывают с помощью gRNA, нацеливающихся на геномную область TRAC. В некоторых вариантах осуществления нарушение гена TRAC приводит к устранению экспрессии гена TRAC или ее снижению. В некоторых вариантах осуществления устранение экспрессии гена TRAC или ее снижение ассоциированы с потерей функции TCR. В некоторых вариантах осуществления потеря функции TCR делает сконструированную Т-клетку пригодной для аллогенной трансплантации (т. е. минимизируется риск индуцирования GvHD). В некоторых вариантах осуществления нарушение гена TRAC опосредуется путем нокина CAR в ген TRAC (например, с использованием AAV вектора и донорной матрицы). В некоторых вариантах осуществления нарушение экспрессии гена TRAC опосредуется с помощью gRNA, нацеливающихся на геномную область TRAC, и нокина CAR в ген CAR. В некоторых вариантах осуществления нокин CAR обеспечивают с помощью донорной матрицы с плечами гомологии, которые отвечают последовательностям TRAC, окружающим сайт DSB.

В некоторых вариантах осуществления редактирование гена, выполненное с использованием эндонуклеазы CRISPR/Cas9, приводит к образованию сконструированной Т-клетки с нарушенным геном B2M. В некоторых вариантах осуществления нарушение экспрессии гена B2M вызывают с помощью gRNA, нацеливающихся на геномную область B2M. В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область B2M, обуславливают инсерционно-делеционные мутации в гене B2M, которые нарушают или ингибируют транскрипцию и трансляцию кодируемого геном продукта. В

некоторых вариантах осуществления нарушение гена В2М приводит к устранению экспрессии гена В2М или ее снижению. В некоторых вариантах осуществления устранение экспрессии гена В2М или ее снижение ассоциированы с потерей функции комплекса МНС I. В некоторых вариантах осуществления потеря функции МНС I делает сконструированную Т-клетку пригодной для аллогенной трансплантации (т. е. минимизируется риск аллогенного Т-клеточного ответа против хозяина). В некоторых вариантах осуществления потеря функции МНС I приводит к повышенной сохраняемости сконструированной Т-клетки у аллогенного реципиента.

(ii) Очистка генетически сконструированных CAR-T-клеток

В некоторых вариантах осуществления популяцию сконструированных CAR-T-клеток (например, CAR-T-клеток к CD19, к CD33, к CD70, к ВСМА), описанных в данном документе, активируют и/или увеличивают в количестве до или после редактирования генома. Для достижения достаточных терапевтических доз композиций на основе Т-клеток Т-клетки часто подвергают одному или нескольким циклам стимуляции, активации и/или увеличения количества. Т-клетки могут быть активированы и увеличены в количестве, как правило, с использованием способов, описанных, например, в патентах США №№ 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514 и 6867041. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют и увеличивают в количестве в течение от приблизительно 1 дня до приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 дня до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 дня до приблизительно 2 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 3 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 4 дней, от приблизительно 3 дней до приблизительно 4 дней или приблизительно 1 дня, приблизительно 2 дней, приблизительно 3 дней или приблизительно 4 дней до редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют и увеличивают в количестве в течение от приблизительно 1 дня до приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 дня до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 дня до приблизительно 2 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 3 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 4 дней, от приблизительно 3 дней до приблизительно 4 дней или приблизительно 1 дня, приблизительно 2 дней, приблизительно 3 дней или приблизительно 4 дней после редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют и увеличивают в количестве одновременно с редактированием генома.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ существенного удаления клеток, которые экспрессируют представляющий интерес поверхностный белок (например, TCR) на обнаруживаемом уровне, из популяции клеток, предусматривающей сконструированные CAR-T-клетки. В некоторых вариантах осуществления существенное удаление представляющих интерес клеток (например, клеток TCR+) имеет место при менее 0,1%, менее 0,2%, менее 0,3%, менее 0,4%, менее 0,5%, менее 1%, менее 2%, менее 3%, менее 4%, менее 5% или менее 10%

представляющих интерес клеток. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ существенного удаления клеток, которые экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне, из популяции клеток, предусматривающей сконструированные CAR-T-клетки.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ выделения популяции клеток, предусматривающей сконструированные CAR-T-клетки, включающий обеспечение наличия популяции клеток, где сконструированные CAR-T-клетки содержат нарушенный ген TCR и нарушенный ген B2M; и удаление TCR+ T-клеток из популяции клеток, и тем самым выделение популяции клеток, предусматривающей <1,0% TCR+ T-клеток. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения выделенной популяции клеток, предусматривающей сконструированные CAR-T-клетки, включающий обеспечение наличия популяции клеток, где сконструированные CAR-T-клетки содержат нарушенный ген TCR и нарушенный ген B2M; и удаление TCR+ T-клеток из популяции клеток, таким образом, что популяция клеток предусматривает <1,0% TCR+ T-клеток.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена популяция клеток, предусматривающая сконструированные CAR-T-клетки, описанные в данном документе, где менее 0,5% клеток в популяции экспрессируют TCR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена популяция клеток, предусматривающая сконструированные CAR-T-клетки, описанные в данном документе, где менее 0,1%, менее 0,2%, менее 0,3%, менее 0,4%, менее 0,5%, менее 1%, менее 2%, менее 3%, менее 4%, менее 5% или менее 10% клеток в популяции экспрессирует TCR на обнаруживаемом уровне.

Удаление подгруппы клеток из популяции можно выполнять с использованием обычных способов очистки клеток. Неограничивающие примеры способов сортировки клеток включают сортировку клеток с активированной флуоресценцией, иммуномагнитное разделение, хроматографию и микрофлюидную сортировку клеток. В некоторых вариантах осуществления TCR-экспрессирующие клетки удаляют из популяции клеток, предусматривающей сконструированные T-клетки, путем иммуномагнитного разделения. В некоторых вариантах осуществления TCR-экспрессирующие клетки в популяции клеток, предусматривающей сконструированные T-клетки, метят биотинилированным антителом, нацеленным на TCR. В некоторых вариантах осуществления меченые клетки удаляют из популяции клеток, предусматривающей сконструированные T-клетки, с использованием магнитных гранул к биотину.

(iii) Определение характеристик генетически сконструированных CAR-T-клеток

В некоторых вариантах осуществления сконструированные T-клетки, описанные в данном документе, оценивают в отношении экспрессии поверхностных белков TCR, B2M и CAR. В некоторых вариантах осуществления экспрессию поверхностных белков определяют с помощью проточной цитометрии с использованием способов, известных в

уровне техники. Посредством мечения популяции клеток элементом, который нацелен на необходимый маркер клеточной поверхности (например, антитело) и помечен флуоресцентной молекулой, можно применять проточную цитометрию для количественного определения части популяции, положительной в отношении поверхностного маркера, а также уровня экспрессии поверхностных маркеров. В некоторых вариантах осуществления композицию сконструированных Т-клеток оценивают с помощью проточной цитометрии для определения процентного содержания клеток с CAR на клеточной поверхности, с TCR на клеточной поверхности и с B2M на клеточной поверхности.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 75%) сконструированных Т-клеток экспрессируют CAR на обнаруживаемом уровне, что обнаружено с помощью проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 80%) сконструированных Т-клеток экспрессируют CAR на обнаруживаемом уровне и не экспрессируют поверхностный белок TCR или поверхностный белок B2M на обнаруживаемом уровне, что обнаружено с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 80%) сконструированных Т-клеток экспрессируют CAR на обнаруживаемом уровне и экспрессируют поверхностный белок TCR или поверхностный белок B2M на пониженном уровне, что обнаружено с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 80%) сконструированных Т-клеток экспрессируют CAR на обнаруживаемом уровне и не экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне или поверхностный белок B2M на пониженном уровне, что обнаружено с помощью проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки оценивают в отношении включения CAR в геном с помощью цифровой капельной ПЦР (ddPCR). Цифровая ПЦР позволяет количественно определять концентрацию ДНК в образце. Цифровую ПЦР выполняют путем фракционирования смеси реакции ПЦР (например, содержащей образец молекул нуклеиновой кислоты и копии ПЦР-зонда) таким образом, чтобы некоторые фракции не содержали копии ПЦР-зонда, в то время как другие фракции содержали одну или несколько копий ПЦР-зонда. Выполняют ПЦР-амплификацию фракций, и фракции анализируют в отношении реакции ПЦР. С фракцией, содержащей один или несколько зондов и одну или несколько молекул ДНК-мишеней, получают положительную конечную точку, а с фракцией, не содержащей ПЦР-зонда, получают

отрицательную конечную точку. Затем данные фракции с положительными реакциями аппроксимируют распределением Пуассона для определения абсолютного числа копий молекул ДНК-мишеней на данный объем нефракционированного образца (т. е. копий на микролитр образца) (см. Hindson, B. et al., (2011) *Anal Chem.* 83:8604-8610). Цифровая капельная ПЦР представляет собой разновидность цифровой ПЦР, где образец нуклеиновых кислот фракционируют на капли с использованием водно-масляной эмульсии. ПЦР-амплификацию выполняют на каплях в совокупности, после чего используют жидкостную систему для разделения капель и проведения анализа каждой отдельной капли. Специалистом в данной области ddPCR применяется для обеспечения абсолютного количественного определения ДНК в образце, для выполнения анализа вариаций числа копий или для оценки эффективности редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления экстрагируют геномную ДНК из композиции сконструированных Т-клеток и применяют ddPCR для осуществления абсолютного количественного определения копий CAR на образец композиции. В некоторых вариантах осуществления экстрагируют геномную ДНК из композиции сконструированных Т-клеток и применяют ddPCR для оценки эффективности HDR последовательности CAR в локусе TRAC.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки оценивают в отношении цитокин-независимого роста. Ожидается, что сконструированные Т-клетки будут расти только в присутствии стимулирующих цитокинов (например, IL-2, IL-7). Рост в отсутствие цитокинов является показателем онкогенного потенциала. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки выращивают в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней или 20 дней либо в присутствии, либо в отсутствие одного или нескольких стимулирующих цитокинов (например, IL-2, IL-7). В некоторых вариантах осуществления пролиферацию оценивают по количеству клеток и их жизнеспособности с использованием обычных способов (например, проточной цитометрии, микроскопии, определения оптической плотности, метаболической активности). В некоторых вариантах осуществления пролиферацию оценивают, начиная с дня 1, дня 2, дня 3, дня 4, дня 5, дня 6. В некоторых вариантах осуществления пролиферацию оценивают каждый 1 день, каждые 2 дня, каждые 3 дня, каждые 4 дня, каждые 5 дней, каждые 6 дней, каждые 7 дней или каждые 8 дней. В некоторых вариантах осуществления рост в отсутствие цитокинов оценивают в конце периода роста. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, характеризующиеся отсутствием роста в отсутствие цитокинов, определяются как не обладающие онкогенным потенциалом. В некоторых вариантах осуществления отсутствие роста определяется как увеличение популяции в менее чем 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 или 1,5 раза к концу периода роста по сравнению с началом периода роста. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, полученные с применением способов, описанных в данном документе, определяются как

характеризующиеся отсутствием роста в отсутствие цитокинов при оценке через 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней или 20 дней культивирования. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки не пролиферируют в отсутствие стимуляции цитокинами, стимуляции факторами роста или антигенной стимуляции.

D. Генетически сконструированные CAR-T-клетки

Генетически сконструированные (с отредактированным геном) CAR-T-клетки по настоящему изобретению могут являться аутологичными ("своими") или неаутологичными ("чужими", например, аллогенными, сингенными или ксеногенными). Термин "аутологичный" относится к клеткам одного и того же субъекта. Термин "аллогенный" относится к клеткам того же вида, что и субъект, но генетически отличающимся от клеток субъекта. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки получают от субъекта-млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки получают от субъекта-человека. В некоторых примерах Т-клетки являются аллогенными.

Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая без ограничения мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимус, ткань из очага инфекции, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В определенных вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта с использованием любого числа способов, известных специалисту в данной области, таких как осаждение, например разделение с помощью FICOLL™.

В некоторых вариантах осуществления используют выделенную популяцию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления после выделения мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) как цитотоксические, так и хелперные Т-лимфоциты могут быть отсортированы на субпопуляции необученных Т-клеток, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток либо до, либо после активации, увеличения количества и/или генетической модификации.

Специфическая субпопуляция Т-клеток, экспрессирующая один или несколько из следующих маркеров клеточной поверхности: TCRab, CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD38, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127, CD122, CD95, CD197, CCR7, KLRG1, белки MCH-I и/или белки MCH-II, может быть дополнительно выделена с помощью методик положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления конкретную субпопуляцию Т-клеток, экспрессирующую один или несколько из маркеров, выбранных из группы, состоящей из TCRab, CD4 и/или CD8, дополнительно выделяют с помощью методик положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления субпопуляции Т-клеток могут быть выделены путем положительного или отрицательного отбора до процедуры генной инженерии и/или после процедуры генной инженерии.

В некоторых вариантах осуществления выделенная популяция Т-клеток экспрессирует один или несколько из маркеров, включающих без ограничения CD3+,

CD4+, CD8+ или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют у субъекта и сначала активируют и стимулируют для пролиферации *in vitro* перед редактированием гена.

В некоторых вариантах осуществления количество CD27+CD45RO- Т-клеток в популяции донорных Т-клеток указывает на уровень экспрессии маркеров истощения и старения (например, PD1, TIM-3, LAG3, CD57) после редактирования гена (например, редактирования с помощью CRISPR-Cas9). В некоторых вариантах осуществления популяция донорных Т-клеток содержит по меньшей мере 40%, 50% или 50% CD27+CD45RO- Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления экспрессия маркеров истощения или старения в донорных Т-клетках, содержащих по меньшей мере 40%, 50% или 60% CD27+CD45RO- Т-клеток не претерпевает значительных изменений после редактирования гена.

Для достижения достаточных терапевтических доз композиций на основе Т-клеток Т-клетки часто подвергают одному или нескольким циклам стимуляции, активации и/или увеличения количества. Т-клетки могут быть активированы и увеличены в количестве, как правило, с использованием способов, описанных, например, в патентах США №№ 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514 и 6867041. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют и увеличивают в количестве в течение от приблизительно 1 дня до приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 дня до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 дня до приблизительно 2 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 3 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 4 дней, от приблизительно 3 дней до приблизительно 4 дней или приблизительно 1 дня, приблизительно 2 дней, приблизительно 3 дней или приблизительно 4 дней до введения редактирующих геном композиций в Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют и увеличивают в количестве в течение приблизительно 4 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 24 часов, приблизительно 36 часов, приблизительно 48 часов, приблизительно 60 часов или приблизительно 72 часов до введения редактирующих геном композиций в Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют одновременно с введением редактирующих геном композиций в Т-клетки.

Е. Фармацевтические композиции

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие популяцию генетически сконструированных CAR-Т-клеток, таких как CAR-Т-клетки, раскрытые в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Например, фармацевтическая композиция может содержать популяцию генетически сконструированных CAR-Т-клеток к CD19, популяцию генетически сконструированных CAR-Т-клеток к BCMA, популяцию генетически сконструированных CAR-Т-клеток к CD70 или популяцию генетически сконструированных CAR-Т-клеток к

CD33. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие ингибитор NK-клеток, такой как антитело к CD38 (например, даратумумаб). Такие фармацевтические композиции можно применять в способах улучшения клинического исхода у пациентов-людей, что также раскрыто в данном документе.

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые с медицинской точки зрения являются подходящими для применения в контакте с тканями, органами и/или жидкостями организма субъекта без избыточной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соизмеримых с разумным соотношением польза/риск. Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к растворителям, дисперсионным средам, покрытиям, антибактериальным средствам, противогрибковым средствам, изотоническим средствам и средствам, замедляющим абсорбцию, или т. п., которые являются физиологически совместимыми. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемую соль, например соль присоединения кислоты или соль присоединения основания. См., например, Verge et al., (1977) J Pharm Sci 66:1-19.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемую соль. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых солей включают соли присоединения кислоты (образованные посредством реакции свободной аминогруппы полипептида с неорганической кислотой (например, хлористоводородной или фосфорной кислотами) или органической кислотой, такой как уксусная, винная, миндальная или т. п.). В некоторых вариантах осуществления соль, образованная с помощью свободных карбоксильных групп, получена из неорганического основания (например, гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция или железа) или органического основания, такого как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаин или т. п.).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, раскрытая в данном документе, содержит популяцию генетически сконструированных CAR-T-клеток, суспендированных в растворе для криоконсервации (например, CryoStor® C55). Раствор для криоконсервации для применения в настоящем изобретении может также содержать аденозин, декстрозу, декстран-40, лактобионовую кислоту, сахарозу, маннит, буферное средство, такое как N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновая кислота) (HEPES), одну или несколько солей (например, хлорид кальция, хлорид магния, хлорид калия, бикарбонат калия, фосфат калия и т. п.), одно или несколько оснований (например, гидроксид натрия, гидроксид калия и т. п.) или их комбинацию. Компоненты раствора для криоконсервации можно растворять в стерильной воде (пригодной для инъекций). Любой раствор для криоконсервации может практически не содержать сыворотки крови (не выявляется посредством стандартных способов).

В некоторых случаях фармацевтическую композицию, содержащую популяцию

генетически сконструированных CAR-T-клеток, суспендированных в растворе для криоконсервации (например, по сути не содержащем сыворотку крови), можно помещать во флаконы для хранения.

Любую из фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе, содержащих популяцию генетически сконструированных CAR-T-клеток, таких как CAR-T-клетки, раскрытые в данном документе, которые необязательно могут быть суспендированы в растворе для криоконсервации, раскрытом в данном документе, можно хранить в среде, которая существенно не оказывает влияния на жизнеспособность и биоактивность T-клеток, для будущего применения, например, в условиях, обычно применяемых для хранения клеток и тканей. В некоторых примерах фармацевтическую композицию можно хранить в паровой фазе жидкого азота при $\leq -135^{\circ}\text{C}$. Значимых изменений в отношении внешнего вида, количества клеток, жизнеспособности, % CAR+ T-клеток и % T-клеток с отредактированным геном после того, как клетки хранили в таких условиях в течение определенного периода времени, не наблюдали.

II. Ингибиторы NK-клеток

NK-клетки играют важную роль как во врожденном, так и в адаптивном иммунитете, включая опосредование противоопухолевых и противовирусных ответов. Поскольку NK-клетки не требуют предварительной сенсibilизации или примирования для опосредования своей цитотоксической функции, они являются первой линией защиты от инфицированных вирусом и злокачественных клеток, у которых отсутствует или не функционирует MHC класса I (например, нарушенный MHC класса I или нарушенные субъединицы MHC класса I). NK-клетки распознают "чужие" клетки без потребности в антителах и примировании антигеном. Специфические в отношении MHC класса I ингибирующие рецепторы на NK-клетках отрицательно регулируют функцию NK-клеток. Связывание ингибирующих рецепторов NK-клеток с их лигандом MHC класса I контролирует лизис, опосредованный NK-клетками. Когда клетки с нарушенным MHC класса I не могут связывать ингибирующие рецепторы NK (например, KIR), данные клетки становятся чувствительными к лизису, опосредованному NK-клетками. Данное явление также называют "распознавание потери своего". См., например, Malmberg KJ et al., *Immunogenetics* (2017), 69:547-556; Cruz-Munoz ME et al., *J. Leukoc. Biol.* (2019), 105:955-971.

Следовательно, описанные в данном документе сконструированные CAR-T-клетки человека, содержащие нарушенный MHC класса I, чувствительны к лизису, опосредованному NK-клетками, что снижает сохраняемость и последующую эффективность сконструированных CAR-T-клеток человека.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены ингибиторы NK-клеток для применения в комбинации с терапией на основе CAR-T-клеток, предусматривающей популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека, описанных в данном документе.

Ингибитор NK-клеток для применения в описанных в данном документе способах

может представлять собой молекулу, которая непосредственно или опосредованно блокирует, подавляет или снижает активность или уменьшает количество НК-клеток. Термин "ингибитор" не подразумевает какого-либо конкретного механизма биологического действия, и считается, что он явно включает и охватывает все возможные фармакологические, физиологические и биохимические взаимодействия с НК-клетками, либо непосредственные, либо опосредованные. Применительно к настоящему изобретению следует четко понимать, что термин "ингибитор" охватывает все ранее идентифицированные термины, названия, функциональные состояния и характеристики, посредством которых сама НК-клетка, биологическая активность НК-клетки (в том числе без ограничений ее способность опосредовать уничтожение клеток) или следствия ее биологической активности существенно упраздняются, уменьшаются или нейтрализуются в любой значимой степени, например на по меньшей мере 20%, 50%, 70%, 85%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300% или 500% или в 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз, 1000 раз или 10^4 раз.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток уменьшает абсолютные количества НК-клеток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток снижает частоту встречаемости НК-клеток среди мононуклеарных клеток периферической крови. В некоторых вариантах осуществления количество НК-клеток уменьшается на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток уменьшает общее количество НК-клеток у субъекта, получающего терапию на основе CAR-T-клеток, по сравнению с общим количеством НК-клеток у субъекта до получения ингибитора НК-клеток. В некоторых вариантах осуществления количество НК-клеток уменьшается до по меньшей мере 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 или 180 НК-клеток/мкл крови. В некоторых вариантах осуществления количество НК-клеток уменьшается до менее 200 НК-клеток/мкл крови.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток не уменьшает количеств эндогенных Т-клеток в значительной степени. В некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток поддерживает количества эндогенных Т-клеток на уровне 85%, 90%, 95%, 100%, 105% или 110% от количеств Т-клеток в сравнении с количествами Т-клеток до лечения ингибитором НК-клеток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток поддерживает количества эндогенных Т-клеток на уровне, составляющем приблизительно 1500 Т-клеток/мкл крови. В некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток поддерживает количество эндогенных Т-клеток на уровне, составляющем примерно 1275, 1350, 1425, 1500, 1575 или 1650 Т-клеток/мкл крови. В некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток не уменьшает количество сконструированных CAR-T-клеток человека в значительной степени. В некоторых вариантах осуществления НК-клетка увеличивает количество сконструированных CAR-T-клеток человека по сравнению с количеством сконструированных CAR-T-клеток человека в отсутствие ингибитора НК-клеток. В

некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток не активирует сконструированные CAR-T-клетки человека в значительной степени.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток снижает опосредованный NK-клетками лизис сконструированных CAR-T-клеток человека. В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток снижает опосредованный NK-клетками лизис сконструированных T-клеток человека на приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% по сравнению с опосредованным NK-клетками лизисом сконструированных CAR-T-клеток человека в отсутствие ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток снижает опосредованный NK-клетками лизис сконструированных T-клеток человека *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток снижает активность NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы снижения активности NK-клеток у субъекта, получающего терапию на основе CAR-T-клеток, путем введения ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток снижает антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), комплементзависимую цитотоксичность (CDC), апоптоз или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток снижает опосредованную NK-клетками антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) в отношении сконструированных CAR-T-клеток человека. NK-клетки экспрессируют Fc-рецепторы, например FcγRIIIA и/или FcγRIIC, на своих клеточных поверхностях. Fc-рецепторы связывают Fc-область антител. После связывания Fc-рецепторы передают активирующие сигналы через иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) и обуславливают последующую дегрануляцию NK-клеток, секрецию цитокинов (например, IFN-γ) и лизис клеток.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток снижает опосредованный NK-клетками антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) сконструированных CAR-T-клеток человека. ADCP происходит, когда Fc-область антитела связывается с Fc-рецептором, например FcγRIIIA, FcγRIIA или FcγRI, на макрофагах. Связывание Fc-рецепторов на макрофагах инициирует фагоцитоз клеток-мишеней и приводит к поглощению макрофагами и элиминированию клеток-мишеней, например сконструированных CAR-T-клеток человека.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток снижает опосредованную NK-клетками комплементзависимую цитотоксичность (CDC) в отношении сконструированных CAR-T-клеток человека. Антитела, связанные с поверхностью клетки, например с поверхностью NK-клетки, инициируют активацию комплемента классическим путем. Активация комплемента индуцирует клеточный лизис, фагоцитоз, хемотаксис и активацию иммунных клеток. Компонент комплемента C1 распознает Fc-область антитела и активируется при связывании антитела. Активация C1

инициирует каскад активации ферментов, кумулирующий в расщепление и активацию компонента комплемента C3 в C3a и C3b. C3b опсонизируется на поверхности клетки и инициирует последующую активацию компонентов C5b-C9 с образованием мембраноатакующих комплексов (МАС) на мембране клетки-мишени, что приводит к разрушению мембраны и клеточному лизису.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток снижает опосредованный НК-клетками апоптоз сконструированных CAR-T-клеток человека. Как только НК-клетки распознают клетки-мишени и связываются с ними (например, сконструированными T-клетками человека) посредством рецепторного связывания, иммунологические синапсы (IS) образуются посредством реорганизации цитоскелета, при которой поляризуется образование микротрубочек, обеспечивая возможность транспортировки и высвобождения литических ферментов НК в клетки-мишени. Примеры литических ферментов включают гранзим В, перфорин, FasL, TRAIL и гранулозин. Сериновая протеаза, гранзим В, инициирует апоптоз при помощи каспазозависимых путей, непосредственно расщепляя проапоптозные молекулы, такие как каспаза-8 и каспаза-3. Гранзим В также индуцирует апоптоз путем расщепления проапоптозной молекулы Bid, которая вызывает высвобождение цитохрома С из митохондрий. Помимо литической дегрануляции, молекулы лиганда Fas (FasL) и родственного TNF индуцирующего апоптоз лиганда (TRAIL) на НК-клетках также индуцируют гибель клеток. Данные рецепторы связывают и активируют рецепторы смерти TRAILR и Fas на клетках-мишенях и инициируют проапоптозный каскад с участием протеаз каспаз и $IL1\beta$ -превращающего фермента (ICE).

В дополнение к цитолитическим функциям НК-клетки также выполняют свою иммуномодулирующую функцию посредством секреции воспалительных и иммуносупрессивных цитокинов. При контакте с клетками-мишенями НК-клетки секретируют цитокины Th1, IFN- γ , TNF, GM-CSF и т. д. Данные цитокины активируют T-клетки, дендритные клетки, макрофаги и нейтрофилы. НК-клетки дополнительно секретируют хемокины, например MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, лимфотоксин, IL-8 (CXCL8), которые привлекают эффекторные клетки к сайту активации. В некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток снижает иммуномодулирующую функцию НК-клетки. В некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток снижает секрецию воспалительных цитокинов, что приводит к снижению индуцированной активацией клеточной гибели сконструированных CAR-T-клеток человека.

Эксперименты *in vitro* и *in vivo* по определению активности НК-клеток известны в уровне техники. Примеры анализов включают анализы цитолиза, анализы ADCC, анализы с помощью проточной цитометрии для определения секреции цитокинов, индукции апоптоза, дегрануляции, CDC или пролиферации НК-клеток. См., например, Huang M, et al., *Hepatology* (2013), 57:277-288; EP 2 658 871 B1; De Weers M, et al., *J. Immunol.* (2011) 186:1840-8; EP 1 720 907 B1; патент США № 7829673; патент США № 9944711.

А. Примеры ингибиторов НК-клеток

В некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток представляет собой малую молекулу, моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, полинуклеотид или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток представляет собой малую молекулу. Примером ингибитора НК-клеток, представляющего собой малую молекулу, является руксолитиниб (Jakafi®). Руксолитиниб является ингибитором янус-киназы, применяемым при лечении миелофиброза. Руксолитиниб связывает и ингибирует протеинтирозинкиназы JAK 1 и 2. Пациенты, получавшие руксолитиниб, демонстрировали повышенные значения частоты возникновения инфекции. Руксолитиниб снижает пролиферацию НК-клеток, экспрессию рецепторов, индуцированную цитокинами, и функцию НК-клеток, включая, например, снижение уничтожения клеток, снижение дегрануляции, снижение продукции IFN- γ и снижение передачи сигналов цитокинов (Schonberg et al., Blood (2014), 124(21):3169). Структура руксолитиниба и способы получения руксолитиниба описаны, например, в патентах США №№ 7598257, 8415362, 8722693, 8882481, 8829013 и 9079912. Дополнительные примеры иммуносупрессивных лекарственных средств на основе малых молекул, которые ингибируют функции НК-клеток, описаны в Pradier A, et al., Front. Immunol. (2019), 10:556. В некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток представляет собой руксолитиниб, циклоспорин А (CsA), такролимус (ТАС), микофеноловую кислоту (МРА), мофетила микофенолат (ММФ), эверолимус или рапамицин.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток представляет собой полипептид. HLA-G представляет собой неклассический антиген класса I, экспрессируемый в плаценте человека и эпителиальных клетках вилочковой железы. Экспрессия антигена HLA-G в плаценте защищает плод от иммунного отторжения материнским организмом. Rouas-Freiss N, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (1997), 94:5249-5254. Ген HLA-G альтернативно сплайсирован и транскрибируется в mRNA HLA-G, кодирующие мембраносвязанные HLA-G (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 и HLA-G4) и растворимые HLA-G (HLA-G5, HLA-G6 и HLA-G7). Экспрессия HLA-G на опухолевых клетках защищает В-клеточную лимфому от НК-опосредованного клеточного лизиса. Аналогично, трансфекция изоформ HLA-G1 и HLA-G2 в клетки-мишени K562 устраняла цитотоксичность, опосредованную НК-подобным клоном YT2C2 Т-клеточного лейкоза. Клетки-мишени, трансфицированные внеклеточными HLA-G1, G2, G3 или G4, также ингибируют цитотоксическую активность НК-клеток в анализе клеточного лизиса. См., например, EP1189627, пример 3. Рекомбинантный слитый полипептид, содержащий β 2М-спейсер-HLA-G5, составленный в микросферы и вводимый внутрибрюшинно мышам, получившим аллогенные трансплантаты кожи, был способен улучшать толерантность к трансплантату. См., например, EP 2184297 A1. Дополнительные рекомбинантные белки HLA-G были протестированы в качестве потенциальных средств для лечения отторжения тканей. См., например, Favier B, et al., PLoS One (2011), 6(7):e21011; EP 2264067 A1. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток

представляет собой HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, GLA-G4, β 2M-HLA-G5, HLA-G альфа 1 домен-Fc или HLA-G альфа 1.

В некоторых вариантах осуществления клетка может содержать дополнительные редактирования генов МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления клетку можно сконструировать с содержанием экзогенного гена МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления клетку можно сконструировать с содержанием экзогенного гена, который кодирует функциональный белок. В некоторых вариантах осуществления клетку можно сконструировать с экспрессией экзогенного гена (например, на клеточной поверхности) на обнаруживаемом уровне (например, с помощью антитела, например посредством проточной цитометрии) белка, кодируемого экзогенным геном. Клетка, которая экспрессирует экзогенный белок на обнаруживаемом уровне, может называться клеткой с нокином. Например, клетка, предусматривающая редактирование гена МНС класса I, может считаться клеткой с нокином МНС класса I, если молекула МНС класса I выявляется на поверхности клетки с использованием антитела, которое специфически связывает один или несколько белков в молекуле МНС класса I.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор НК-клеток представляет собой полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает без ограничения малую интерферирующую РНК (siRNA), короткую шпилечную РНК (shRNA) или антисмысловую олигонуклеотид (ASO). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид находится в составе липидных наночастиц (LNP) для доставки в клетки. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид конъюгирован для доставки к конкретным типам клеток. Например, siRNA конъюгирована с трехвалентным рецептором на основе N-ацетилгалактозамина (GalNAc) для направленного воздействия на клетки печени. В некоторых вариантах осуществления siRNA конъюгирована с нуклеотидами CpG, которые связывают рецепторы на дендритных клетках или макрофагах. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид доставляют в векторе. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой плазмидные векторы или миникольцевую ДНК. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вирус представляет собой рекомбинантный поксвирус, рекомбинантный герпесвирус, рекомбинантный аденовирус, рекомбинантный лентивирус или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита (VSV) и их комбинации. В неограничивающем примере ингибитор НК-клеток представляет собой shRNA, нацеливающуюся на рецептор NKG2D. Huang M, et al., *Hepatology* (2013), 57:277-288. Цитолиз, опосредованный НК, снижался при введении мышам плазмиды, содержащей shRNA, нацеленной на три мышинных NKG2D. В другом варианте осуществления уровень белка домена тетрамеризации калиевого канала, содержащего 9 (KCTD9), повышен в НК-клетках пациентов с вирусным гепатитом. Zhang X, et al., *BMC Immunol.* (2018), 19:20. Инъекция плазмиды, кодирующей shRNA, нацеленной на KCTD9, в мышинной модели гепатита приводила к увеличению выживаемости мышей. В

некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток представляет собой shRNA NKG2D или shRNA KCTD9.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток представляет собой моноклональное антитело. Неограничивающие примеры антител, которые снижают активность NK-клеток, раскрыты в AU2005321017B2 (антитело к NKG2A), US20030095965A1 (бивалентные антитела к рецепторам CD94/NKG2), патенте США № 9211328 (антитела к NKG2D) и патенте США № 7829673 (антитела к CD38). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток представляет собой антитело к NKG2A, бивалентное антитело к рецепторам CD94/NKG2, антитело к NKG2D или антитело к CD38.

В. Антитела, которые связывают CD38 (антитела к CD38)

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают CD38, для применения в способах, описанных в данном документе. CD38, также известный как циклическая ADP-рибозогидролаза, представляет собой трансмембранный гликопротеин типа II массой 46 кДа, который катализирует синтез и гидролиз циклической аденозин-5'-дифосфатрибозы, внутриклеточного мобилизующего ионы кальция мессенджера. Многофункциональный белок CD38 также участвует в опосредованной рецепторами клеточной адгезии и передаче сигналов.

Антитело (взаимозаменяемо используется в форме множественного числа) в контексте данного документа представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную к специфическому связыванию с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т. д., через по меньшей мере один сайт распознавания антигена, расположенный в вариательной области молекулы иммуноглобулина. Используемый в данном документе термин "антитело" охватывает не только интактные (т. е. полноразмерные) моноклональные антитела, но также антигенсвязывающие фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, одноцепочечный вариательный фрагмент (scFv)), их мутанты, слитые белки, содержащие часть антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, диатела, линейные антитела, одноцепочечные антитела, однодоменные антитела (например, антитела с VHH верблюда или ламы), мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая включает участок распознавания антигена с необходимой специфичностью, включая гликозилированные варианты антител, варианты аминокислотных последовательностей антител и ковалентно модифицированные антитела.

Типичная молекула антитела включает вариательную область тяжелой цепи (VH) и вариательную область легкой цепи (VL), которые обычно участвуют в связывании антигена. Данные области/остатки, которые отвечают за связывание антигена, можно идентифицировать по аминокислотным последовательностям последовательностей VH/VL эталонного антитела (например, антитела к CD38, описанного в данном

документе) с помощью способов, известных в уровне техники. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, также известные как "определяющие комплементарность области" ("CDR"), перемежающиеся с более консервативными областями, которые известны как "каркасные области" ("FR"). Каждая VH и VL обычно состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Протяженность каркасной области и CDR может быть точно идентифицирована с использованием методологии, известной из уровня техники, например, по определению Кабата, по определению Chothia, по определению AbM и/или по контактному определению, все из которых хорошо известны из уровня техники. Как используется в данном документе, CDR может относиться к CDR, определяемой любым способом, известным из уровня техники. Два антитела, имеющие одинаковые CDR, означают, что эти два антитела имеют одинаковую аминокислотную последовательность этой CDR, как определено одним и тем же способом. См., например, Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, Chothia et al., (1989) *Nature* 342:877; Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, Al-lazikani et al (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948; и Almagro, *J. Mol. Recognit.* 17:132-143 (2004). См. также hgmp.mrc.ac.uk и bioinf.org.uk/abs.

Антитело предусматривает антитело любого класса, такого как IgD, IgE, IgG, IgA или IgM (или их подкласса), и антитело не должно относиться к какому-либо конкретному классу. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена его тяжелых цепей антитела иммуноглобулины можно отнести к разным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Антитела, подлежащие применению, как представлено в данном документе, могут быть мышиного, крысиного, человеческого или любого другого происхождения (в том числе химерные или гуманизированные антитела). В некоторых примерах антитело содержит модифицированную константную область, такую как константная область, которая является иммунологически инертной, например не запускает опосредованный комплементом лизис или не стимулирует зависимость от антитела цитотоксичность (ADCC).

В некоторых вариантах осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением представляет собой гуманизированное антитело. Гуманизированные антитела относятся к формам, отличным от человеческих (например, мышиные) антител, которые представляют собой специфические химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулина или его антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат

минимальную последовательность, происходящую из отличного от человеческого иммуноглобулина. По большей части гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (реципиентные антитела), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиента, заменены остатками из CDR отличных от человеческих видов (донорное антитело), таких как мышь, крыса или кролик, обладающими необходимыми специфичностью, аффинностью и потенциалом. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменяют соответствующими отличными от человеческих остатками. Кроме того, гуманизированное антитело может содержать остатки, которых нет ни в реципиентном антителе, ни во вставленных последовательностях CDR или каркасной области, но которые включены для дальнейшего улучшения и оптимизации характеристик антитела. В общем, гуманизированное антитело будет включать по сути все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или по сути все области CDR соответствуют таковым отличного от человеческого иммуноглобулина и все или по сути все области FR являются таковыми из консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело оптимально также будет включать по меньшей мере часть константной области или домена иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина. Другие формы гуманизированных антител содержат одну или несколько CDR (одну, две, три, четыре, пять и/или шесть), которые изменены по сравнению с исходным антителом, и которые также называются одной или несколькими CDR, "производными" одной или нескольких CDR из исходного антитела. Гуманизированные антитела могут также быть вовлечены в созревание аффинности.

В некоторых вариантах осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением представляет собой химерное антитело, которое может включать тяжелую константную область и легкую константную область человеческого антитела. Химерные антитела относятся к антителам, имеющим переменную область или часть переменной области от первого вида и константную область от второго вида. Обычно в этих химерных антителах переменная область как легкой, так и тяжелой цепей имитирует переменные области антител, происходящих от одного вида млекопитающих (например, отличного от человека млекопитающего, такого как мышь, кролик и крыса), в то время как константные части гомологичны последовательностям в антителах, полученных от другого млекопитающего, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные модификации могут быть сделаны в переменной области и/или константной области.

В некоторых вариантах осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением специфически связывает антиген-мишень (например, CD38 человека). Антитело, которое "специфически связывается" (используется в данном документе взаимозаменяемо) с мишенью или эпитопом, подразумевает термин, хорошо известный из уровня техники, и способы определения такого специфического связывания также хорошо известны из уровня техники. Говорят, что молекула характеризуется "специфическим

связыванием", если она реагирует или связывается чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретным антигеном-мишенью, чем с альтернативными мишенями. Антитело "специфически связывается" с антигеном-мишенью, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, легче и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими веществами. Например, антитело, которое специфически (или предпочтительно) связывается с эпитопом CD38, или представляет собой антитело, которое связывает этот эпитоп с большей аффинностью, авидностью, легче и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими эпитопами того же антигена или другим антигеном. При прочтении этого определения также понятно, что, например, антитело, которое специфически связывается с первым антигеном-мишенью, может или не может специфически или преимущественно связываться со вторым антигеном-мишенью. Соответственно, "специфическое связывание" или "преимущественное связывание" не обязательно требует (хотя оно может предусматривать) исключительное связывание. Обычно, но не обязательно, упоминание связывания означает преимущественное связывание.

Также в объем настоящего изобретения входят функциональные варианты любого из иллюстративных антител, раскрытых в данном документе. Функциональный вариант может содержать один или несколько вариантов аминокислотных остатков в VH и/или VL, или в одной или нескольких CDR HC и/или одной или нескольких CDR VL по сравнению с эталонным антителом, сохраняя при этом по сути аналогичную активность связывания и биологическую активность (например, по сути аналогичную аффинность связывания, специфичность связывания, ингибирующую активность, противоопухолевую активность или их комбинацию), как у эталонного антитела.

В некоторых случаях вариации аминокислотных остатков могут быть консервативными заменами аминокислотных остатков. Как используется в данном документе, "консервативная аминокислотная замена" относится к аминокислотной замене, которая не изменяет характеристики относительного заряда или размера белка, в котором выполнена аминокислотная замена. Варианты можно получать согласно способам изменения полипептидной последовательности, известным специалисту в данной области, таким как указанные в ссылках, в которых собраны такие способы, например *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 или *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот включают замены, выполняемые среди аминокислот в следующих группах: (a) A → G, S; (b) R → K, H; (c) N → Q, H; (d) D → E, N; (e) C → S, A; (f) Q → N; (g) E → D, Q; (h) G → A; (i) H → N, Q; (j) I → L, V; (k) L → I, V; (l) K → R, H; (m) M → L, I, Y; (n) F → Y, M, L; (o) P → A; (p) S → T; (q) T → S; (r) W → Y, F; (s) Y → W, F; и (t) V → I, L.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток, применяемый в комбинированной терапии, раскрытой в данном документе, представляет собой антитело

к CD38. CD38 экспрессируется во многих иммунных клетках, включая лимфоидные, эритроидные и миелоидные клетки. В дополнение, CD38 экспрессируется на высоком уровне в клетках различных видов лейкоза, миелом и солидных опухолей, включая множественную миелому, В-клеточную неходжкинскую лимфому (NHL), В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (ALL) и Т-клеточный ALL. CD38 является маркером активации лимфоцитов и используется в качестве прогностического маркера для пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом.

Аминокислотная последовательность иллюстративного белка CD38 человека представлена под SEQ ID NO: 59 (эталонная последовательность в NCBI: NP001766.2). Последовательность mRNA, кодирующая иллюстративный белок CD38 человека, представлена под SEQ ID NO: 60 (эталонная последовательность в NCBI: NM_001775.4) (молекула CD38 Homo sapiens (CD38), вариант транскрипта 1). Способы получения антител, которые специфически связывают CD38 человека, известны специалистам в данной области.

Антитела к CD38 были протестированы в различных доклинических и клинических исследованиях, например, в отношении НК/Т-клеточной лимфомы, Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза, иммуноглобулина. Иллюстративные антитела к CD38, протестированные в отношении противоопухолевых свойств, включают SAR650984 (также называемое изатуксимаб, химерное mAb), которое находится в фазе I клинических испытаний у пациентов с CD38+ В-клеточными злокачественными новообразованиями (Deckert J. et al., Clin. Cancer. Res. (2014): 20(17):4574-83), MOR202 (также называемое MOR03087, полностью человеческое mAb) и TAK-079 (полностью человеческое mAb).

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 для применения в настоящем изобретении включает SAR650984 (изатуксимаб), MOR202, Ab79, Ab10, HM-025, HM-028, HM-034; а также антитела, раскрытые в патенте США № 9944711, патенте США № 7829673, WO2006/099875, WO 2008/047242, WO2012/092612 и EP 1720907 B1, включенных в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38, раскрытое в данном документе, может являться функциональным вариантом любого из эталонных антител, раскрытых в данном документе. Такой функциональный вариант может содержать такие же определяющие комплементарность области тяжелой цепи и легкой цепи, что и эталонное антитело. В некоторых примерах функциональный вариант может содержать такую же переменную область тяжелой цепи и такую же переменную область легкой цепи, что и эталонное антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 для применения в настоящем изобретении представляет собой даратумумаб. Даратумумаб (также называемый Darzalex[®], HuMax-CD38 или IgG1-005) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG₁, которое нацелено на CD38 и одобрено для лечения множественной миеломы. Его применяют в качестве монотерапии или в составе

комбинированной терапии для лечения пациентов с впервые выявленной множественной миеломой или ранее получавших лечение против множественной миеломы. Даратумумаб описан в патенте США № 7829673 и WO2006/099875.

Даратумумаб связывает эпитоп на CD38, который содержит две β -цепи, расположенные в участках аминокислот 233-246 и 267-280 в CD38. Эксперименты с мутантными полипептидами CD38 показывают, что аминокислотный остаток S274 является важным для связывания даратумумаба. (van de Donk NWCJ et al., *Immunol. Rev.* (2016) 270:95-112). Ориентация связывания даратумумаба с CD38 обеспечивает возможность осуществления опосредованных Fc-рецептором последующих иммунных процессов.

Механизмы действия, характерные для даратумумаба как терапевтического средства против лимфомы и множественной миеломы, включают Fc-зависимые эффекторные механизмы, такие как комплементзависимая цитотоксичность (CDC), опосредованная натуральными киллерными (NK) клетками антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) (De Weers M, et al., *J. Immunol.* (2011) 186:1840-8), опосредованный антителами клеточный фагоцитоз (ADCP) (Overdijk MB et al., *MAbs* (2015), 7(2):311-21) и апоптоз после перекрестного связывания (van de Donk NWCJ and Usmani SZ, *Front. Immunol.* (2018), 9:2134).

Полная аминокислотная последовательность тяжелой цепи даратумумаба изложена под SEQ ID NO: 61, а полная аминокислотная последовательность легкой цепи даратумумаба изложена под SEQ ID NO: 63. Аминокислотная последовательность вариательной области тяжелой цепи даратумумаба изложена под SEQ ID NO: 62, а аминокислотная последовательность вариательной области легкой цепи даратумумаба изложена под SEQ ID NO: 64. Даратумумаб включает определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и 3 (SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно) и CDR легкой цепи (LCDR) 1, 2 и 3 (SEQ ID NO: 68, 69 и 70, соответственно). В некоторых вариантах осуществления данные последовательности можно использовать для получения моноклонального антитела, связывающего CD38. Например, способы получения даратумумаба описаны в патенте США № 7829673 (включенном в данный документ посредством ссылки в отношении цели и предмета изобретения, упоминаемых в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 для применения в настоящем изобретении представляет собой даратумумаб, антитело, обладающее теми же функциональными характеристиками, что и даратумумаб, или антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и даратумумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит: (a) вариательную область тяжелой цепи иммуноглобулина и (b) вариательную область легкой цепи иммуноглобулина, где вариательная область тяжелой цепи и вариательная область легкой цепи определяют сайт связывания (паратоп) для CD38. В некоторых вариантах осуществления вариательная область тяжелой цепи содержит HCDR1, содержащую

аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 65, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 66; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 67. Последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 разделены последовательностями каркасной области (FR) иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит: (a) переменную область легкой цепи иммуноглобулина и (b) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, где переменная область легкой цепи и переменная область тяжелой цепи определяют сайт связывания (паратоп) для CD38. В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 68, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 69; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 70. Последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 разделены последовательностями каркасной области (FR) иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 62, и переменную область легкой цепи иммуноглобулина (VL). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит переменную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 64, и переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина (VH). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 70%, 75%, 70%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 62, и содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 70%, 75%, 70%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 64.

"Процент идентичности" двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма по Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, модифицированного согласно Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (версия 2.0) согласно Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Поиск белков BLAST можно выполнять с помощью программы XBLAST, вес выравнивания=50, длина слова=3, с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белка по настоящему изобретению. Если между двумя последовательностями существуют гэпы, то можно использовать программу Gapped BLAST, описанную в Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

CD38 экспрессируется на NK-клетках, и инфузия даратумумаба приводит к уменьшению количества NK-клеток в периферической крови и костном мозге. Уменьшение количества NK-клеток происходит вследствие уничтожения NK-клеток посредством ADCC, при которой NK-клетки опосредуют цитотоксическое уничтожение соседних NK-клеток. Также было показано, что введение даратумумаба уменьшает количества клеток-супрессоров миелоидного происхождения, регуляторных Т-клеток и регуляторных В-клеток. Элиминация регуляторных иммунных клеток приводит к усилению Т-клеточных ответов и увеличению количеств Т-клеток (J Krejčík et al., Blood (2016), 128(3):384-394).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 (например, даратумумаб) уменьшает абсолютные количества NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 снижает процентное содержание NK-клеток среди РВМС. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 ингибирует активность NK-клеток посредством Fc-опосредованных механизмов. В других вариантах осуществления антитело к CD38 опосредует уничтожение NK-клеток посредством CDC. В других вариантах осуществления антитело к CD38 опосредует уничтожение NK-клеток посредством ADCC. В других вариантах осуществления антитело к CD38 усиливает фагоцитоз NK-клеток. В других вариантах осуществления антитело к CD38 усиливает индукцию апоптоза после опосредованного FcγR перекрестного связывания.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 представляет собой даратумумаб или антитело, обладающее теми же функциональными характеристиками, что и даратумумаб, например функциональный вариант даратумумаба. В некоторых примерах функциональный вариант содержит по сути те же CDR VH и VL, что и даратумумаб. Например, он может содержать только до 8 (например, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) вариаций аминокислотных остатков во всех областях CDR антитела и связывать тот же эпитоп CD38 с по сути такой же аффинностью (например, характеризующейся значением KD того же порядка), что и даратумумаб. В некоторых случаях функциональные варианты могут содержать ту же CDR3 тяжелой цепи, что и даратумумаб, и не обязательно ту же CDR3 легкой цепи, что и даратумумаб. В качестве альтернативы или в дополнение, функциональные варианты могут содержать ту же CDR2 тяжелой цепи, что и даратумумаб. Такое антитело к CD38 может содержать фрагмент VH, содержащий вариации аминокислотных остатков CDR только в CDR1 тяжелой цепи по сравнению с VH даратумумаба. В некоторых примерах антитело к CD38 может дополнительно содержать фрагмент VL, содержащий ту же CDR3 VL и необязательно ту же CDR1 VL или CDR2 VL, что и даратумумаб. В качестве альтернативы или в дополнение, вариации аминокислотных остатков могут представлять собой консервативные замены аминокислотных остатков (см. описания выше).

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 может содержать CDR тяжелой цепи, которые характеризуются по меньшей мере 80% (например, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичности последовательности, по отдельности или в совокупности, по

сравнению с CDR V_H даратумумаба. В качестве альтернативы или в дополнение, антитело к CD38 может содержать CDR легкой цепи, которые характеризуются по меньшей мере 80% (например, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичности последовательности, по отдельности или в совокупности, по сравнению с CDR V_L даратумумаба. Используемый в данном документе термин "по отдельности" означает, что одна CDR антитела характеризуется указанной идентичностью последовательности относительно соответствующей CDR даратумумаба. Термин "в совокупности" означает, что три CDR V_H или V_L антитела в комбинации характеризуются указанной идентичностью последовательности относительно соответствующих трех CDR V_H или V_L даратумумаба.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 связывается с тем же эпитопом, с которым связывается даратумумаб, на CD38 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD38 конкурирует с даратумумабом за связывание с CD38 человека.

Конкурентные анализы для определения того, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и даратумумаб, или конкурирует с даратумумабом за связывание с CD38, известны в уровне техники. Примеры конкурентных анализов включают иммуноанализы (например, анализ ELISA, анализы RIA), поверхностный плазмонный резонанс, (например, анализ с использованием BIAcore), биослойную интерферометрию и проточную цитометрию.

Конкурентный анализ, как правило, включает иммобилизованный антиген (например, CD38), тестируемое антитело (например, CD38-связывающее антитело) и эталонное антитело (например, даратумумаб). Одно из эталонного и тестируемого антител помечено, а другое немечено. В некоторых вариантах осуществления конкурентное связывание определяют по количеству эталонного антитела, связанного с иммобилизованным антигеном в возрастающих концентрациях тестируемого антитела. Антитела, которые конкурируют с эталонным антителом, включают антитела, которые связывают те же или перекрывающиеся эпитопы, что и эталонное антитело. В некоторых вариантах осуществления тестируемые антитела связываются со смежными неперекрывающимися эпитопами таким образом, что близость антител создает стерические препятствия, достаточные для влияния на связывание эталонного антитела с антигеном.

Конкурентный анализ можно проводить в обоих направлениях, чтобы убедиться в том, что присутствие метки или стерических препятствий не мешает связыванию с эпитопом и не ингибирует его. Например, в первом направлении эталонное антитело является меченым, а тестируемое антитело немеченым. Во втором направлении тестируемое антитело является меченым, а эталонное антитело немеченым. В другом варианте осуществления в первом направлении эталонное антитело связывается с иммобилизованным антигеном, и для измерения конкурентного связывания добавляют возрастающие концентрации тестируемого антитела. Во втором направлении тестируемое антитело связывается с иммобилизованным антигеном, и для измерения конкурентного

связывания добавляют возрастающие концентрации эталонного антитела.

В некоторых вариантах осуществления может быть установлено, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если по сути все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Может быть установлено, что два антитела связываются с перекрывающимися эпитопами, если только часть мутаций, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшает или устраняет связывание другого.

В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь любого из антител к CD38, которые описаны в данном документе (например, даратумумаба), может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи (CH) или ее часть (например, CH1, CH2, CH3 или их комбинацию). Константная область тяжелой цепи может иметь любое подходящее происхождение, например от человека, мыши, крысы или кролика. В качестве альтернативы или в дополнение легкая цепь антитела к CD38 может дополнительно содержать константную область легкой цепи (CL), которая может являться любой CL, известной в уровне техники. В некоторых примерах CL представляет собой легкую каппа-цепь. В других примерах CL представляет собой легкую лямбда-цепь. Константные области тяжелой и легкой цепей антитела хорошо известны в уровне техники, например, те, которые представлены в базе данных IMGT (www.imgt.org) или на www.vbase2.org/vbstat.php, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки.

Любые из антител к CD38, включая человеческие антитела или гуманизированные антитела, можно получать с помощью традиционных подходов, например, с помощью гибридомной технологии, скрининга библиотеки антител или рекомбинантной технологии. См., например, Harlow and Lane, (1998) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, WO 87/04462, Morrison et al., (1984) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851 и Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10033 (1989).

Следует понимать, что описанные антитела являются только иллюстративными и что в композициях и способах, раскрытых в данном документе, можно использовать любые антитела к CD38. Способы получения антител известны специалистам в данной области.

III. Комбинированная терапия

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена комбинированная терапия, включающая применение любых из генетически сконструированных CAR-T-клеток и любого из ингибиторов NK-клеток для улучшения клинического исхода у субъекта (например, пациента-человека), получающего комбинированную терапию. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение эффективного количества популяции генетически сконструированных CAR-T-клеток, раскрытых в данном документе, субъекту, который получает или получил ингибитор NK-клеток, также раскрытый в данном документе. В других вариантах осуществления

комбинированная терапия включает введение эффективного количества ингибитора NK-клеток субъекту, который получает или получил популяцию генетически сконструированных CAR-T-клеток. В еще других вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение субъекту эффективного количества популяции генетически сконструированных CAR-T-клеток и эффективного количества ингибитора NK-клеток либо одновременно, либо последовательно.

А. Улучшение клинического исхода

Используемый в данном документе "клинический исход" относится к одному или нескольким терапевтическим эффектам (непосредственным или опосредованным) у субъекта, являющимся результатом комбинированной терапии, которые приводят к повышению эффективности лечения по сравнению с монотерапией на основе CAR-T-клеток и/или монотерапией на основе ингибитора NK-клеток. В некоторых случаях улучшенный клинический исход предусматривает один или несколько фактических терапевтических эффектов, например усиление клинического ответа на введение CAR-T-клеток (например, снижение тяжести заболевания, облегчение одного или нескольких симптомов заболевания и/или продление времени выживания). В контексте противоопухолевой терапии терапевтические эффекты могут предусматривать уменьшение объема опухоли, уменьшение количеств опухолевых клеток и/или усиление противоопухолевых ответов. В качестве альтернативы, улучшенный клинический исход предусматривает усиление одной или нескольких необходимых характеристик и/или уменьшение одной или нескольких нежелательных характеристик, что в конечном итоге приводит к получению терапевтических эффектов. Например, улучшенный клинический исход может предусматривать повышение степени сохраняемости сконструированных CAR-T-клеток человека у субъекта, уменьшение лизиса CAR-T-клеток, который может быть индуцирован NK-клетками, уменьшение количества NK-клеток или комбинацию вышеуказанного.

Клинический исход лечения, включающего применение композиции для лечения медицинского состояния, может определить квалифицированный врач. Лечение считается "эффективным лечением", если какой-либо один или все признаки или симптомы, представляющие собой, в качестве лишь одного примера, уровни функциональной мишени, изменяются благоприятным образом (например, повышаются на по меньшей мере 10%), или происходит уменьшение или облегчение тяжести других клинически приемлемых симптомов или маркеров заболевания (например, рака). Клинический исход также можно измерить по отсутствию ухудшения состояния субъекта, что оценивается по госпитализации или необходимости в медицинских вмешательствах (например, прогрессирование заболевания останавливается или по меньшей мере замедляется). Способы измерения этих показателей известны специалистам в данной области и/или описаны в данном документе. Лечение предусматривает любое лечение заболевания у субъекта и включает: (1) ингибирование заболевания, например остановку или замедление прогрессирования симптомов; или (2) снижение степени проявления заболевания,

например вызывание регрессии симптомов; и (3) предупреждение или снижение вероятности развития симптомов.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы усиления клинического ответа у субъекта, получающего терапию на основе CAR-T-клеток, где способ включает введение эффективного количества ингибитора NK-клеток субъекту, который получил или получает терапевтическое средство на основе CAR-T-клеток, которое содержит популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека, содержащих нарушенный комплекс МНС класса I.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы усиления клинического ответа у субъекта, получающего терапию на основе CAR-T-клеток, где способ включает введение субъекту терапевтического средства на основе CAR-T-клеток, которое содержит популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека, содержащих нарушенный комплекс МНС класса I, где субъект получил или получает эффективное количество ингибитора NK-клеток.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы усиления клинического ответа у субъекта, получающего терапию на основе CAR-T-клеток, где способ включает введение субъекту эффективного количества (a) терапевтического средства на основе CAR-T-клеток, которое содержит популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека, содержащих нарушенный комплекс МНС класса I; и (b) ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления усиление клинического ответа связано с терапией, включающей применение терапии на основе CAR-T-клеток в отдельности, или связано с терапией, включающей применение только ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления усиление клинического ответа является аддитивным или синергическим.

В некоторых вариантах осуществления клинический ответ представляет собой уменьшение объема опухоли или размера опухоли. В некоторых вариантах осуществления клинический ответ представляет собой ингибирование роста опухоли. В некоторых вариантах осуществления клинический ответ представляет собой уменьшение количества опухолевых клеток. В некоторых вариантах осуществления клинический ответ представляет собой период ремиссии. В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток усиливает клинический ответ у субъекта, получающего терапию на основе CAR-T-клеток, по сравнению с субъектом, получающим терапию на основе CAR-T-клеток в отсутствие ингибитора NK-клеток.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы усиления противоопухолевого ответа на терапию на основе CAR-T-клеток у субъекта путем введения ингибитора NK-клеток.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы усиления противоопухолевого ответа на терапию на основе CAR-T-клеток у субъекта, где способ включает введение субъекту терапевтического средства на основе CAR-T-клеток, которое содержит популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека, содержащих

нарушенный комплекс МНС класса I, где субъект получил или получает эффективное количество ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления усиление противоопухолевого ответа представляет собой увеличение количества цитотоксических молекул. В некоторых вариантах осуществления усиление противоопухолевого ответа представляет собой повышение активности гранзима В в опухолевых клетках или увеличение количеств опухолевых клеток или фракции опухолевых клеток, экспрессирующих гранзим В. В некоторых вариантах осуществления усиление противоопухолевого ответа представляет собой увеличение секреции цитокина IFN- γ иммунными клетками или сконструированными CAR-T-клетками человека. В некоторых вариантах осуществления усиление противоопухолевого ответа представляет собой увеличение уничтожения опухолевых клеток, опосредованного иммунными клетками или сконструированными CAR-T-клетками человека.

В некоторых вариантах осуществления усиление клинического ответа в виде эффективности терапии на основе CAR-T-клеток представляет собой повышение противоопухолевой активности, повышение степени сохраняемости сконструированных CAR-T-клеток, снижение клеточного лизиса сконструированных CAR-T-клеток или длительную ремиссию. В некоторых вариантах осуществления улучшение клинического исхода представляет собой увеличение общей выживаемости или выживаемости без прогрессирования заболевания, уменьшение времени получения терапии, увеличение максимального ответа на терапию, увеличение клинической эффективности (например, стабильное заболевание, частичный ответ или полный ответ на терапию), сокращение нежелательных явлений или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы улучшения сохраняемости сконструированных CAR-T-клеток человека у субъектов, получающих терапию на основе CAR-T-клеток, путем введения ингибитора NK-клеток.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы снижения активности NK-клеток у субъекта, получающего терапию на основе CAR-T-клеток, где способ включает введение субъекту терапевтического средства на основе CAR-T-клеток, которое содержит популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека, содержащих нарушенный комплекс МНС класса I, где субъект получил или получает эффективное количество ингибитора NK-клеток.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы снижения активности NK-клеток у субъекта, получающего терапию на основе CAR-T-клеток, где способ включает введение эффективного количества ингибитора NK-клеток субъекту, который получил или получает терапевтическое средство на основе CAR-T-клеток, которое содержит популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека, содержащих нарушенный комплекс МНС класса I.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы снижения активности NK-клеток у субъекта, где способ включает введение субъекту эффективного количества (a) ингибитора NK-клеток и (b) терапевтического средства на основе CAR-T-

клеток, которое содержит популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека, содержащих нарушенный комплекс MHC класса I.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток вводят перед введением сконструированных CAR-T-клеток человека. В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток вводят одновременно с введением сконструированных CAR-T-клеток человека. В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток вводят после введения сконструированных CAR-T-клетки человека. В некоторых вариантах осуществления сконструированные CAR-T-клетки человека вводят в комбинации с ингибитором NK-клеток, где сконструированные CAR-T-клетки человека вводят перед, одновременно с или после введения ингибитора NK-клеток.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят более одной дозы ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления начальную дозу ингибитора NK-клеток вводят субъекту перед, одновременно с или после введения терапевтического средства на основе CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления вводят по меньшей мере одну последующую дозу ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления один и тот же ингибитор NK-клеток вводят в начальной дозе и в последующей дозе. В некоторых вариантах осуществления различные ингибиторы NK-клеток вводят в начальной дозе и в последующей дозе(-ах). В некоторых вариантах осуществления последующую дозу ингибитора NK-клеток вводят, когда количества NK-клеток у субъекта восстанавливаются до приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% от количеств NK-клеток до введения ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления количества NK-клеток измеряют через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и/или 8 недель после введения ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления количества NK-клеток измеряют через 3, 4, 5, 6, 7, 8 и/или 12 месяцев после введения ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления количества NK-клеток измеряют через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и/или 8 недель после введения терапевтического средства на основе CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления последующая доза ингибитора NK-клеток поддерживает сохраняемость сконструированных T-клеток человека.

В. Введение генетически сконструированных CAR-T-клеток и ингибиторов NK-клеток

Любые из генетически сконструированных CAR-T-клеток, раскрытых в данном документе, можно применять совместно с любым из ингибиторов NK-клеток, также раскрытых в данном документе, в комбинированной терапии. Такие генетически сконструированные CAR-T-клетки и ингибиторы NK-клеток можно вводить субъекту, нуждающемуся в лечении, приемлемым путем, например путем внутривенной инфузии.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные T-клетки включают популяцию клеток, предусматривающую сконструированные T-клетки человека, содержащие: (i) ген TRAC, нарушенный посредством вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), обладающий аминокислотной

последовательностью, изложенной под SEQ ID NO 40; и (ii) нарушенный ген $\beta 2M$. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген TRAC предусматривает делецию нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген TRAC содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления менее 0,5% сконструированных Т-клеток экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления менее 30% сконструированных Т-клеток экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток экспрессируют поверхностный белок CAR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки человека являются аллогенными.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки включают популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки человека, содержащие: (i) ген TRAC, нарушенный посредством вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), обладающий аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO 76; и (ii) нарушенный ген $\beta 2M$. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген TRAC предусматривает делецию нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген TRAC содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 74. В некоторых вариантах осуществления менее 0,5% сконструированных Т-клеток экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления менее 30% сконструированных Т-клеток экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток экспрессируют поверхностный белок CAR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки человека являются аллогенными.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки включают популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки человека, содержащие: (i) ген TRAC, нарушенный посредством вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), обладающий аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO 86; и (ii) нарушенный ген $\beta 2M$. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген TRAC предусматривает делецию нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген TRAC содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 84. В

некоторых вариантах осуществления менее 0,5% сконструированных Т-клеток экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления менее 30% сконструированных Т-клеток экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток экспрессируют поверхностный белок CAR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки человека являются аллогенными.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки включают популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки человека, содержащие: (i) ген TRAC, нарушенный посредством вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), обладающий аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 115; и (ii) нарушенный ген $\beta 2M$. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген TRAC предусматривает делецию нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген TRAC содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 111. В некоторых вариантах осуществления менее 0,5% сконструированных Т-клеток экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления менее 30% сконструированных Т-клеток экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток экспрессируют поверхностный белок CAR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки человека являются аллогенными.

Комбинированная терапия, раскрытая в данном документе, может включать любые из указанных выше специфических генетически сконструированных CAR-Т-клеток и ингибитор НК-клеток, например, даратумумаб или его функциональный вариант.

Стадия проведения терапии на основе CAR-Т-клеток может включать размещение (например, трансплантацию) клеток, например сконструированных CAR-Т-клеток человека, в организме субъекта посредством способа или пути, который приводит к по меньшей мере частичной локализации введенных клеток в требуемом участке, таком как опухоль, таким образом, что достигается(ются) необходимый(ые) эффект(ы). Сконструированные Т-клетки можно вводить любым подходящим путем, который приводит к доставке в необходимое местоположение в организме субъекта, где по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остаются жизнеспособными. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может составлять от такого короткого, как от нескольких часов, например двадцати четырех часов, до нескольких дней, до такого длинного, как несколько лет или даже вся продолжительность жизни субъекта, т. е. при долговременном приживлении. Например, в некоторых аспектах, описанных в данном документе, эффективное количество

сконструированных Т-клеток вводят с помощью системного пути введения, такого как внутривенный или внутривенный путь.

Субъектом может являться любой субъект, для которого требуется лечение или терапия. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком.

В некоторых вариантах осуществления популяция сконструированных CAR-T-клеток человека и/или ингибитор NK-клеток, вводимые в соответствии с описанными в данном документе способами, не индуцируют токсичности у субъекта, например сконструированные CAR-T-клетки человека и/или ингибиторы NK-клеток не индуцируют токсичность в неопухолевых клетках. В некоторых вариантах осуществления вводимые популяция сконструированных CAR-T-клеток человека и/или ингибитор NK-клеток, не инициируют опосредованный комплементом лизис или не стимулирует антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC). В некоторых вариантах осуществления вводимые популяция сконструированных CAR-T-клеток человека и/или ингибитор NK-клеток не инициируют апоптоз. В некоторых вариантах осуществления вводимые популяция сконструированных CAR-T-клеток человека и/или ингибитор NK-клеток не инициируют ADCP.

"Эффективное количество" относится к количеству популяции сконструированных CAR-T-клеток человека и/или ингибитора NK-клеток, которое необходимо для предупреждения или облегчения по меньшей мере одного или нескольких признаков или симптомов патологического состояния (например, рака), и относится к количеству композиции, достаточному для обеспечения необходимого эффекта, например для лечения субъекта, имеющего патологическое состояние. Эффективное количество также включает количество, достаточное для предупреждения или задержки развития симптома заболевания, изменения хода развития симптома заболевания (например, без ограничения, замедления прогрессирования симптома заболевания) или устранения симптома заболевания. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество ингибитора NK-клеток относится к количеству, которое необходимо для предупреждения или облегчения опосредованного NK-клетками лизиса сконструированных CAR-T-клеток человека и/или активности NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество ингибитора NK-клеток относится к количеству, которое необходимо для обеспечения сохраняемости сконструированных CAR-T-клеток человека.

Понятно, что для любого данного случая подходящее эффективное количество может быть определено специалистом в данной области посредством проведения стандартных экспериментов.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-T-клетки человека) в дозе, составляющей приблизительно 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 или 1×10^9 сконструированных Т-клеток, экспрессирующих описанный в данном

документе CAR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека), в дозе, составляющей приблизительно 1×10^7 , 3×10^7 , 1×10^8 , 3×10^8 или 1×10^9 сконструированных Т-клеток, экспрессирующих описанный в данном документе CAR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки (например, сконструированные Т-клетки человека), в дозе, составляющей приблизительно 3×10^7 , 1×10^8 или 3×10^8 сконструированных Т-клеток, экспрессирующих описанный в данном документе CAR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека) в дозе, составляющей приблизительно 1×10^7 - 3×10^8 сконструированных Т-клеток, экспрессирующих описанный в данном документе CAR на обнаруживаемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека) в дозе, составляющей приблизительно 1×10^7 сконструированных Т-клеток, экспрессирующих описанный в данном документе CAR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека) в дозе, составляющей приблизительно 3×10^7 сконструированных Т-клеток, экспрессирующих описанный в данном документе CAR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека) в дозе, составляющей приблизительно 1×10^8 сконструированных Т-клеток, экспрессирующих описанный в данном документе CAR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки (например, сконструированные Т-клетки человека) в дозе, составляющей приблизительно 3×10^8 сконструированных Т-клеток, экспрессирующих описанный в данном документе CAR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки (например, сконструированные Т-клетки человека) в дозе, составляющей приблизительно 1×10^9 сконструированных Т-клеток, экспрессирующих описанный в данном документе CAR на обнаруживаемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят клетки в дозе, составляющей приблизительно 1×10^7 сконструированных CAR-Т-клеток человека, экспрессирующих CAR (например, антиген-связывающий домен к CD19, CD33, CD70 или ВСМА) на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят клетки в дозе, составляющей приблизительно 3×10^7 сконструированных CAR-Т-

клеток человека, экспрессирующих CAR (например, антиген-связывающий домен к CD19, CD33, CD70 или BCMA) на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят клетки в дозе, составляющей приблизительно 1×10^8 сконструированных CAR-T-клеток человека, экспрессирующих CAR (например, антиген-связывающий домен к CD19, CD33, CD70 или BCMA) на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят клетки в дозе, составляющей приблизительно 3×10^8 сконструированных CAR-T-клеток человека, экспрессирующих CAR (например, антиген-связывающий домен к CD19, CD33, CD70 или BCMA) на обнаруживаемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления клетки получают от одного или нескольких доноров. В некоторых примерах, описанных в данном документе, увеличивают количество клеток в культуре перед введением субъекту, нуждающемуся в этом.

Способы введения сконструированных CAR-T-клеток человека и/или ингибиторов NK-клеток включают инъекцию и инфузию. Инъекция включает без ограничения внутривенную, интратекальную, внутрибрюшинную, интраспинальную, интрацереброспинальную и внутригрудинную инфузию. В некоторых вариантах осуществления путь является внутривенным.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные CAR-T-клетки человека и/или ингибиторы NK-клеток вводят системно, что относится к введению, отличному от введения непосредственно в целевые участок, ткань или орган, таким образом, что вместо этого они попадают в систему кровообращения субъекта и, следовательно, подвергаются метаболизму и другим подобным процессам.

С. Целевые виды рака

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы лечения рака (например, видов лейкоза, например острого миелоидного лейкоза). В некоторых вариантах осуществления способы включают доставку терапевтического средства на основе CAR-T-клеток, описанных в данном документе, субъекту (например, пациенту-человеку), характеризующемуся наличием рака.

Неограничивающие примеры видов рака, которые можно лечить, как предусмотрено в данном документе, включают множественную миелому, лейкоз и/или светлоклеточную почечно-клеточную карциному (ccRCC). Неограничивающие примеры видов лейкоза, которые можно лечить, как предусмотрено в настоящем документе, включают Т-клеточный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лимфому Ходжкина, Т-клеточную лимфому, неходжкинские лимфомы (например, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), высокозлокачественную В-клеточную лимфому, трансформированную фолликулярную лимфому (FL), FL степени 3В и трансформацию CLL по Рихтеру) и острый лимфобластный лейкоз (ALL). В некотором варианте осуществления способы предусматривают доставку CAR-T-клеток (например, CAR-T-клеток к BCMA, к CD19, к CD33 и/или к CD70) в соответствии с настоящим изобретением субъекту с множественной миеломой, лейкозом или лимфомой. Другие

неограничивающие примеры видов рака (например, солидных опухолей), которые можно лечить, как предусмотрено в данном документе, включают рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичника, рак шейки матки, рак молочной железы, рак почки, рак щитовидной железы, носоглоточный рак, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), глиобластому и/или меланому.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения неходжкинской лимфомы (NHL) у пациента-человека посредством введения внутривенной дозы, составляющей приблизительно 1×10^7 - 3×10^8 или приблизительно 1×10^7 - 1×10^9 сконструированных Т-клеток человека, экспрессирующих описанный в данном документе CAR на обнаруживаемом уровне (например, CAR к CD19). В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения неходжкинской лимфомы (NHL) у пациента-человека посредством введения внутривенной дозы, составляющей приблизительно 3×10^7 сконструированных Т-клеток человека, экспрессирующих описанный в данном документе CAR на обнаруживаемом уровне (например, CAR к CD19). В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения неходжкинской лимфомы (NHL) у пациента-человека посредством введения внутривенной дозы, составляющей приблизительно 1×10^8 сконструированных Т-клеток человека, экспрессирующих описанный в данном документе CAR на обнаруживаемом уровне (например, CAR к CD19). В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения неходжкинской лимфомы (NHL) у пациента-человека посредством введения внутривенной дозы, составляющей приблизительно 3×10^8 сконструированных Т-клеток человека, экспрессирующих описанный в данном документе CAR на обнаруживаемом уровне (например, CAR к CD19). В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения неходжкинской лимфомы (NHL) у пациента-человека посредством введения внутривенной дозы, составляющей приблизительно 1×10^9 сконструированных Т-клеток человека, экспрессирующих описанный в данном документе CAR на обнаруживаемом уровне (например, CAR к CD19).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения неходжкинской лимфомы (NHL) у пациента-человека посредством внутривенного введения клеток в дозе, составляющей приблизительно 1×10^7 - 3×10^8 , или в дозе, составляющей приблизительно 1×10^7 - 1×10^9 сконструированных CAR-Т-клеток человека, экспрессирующих CAR к CD19 на обнаруживаемом уровне, в комбинации с любым из ингибиторов NK, раскрытых в данном документе, таких как даратумумаб.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения множественной миеломы (MM) у пациента-человека посредством внутривенного введения клеток в дозе, составляющей приблизительно $2,5 \times 10^7$ - $4,5 \times 10^8$ сконструированных CAR-Т-клеток человека, экспрессирующих CAR к BCMA на обнаруживаемом уровне, в комбинации с даратумумабом.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения солидной опухоли, такой как почечно-клеточная карцинома или Т-клеточная или В-клеточная злокачественная опухоль, у пациента-человека посредством внутривенного введения клеток в дозе, составляющей приблизительно $1,0 \times 10^7 - 1 \times 10^9$ сконструированных CAR-T-клеток человека, экспрессирующих CAR к CD70 на обнаруживаемом уровне, в комбинации с даратумумабом.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрены способы введения субъекту популяции клеток или сконструированных CAR-T-клеток, описанных в данном документе. В некоторых аспектах сконструированные Т-клетки представляют собой сконструированные Т-клетки человека. В некоторых аспектах у субъекта имеется рак. В некоторых аспектах рак характеризуется экспрессией CD70, BMCA, CD19, CD33 или их комбинаций. В некоторых аспектах популяцию клеток вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения рака. В некоторых аспектах рак представляет собой солидную злокачественную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль. В некоторых аспектах солидная злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из опухоли яичника, опухоли поджелудочной железы, опухоли почки, опухоли легкого и опухоли желудочно-кишечного тракта. В некоторых аспектах популяцию клеток вводят субъекту в количестве, эффективном для уменьшения объема опухоли или количества опухолевых клеток у субъекта.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту популяции клеток или сконструированных CAR-T-клеток человека, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления популяция сконструированных CAR-T-клеток человека, вводимая согласно способам, описанным в данном документе, содержит аллогенные Т-клетки, полученные от одного или нескольких доноров. Термин "аллогенный" означает клетку, популяцию клеток или биологические образцы, содержащие клетки, полученные от одного или нескольких разных доноров из одного и того же вида, в которых гены в одном или нескольких локусах не являются идентичными генам реципиента. Например, популяцию сконструированных CAR-T-клеток, вводимую субъекту, можно получать из Т-клеток от одного или нескольких неродственных доноров или от одного или нескольких неидентичных сиблингов. В некоторых вариантах осуществления можно применять популяции сингенных клеток, такие как популяции, полученные от генетически идентичных доноров (например, идентичных близнецов).

В некоторых вариантах осуществления сконструированные CAR-T-клетки человека являются аллогенными. В некоторых вариантах осуществления сконструированные CAR-T-клетки человека вводят в виде аллогенного трансплантата.

D. Снижение токсичности терапии на основе CAR-T-клеток

Считается, что риск рецидива опухоли при терапии на основе CAR-T-клеток, целенаправленно воздействующей на опухоль, отчасти связан с ограниченной сохраняемостью CAR-T-клеток у субъекта после введения (Maude, S., et al. (2014) N Engl J

Med. 371:1507-1517; Turtle, C. et al., (2016) J Clin Invest. 126:2123-2138). Комбинированная терапия, раскрытая в данном документе, также направлена на снижение токсичности, связанной с терапией на основе CAR-T-клеток. Примеры включают патологический процесс "хозяин против трансплантата" (HvGD) и патологический процесс "трансплантат против хозяина" (GvHD).

(i) Патологический процесс "хозяин против трансплантата" (HvGD)

В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, обладают длительной сохраняемостью вследствие сниженной или минимальной реакции "хозяин против трансплантата" (HvG). Реакция HvG определяется как функциональное и структурное разрушение аллогенного трансплантата (например, аллогенной донорской Т-клетки) вследствие активного иммунного ответа реципиента. Источником реакции HvG являются антигены на аллогенной донорской клетке, которые активируют иммунную систему хозяина. Аллогенные антигены главного комплекса гистосовместимости (например, называемые лейкоцитарными антигенами человека или HLA у людей), экспрессируемые донорской клеткой, являются сильными индукторами реакции HvG (Ingulli, E. (2010) *Pediatr Nephrol.*, 25:61-74; Alelign, T. et al., (2018) *J Immunol Research Article ID 5986740*). Примерно 1-10% Т-клеток у субъекта экспрессируют TCR, который может распознавать аллогенные комплексы HLA. Распознавание может являться непосредственным, где Т-клетка хозяина экспрессирует TCR, который непосредственно распознает аллогенную молекулу HLA, присутствующую на донорской клетке. Распознавание может являться опосредованным, где донорская клетка сначала интернализуется и процессируется антигенпредставляющей клеткой хозяина (APC), а Т-клетка хозяина распознает аллогенную молекулу HLA, которую презентует APC хозяина в пептидной форме. Т-клетки хозяина, которые распознают аллогенные антигены на донорских клетках и активируются, инициируют реакцию HvG. Удаление аллогенных антигенов из донорской клетки до трансплантации может устранить или снизить риск реакции HvG, тем самым увеличивая сохраняемость после введения.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека по настоящему изобретению конструируют, применяя редактирование гена с помощью CRISPR-Cas9, с индукцией сайт-специфического нарушения последовательности гена-мишени, которое устраняет экспрессию аллогенного антигена. В некоторых вариантах осуществления аллогенный антиген представляет собой антиген главного комплекса гистосовместимости. В некоторых вариантах осуществления антиген главного комплекса гистосовместимости представляет собой комплекс MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления последовательность гена-мишени находится в гене B2M, который кодирует белковый компонент комплекса MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления генетическое нарушение устраняет или снижает риск реакции "хозяин против сконструированной CAR-T-клетки" и обеспечивает повышение степени сохраняемости сконструированных Т-клеток после введения реципиенту.

В некоторых вариантах осуществления сохраняемость сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-T-клеток человека) оценивают путем анализа присутствия и количества сконструированных CAR-T-клеток человека, присутствующих в одном или нескольких образцах тканей, взятых у субъекта после введения сконструированных CAR-T-клеток человека. В некоторых вариантах осуществления сохраняемость определяют как наибольшую продолжительность времени от момента введения до момента времени, когда сконструированные Т-клетки присутствуют в данном типе ткани на обнаруживаемом уровне (например, в периферической крови).

В некоторых вариантах осуществления сохраняемость определяют как продолжающееся отсутствие заболевания (например, полный или частичный ответ). Определение отсутствия заболевания и ответа на лечение известно специалистам в данной области и описано в данном документе.

Способы сбора, подготовки и хранения соответствующей ткани известны специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления сохраняемость сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-T-клеток человека) оценивают в одном или нескольких образцах ткани из группы, состоящей из периферической крови, спинномозговой жидкости, опухоли, кожи, кости, костного мозга, молочной железы, почки, печени, легких, лимфатического узла, селезенки, желудочно-кишечного тракта, миндалин, вилочковой железы и предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления количество сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-T-клеток человека) измеряют в образце ткани одного типа (например, периферической крови). В некоторых вариантах осуществления количество сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-T-клеток человека) измеряют в нескольких типах тканей (например, периферической крови в дополнение к костному мозгу и спинномозговой жидкости). Путем измерения количества сконструированных CAR-T-клеток в нескольких типах тканей можно определить распределение сконструированных CAR-T-клеток человека в различных тканях организма. В некоторых вариантах осуществления количество сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-T-клеток человека) измеряют в одном или нескольких образцах ткани в один момент времени после введения. В некоторых вариантах осуществления количество сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-T-клеток человека) измеряют в одном или нескольких образцах ткани в несколько моментов времени после введения. В некоторых вариантах осуществления количество сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-T-клеток человека), присутствующих в одном или нескольких образцах ткани в течение времени после введения, сравнивают с образцом того же типа ткани, взятым у пациента перед введением.

Обнаруживаемый уровень сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-T-клеток человека) в определенной ткани можно измерить с помощью известных методологий. Способы оценки присутствия или количества

сконструированных Т-клеток в представляющей интерес ткани известны специалистам в данной области. Такие способы включают без ограничения полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (RT-PCR), конкурентную RT-PCR, RT-PCR в режиме реального времени, анализ защиты от РНКазы (RPA), количественную иммунофлуоресценцию (QIF), проточную цитометрию, нозерн-блоттинг, микроматрицу нуклеиновых кислот с использованием ДНК, вестерн-блоттинг, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA), иммунное окрашивание тканей, анализ иммунопреципитации, анализ фиксации комплемента, сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS), масс-спектрометрию, иммунопреципитацию на магнитных гранулах с использованием антител или белковый чип.

В контексте данного документа в некоторых вариантах осуществления сохраняемость представляет собой самый продолжительный период от времени введения до момента времени, когда измеряют обнаруживаемый уровень сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека). В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемый уровень сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека) определяют как предел обнаружения способа анализа. Предел обнаружения можно определить как наименьшее количество компонента или вещества, которое можно надежно и воспроизводимо измерить с помощью аналитической методики, по сравнению с образцом ткани, который, как ожидается, не содержит количества представляющего интерес компонента или вещества. Неограничивающим иллюстративным способом определения воспроизводимого предела обнаружения является измерение аналитического сигнала нулевого калибратора относительно холостой пробы в повторностях (Armbruster, D. et al. (2008) Clin Biochem Rev. 29:S49-S52). Известно, что холостая проба не содержит представляющего интерес аналита. Нулевой калибратор представляет собой максимальное разведение исследуемого образца известной концентрации или количества, которое обеспечивает аналитический сигнал, превышающий сигнал, измеренный для холостой пробы. Путем количественного определения аналитического сигнала в по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 повторностях нулевого калибратора можно определить среднее значение и стандартное отклонение (SD) для предела обнаружения представляющего интерес аналитического способа. Специалист в данной области может обеспечить выбор способа с подходящим пределом обнаружения для количественной оценки сконструированных Т-клеток в определенной ткани. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемый уровень сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека) представляет собой любое количество сконструированных Т-клеток в образце ткани, которое обеспечивает аналитический сигнал, превышающий предел обнаружения для способа анализа. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемый уровень сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека) представляет собой любое

количество сконструированных Т-клеток в образце ткани, которое обеспечивает аналитический сигнал, который на по меньшей мере 2 SD, 3 SD, 4 SD, 5 SD, 6 SD, 7 SD, 8 SD, 9 SD или 10 SD превышает предел обнаружения для данного способа анализа.

Известно, что сконструированные Т-клетки, экспрессирующие CAR, могут размножаться после введения реципиенту. Размножение является ответом на распознавание антигена и активацию сигнала (Savoldo, B. et al. (2011) *J Clin Invest.* 121:1822; van der Stegen, S. et al. (2015) *Nat Rev Drug Discov.* 14:499-509). В некоторых вариантах осуществления после размножения сконструированные Т-клетки претерпевают период сокращения количества, при котором часть популяции сконструированных Т-клеток, которая представляет собой короткоживущие эффекторные клетки, удаляется, а то, что остается, является частью популяции сконструированных Т-клеток, которая представляет собой долгоживущие клетки памяти. В некоторых вариантах осуществления сохраняемость является мерой продолжительности жизни популяции сконструированных Т-клеток после размножения и сокращения количества. Продолжительность фаз размножения, сокращения количества и сохраняемости оценивают с использованием фармакокинетического профиля. В некоторых вариантах осуществления фармакокинетический (PK) профиль представляет собой описание количества сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека), измеренного в определенной ткани с течением времени, и легко устанавливается специалистом в данной области путем измерения количества сконструированных Т-клеток в определенной ткани (например, периферической крови) в нескольких временных точках. В некоторых вариантах осуществления измерение PK профиля предусматривает способ оценки субъекта. В некоторых вариантах осуществления измерение PK профиля предусматривает способ оценки или мониторинга эффективности терапии на основе сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека) у субъекта, характеризующегося наличием рака. В некоторых вариантах осуществления измерение PK профиля предусматривает способ оценки сохраняемости сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления PK профиль предусматривает способ оценки размножения сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления показатель сохраняемости сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека) у субъекта применяют для оценки эффективности терапии на основе сконструированных Т-клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления показатель размножения сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека) у субъекта применяют для оценки эффективности терапии на основе сконструированных Т-клеток у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления PK профиль получают путем измерения количества сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека) в образце определенного типа ткани (например, периферической крови), взятом

у реципиента, и повторения оценки в разные моменты времени. В некоторых вариантах осуществления исходный образец ткани берут у реципиента за не более чем 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней или 15 дней до введения. В некоторых вариантах осуществления взятие ткани у реципиента осуществляют в пределах 0,25-2 часов, в пределах 1-3 часов, в пределах 2-6 часов, в пределах 3-11 часов, в пределах 4-20 часов, в пределах 5-48 часов с момента введения сконструированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления взятие ткани у реципиента осуществляют ежедневно, начиная в день 1, день 2, день 3 или день 4, и продолжая по по меньшей мере день 5, день 6, день 7, день 8, день 9, день 10, день 11, день 12, день 13, день 14, день 15, день 16, день 17, день 18, день 19 или день 20. В некоторых вариантах осуществления взятие ткани у реципиента осуществляют по меньшей мере 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 6 раз в неделю в течение 1 недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель или 16 недель после введения сконструированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления взятие ткани у реципиента осуществляют по меньшей мере 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 6 раз в месяц в течение 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 13 месяцев, 14 месяцев, 15 месяцев, 16 месяцев, 17 месяцев, 18 месяцев, 19 месяцев, 20 месяцев, 21 месяца, 22 месяцев, 23 месяцев или 24 месяцев после введения сконструированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления взятие ткани у реципиента осуществляют по меньшей мере 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 6 раз в год в течение 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет, 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет или 10 лет после введения сконструированных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления сохраняемость сконструированных Т-клеток определяют как продолжительность времени от момента введения, в течение которого присутствует количество сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека), которое составляет по меньшей мере 0,005-0,05%, 0,01-0,1%, 0,05-0,5%, 0,1-1%, 0,5%-5% или 1-10% от пикового количества сконструированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления сохраняемость сконструированных Т-клеток определяют путем сравнения количества сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека), измеренного в определенном типе ткани (например, периферической крови), с пиковым количеством сконструированных Т-клеток, которое измеряют в том же типе ткани. В некоторых вариантах осуществления сохраняемость сконструированных Т-клеток определяют путем сравнения количества сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека), измеренного в определенном типе ткани (например, периферической крови), с пиковым количеством сконструированных Т-клеток, которое измеряют в другом типе ткани. В некоторых вариантах осуществления сохраняемость сконструированных Т-клеток определяют путем сравнения количества

сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-T-клеток человека), измеренного у определенного субъекта (например, в периферической крови), с пиковым количеством сконструированных Т-клеток, которое измеряют у того же субъекта. В некоторых вариантах осуществления сохраняемость сконструированных Т-клеток определяют путем сравнения количества сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-T-клеток человека), измеренного у определенного субъекта (например, в периферической крови), с пиковым количеством сконструированных Т-клеток, которое измеряют у другого субъекта (например, у субъекта с частичным ответом, у субъекта с полным ответом).

В некоторых вариантах осуществления сохраняемость сконструированных Т-клеток наблюдают в одном или нескольких типах тканей (например, периферической крови) после введения, когда сконструированные Т-клетки (например, сконструированные Т-клетки человека, экспрессирующие CAR) вводят в день 1. В некоторых вариантах осуществления сохраняемость сконструированных Т-клеток наблюдают в одном или нескольких типах тканей (например, периферической крови) до 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4, дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 21 дня, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 дня, 32 дней, 33 дней, 34 дней или 35 дней после введения, когда сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-T-клетки человека) вводят в день 1. В некоторых вариантах осуществления сохраняемость сконструированных Т-клеток наблюдают в одном или нескольких типах тканей (например, периферической крови) до 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 13 месяцев, 14 месяцев, 15 месяцев, 16 месяцев, 17 месяцев, 18 месяцев, 19 месяцев, 20 месяцев, 21 месяца, 21 месяца, 22 месяцев, 23 месяцев или 24 месяцев после введения сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-T-клеток человека). В некоторых вариантах осуществления сохраняемость сконструированных Т-клеток измеряют в одном или нескольких типах тканей (например, периферической крови) до 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет, 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет и 10 лет после введения сконструированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления сохраняемость сконструированных Т-клеток, которая составляет по меньшей мере 10-25 дней, по меньшей мере 25-50 дней, по меньшей мере 50-100 дней, по меньшей мере 100-364 дня, по меньшей мере один год, по меньшей мере два года, по меньшей мере три года, по меньшей мере четыре года или по меньшей мере пять лет с момента введения, когда сконструированные Т-клетки вводят в день 1, указывает на ответ реципиента (например, полный ответ или частичный ответ).

В некоторых вариантах осуществления площадь под кривой (AUC) определяют как общую площадь под кривой количества сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-T-клеток человека), измеренного с течением времени в определенном типе ткани (например, периферической крови). Способ вычисления AUC

известен специалистам в данной области и состоит из аппроксимации AUC серией трапеций, вычисления площади трапеций и суммирования площади трапеций для определения AUC. В некоторых вариантах осуществления AUC определяют для РК профиля, где количество сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-T-клеток человека) измеряют для определенного типа ткани с течением времени. В некоторых вариантах осуществления AUC определяют для РК профиля от одного обозначенного момента времени до другого обозначенного момента времени (т. е. AUC₁₀₋₈₀ относится к общей площади под кривой количества-времени, изображающей количество с дня 10 по день 80 после введения). В некоторых вариантах осуществления AUC определяют для предварительно выбранного периода времени, продолжающегося от времени введения (например, дня 1) до времени, заканчивающегося в день, который находится в пределах 10-20 дней, 15-45 дней, 20-70 дней, 25-100 дней или 40-180 дней после введения. В некоторых вариантах осуществления AUC, измеренная для РК профиля у реципиента, указывает на ответ реципиента (например, CR или PR). В некоторых вариантах осуществления AUC, измеренная для РК профиля у реципиента, указывает на риск рецидива у реципиента.

(ii) Патологический процесс "трансплантат против хозяина" (GvHD)

В большинстве разработанных на сегодняшний день вариантов терапии на основе CAR-T-клеток применяют аутологичные CAR-T-клетки (т.е., CAR-T-клетки, полученные путем генетической модификации собственных Т-клеток пациента). Применение аллогенных CAR-T-клеток (т. е. CAR-T-клеток, полученных путем генетической модификации Т-клеток от генетически несходного донора-человека) несет в себе риск индукции патологического процесса "трансплантат против хозяина" (GvHD), поскольку донорские Т-клетки экспрессируют Т-клеточные рецепторы (TCR), которые потенциально могут реагировать на тканевые антигены хозяина и/или антигены гистосовместимости, известные как лейкоцитарные антигены человека или HLA у людей. GvHD представляет собой синдром, который возникает после трансплантации аллогенных клеток, когда иммунокомпетентные донорские клетки (трансплантат) распознают и атакуют ткани аллогенного реципиента с ослабленным иммунитетом (хозяина) (Barnes, D. et al., (1962) Ann NY Acad. Sci. 99:374-385; Billingham, R. (1966) Harvey Lect. 62:21-78). Существенные клинические доказательства особо отмечают риск GvHD вследствие введения аллогенных трансплантатов Т-клеток, особенно при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

HSCT вводят как часть схемы терапии пациентам, страдающим рефрактерными гематологическими злокачественными новообразованиями, такими как лейкоз или лимфома. Существенным терапевтическим эффектом аллогенных HSCT (т. е. HSCT от индивидуума, генетически не идентичного пациенту-хозяину) является эффект "трансплантат против опухоли" (GVT). Донорские Т-клетки, вводимые в трансплантате HSCT, являются основным медиатором эффекта GVT, поскольку некоторые из них распознают опухолевые антигены и аллогенные антигены HLA на опухолевых клетках как

чужеродные и уничтожают опухолевые клетки (Kolb, H. (2008) *Blood* 112:4371-4383). Однако трансплантированные донорские Т-клетки также обладают потенциалом инициировать GvHD путем распознавания HLA хозяина как чужеродные и реагируя путем причинения повреждений тканям в таких органах, как кожа, кишечник, печень и легкие. Удаление Т-клеток из препарата HSCT перед трансплантацией может значительно снизить степень проявления явления GvHD, но при этом заметно повышается риск рецидива опухоли и несостоятельности трансплантата (Apperley, J. et al. (1988) *Br J Haematol.* 69:239-245; Martin, P. et al., (1985) *Blood* 66:664-672; Patterson, J. et al. (1986) *Br J Haematol.* 63:221-230). Таким образом, трансплантация сконструированных аллогенных Т-клеток (например, сконструированных Т-клеток человека, экспрессирующих CAR к CD19, к CD33, к CD70 или к BCMA) имеет как положительные, так и отрицательные исходы: трансплантированные реактивные в отношении хозяина Т-клетки будут способствовать положительным эффектам GVT, но также вызывать деструкцию здоровых тканей, что приведет к GvHD.

Варианты терапии на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR) обеспечивают существенное улучшение в отношении применения экзогенно вводимых Т-клеток для индукции эффектов GVT. CAR обеспечивают получение модифицированных Т-клеток с высокой аффинностью распознавания опухолевых антигенов, но не требующих HLA-презентации антигена. Дополнительно, CAR обеспечивает костимулирующие компоненты, которые способствуют активации Т-клеток при распознавании антигена (Sadelain M., et al. (2013) *Cancer Discov.* 3:388-398; Davila M., et al. (2012) *Oncoimmunology* 1:1577-1583). Однако большинство продуктов на основе CAR-Т-клеток получают из смешанной популяции клонов Т-клеток, которые сохраняют экспрессию TCR и, таким образом, несут риск индуцирования GvHD при введении хозяину, который генетически не идентичен донору. Во избежание риска индуцирования GvHD, в большинстве разработанных на сегодняшний день вариантов терапии на основе CAR-Т-клеток применяют аутологичные Т-клетки, так что TCR, экспрессируемый CAR-Т-клеткой, не реагирует на антигены хозяина (Maude, S. et al. (2014) *N Engl J Med.* 371:1507-1517; Neelapu, S. et al. (2017) *N Engl J Med.* 377:2531-2544; Schuster, S. et al. (2017) *N Engl J Med.* 377:2545-2554). Однако получение аутологичных CAR-Т-клеток является дорогостоящим и требует много времени, в результате чего у некоторых пациентов наблюдается прогрессирование заболевания или летальный исход в ожидании лечения.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к введению популяции сконструированных Т-клеток (например, CAR-Т-клеток) с нарушенными TCR и MHC, тем самым снижая риск GvHD у пациента-реципиента. В некоторых вариантах осуществления компоненты редактирования генов с участием CRISPR-Cas9 применяют для введения сайт-специфического нарушения последовательности гена, которая связана с GvHD, такой как TCR и/или MHC. В некоторых вариантах осуществления последовательность гена выбирают из компонента TCR. В некоторых вариантах осуществления компонент TCR представляет собой TRAC. В

некоторых вариантах осуществления сайт-специфическое нарушение представляет собой необратимую делецию по меньшей мере части гена. В некоторых вариантах осуществления сайт-специфическое нарушение представляет собой небольшую делецию в гене. В некоторых вариантах осуществления сайт-специфическое нарушение представляет собой небольшую вставку в ген. В некоторых вариантах осуществления сайт-специфическое нарушение представляет собой вставку нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в ген. В некоторых вариантах осуществления сайт-специфическое нарушение гена TRAC обеспечивает получение Т-клетки без функционирующего TCR. В некоторых вариантах осуществления сайт-специфическое нарушение локуса TRAC снижает или устраняет способность Т-клеток индуцировать GvHD у аллогенного реципиента. В некоторых вариантах осуществления сайт-специфическое нарушение TRAC снижает риск GvHD после введения субъекту аллогенных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к введению популяции клеток, предусматривающей сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека) с пониженным риском индукции GvHD у пациента-реципиента. В некоторых вариантах осуществления компоненты редактирования генов с участием CRISPR-Cas9 применяют для введения сайт-специфического нарушения в локус TRAC. В некоторых вариантах осуществления сайт-специфическое нарушение в локусе TRAC представляет собой вставку нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в ген. В некоторых вариантах осуществления сайт-специфическое нарушение в локусе TRAC обеспечивает получение популяции сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека), где по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 100% донорских Т-клеток не экспрессируют функциональный TCR. В некоторых вариантах осуществления сайт-специфическое нарушение в локусе TRAC обеспечивает получение сконструированных Т-клеток, где по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 100% сконструированных Т-клеток не экспрессируют функциональный TCR. В некоторых вариантах осуществления сайт-специфическое нарушение в локусе TRAC и стадия очистки обеспечивают получение популяции клеток сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека), где по меньшей мере 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5% или 100% сконструированных Т-клеток не экспрессируют функциональный TCR. В некоторых вариантах осуществления сайт-специфическое нарушение в локусе TRAC и стадия очистки обеспечивают получение сконструированных Т-клеток, где по меньшей мере 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5% или 100% сконструированных Т-клеток не экспрессируют функциональный TCR. В некоторых вариантах осуществления введение популяции сконструированных Т-клеток, где по меньшей мере 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5% или 100% сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека) не экспрессируют функциональный TCR, снижает риск GvHD после введения пациенту-реципиенту. В некоторых вариантах осуществления введение сконструированных Т-клеток, где по

меньшей мере 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5% или 100% сконструированных Т-клеток не экспрессируют функциональный TCR, снижает риск GvHD после введения пациенту-реципиенту.

Клинически GvHD подразделяют на острый, хронический и перекрестный синдромы на основе клинических проявлений и времени возникновения относительно введения аллогенных донорских клеток. В некоторых вариантах осуществления введение популяции клеток, предусматривающей сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека), связано со снижением риска острой GvHD (aGvHD) у реципиента. В некоторых вариантах осуществления введение сконструированных Т-клеток связано со снижением риска острой GvHD (aGvHD) у реципиента. В некоторых вариантах осуществления введение популяции клеток, предусматривающей сконструированные Т-клетки (например, сконструированные Т-клетки человека, экспрессирующие CAR), связано со снижением риска хронической GvHD у реципиента. В некоторых вариантах осуществления введение сконструированных Т-клеток связано со снижением риска хронической GvHD у реципиента. У пациентов, у которых развивается aGvHD, симптомы могут включать макулопапулезную сыпь; гипербилирубинемия с желтухой вследствие поражения мелких желчных протоков, приводящую к холестазу; тошноту, рвоту и анорексию; водянистую или кровавую диарею и схваткообразную боль в животе (Zeiser, R. et al. (2017) *N Engl J Med* 377:2167-2179). Тяжесть aGvHD основана на клинических проявлениях и легко оценивается специалистом в данной области с использованием общепринятых параметров классификации, определенных, например, в **таблице 4**.

В некоторых вариантах осуществления введение популяции клеток, предусматривающей сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека, экспрессирующие CAR), обуславливает сниженную или легкую aGvHD. В некоторых вариантах осуществления сниженная или легкая aGvHD представляет собой aGvHD ниже клинической степени 2, ниже клинической степени 1 или степени 0. В некоторых вариантах осуществления сниженная или легкая aGvHD представляет собой aGvH ниже клинической степени 2. В некоторых вариантах осуществления сниженная или легкая aGvHD представляет собой aGvH ниже клинической степени 1. В некоторых вариантах осуществления сниженная или легкая aGvHD представляет собой aGvH клинической степени 0.

В некоторых вариантах осуществления введение популяции клеток, предусматривающей сконструированные Т-клетки по настоящему изобретению (например, сконструированные Т-клетки человека, экспрессирующие CAR), приводит к небольшому количеству случаев aGvHD или их отсутствию (например, ни один субъект не испытывает клинически значимой (например, степени 2-4) aGvHD или ее симптомов после введения популяции сконструированных Т-клеток по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления введение сконструированных Т-клеток приводит к небольшому количеству случаев aGvHD или их отсутствию (например, ни один субъект

не испытывает клинически значимой (например, степени 2-4) aGvHD или ее симптомов после введения сконструированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления введение популяции клеток, предусматривающей сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека) по настоящему изобретению связано с частичным возникновением случаев aGvHD, где менее 1%, менее 2%, менее 3%, менее 4%, менее 5%, менее 6%, менее 7%, менее 8%, менее 9%, менее 10%, менее 11%, менее 12%, менее 13%, менее 14%, менее 15%, менее 16%, менее 17% или менее 18% субъектов испытывают клинически значимые (например, степени 2-4) симптомы aGvHD после введения. В некоторых вариантах осуществления введение сконструированных Т-клеток связано с частичным возникновением случаев aGvHD, где менее 1%, менее 2%, менее 3%, менее 4%, менее 5%, менее 6%, менее 7%, менее 8%, менее 9%, менее 10%, менее 11%, менее 12%, менее 13%, менее 14%, менее 15%, менее 16%, менее 17% или менее 18% субъектов испытывают клинически значимые (например, степени 2-4) симптомы aGvHD после введения.

Таблица 4.

Стадия	Кожа (только активная эритема)	Печень (уровень билирубина)	Верхние отделы желудочно-кишечного тракта (GI)	Нижние отделы GI (количество кала/день)
0	Отсутствие активной (эритематозной) сыпи при GvHD	< 2 мг/дл	Отсутствие тошноты, рвоты или анорексии или их периодический характер	< 500 мл/день или < 3 эпизодов/день
1	Макулопапулезная сыпь < 2% площади поверхности тела (BSA)	2-3 мг/дл	Постоянная тошнота, рвота или анорексия	500-999 мл/день или 3-4 эпизодов/день
2	Макулопапулезная сыпь 25-50% BSA	3,1-6 мг/дл	-	1000-1500 мл/день или 5-7 эпизодов/день
3	Генерализованная макулопапулезная сыпь (> 50% BSA)	6,1-15 мг/дл	-	> 1500 мл/день или > 7 эпизодов/день

	Генерализованная эритродермия (> 50% BSA)			Сильная боль в животе с кишечной непроходимостью или без нее или в значительной степени
4	совместно с буллезным образованием и шелушением > 5% BSA	>15 мг/дл	-	кровянистый кал (независимо от объема кала)

Общая клиническая степень (на основе наиболее тяжелого поражения целевых органов):

степень 0: отсутствие поражения 1-4 стадии любого органа;

степень 1: поражение 1-2 стадии без вовлечения печени, верхних отделов GI или нижних отделов GI;

степень 2: сыпь 3 стадии и/или поражение печени 1 стадии, и/или поражение верхних отделов GI 1 стадии, и/или поражение нижних отделов GI 1 стадии;

степень 3: поражение печени 2-3 стадии и/или поражение нижних отделов GI 2-3 стадии с поражением кожи 0-3 стадии, и/или поражение верхних отделов GI 0-1 стадии;

степень 4: поражение кожи, печени или нижних отделов GI 4 стадии с поражением верхних отделов GI 0-1 стадии

В случае aGvHD в качестве терапии первой линии применяют стероиды. Однако частота ответов ограничена, при этом только примерно 50% пациентов отвечают на терапию первой линии. Исходы для пациентов с рефрактерной к стероидам aGvHD являются неблагоприятными, при этом уровни смертности в отдаленном периоде достигают 90% (Westin, J. et al., (2011) Adv Hematol. ID статьи 601953).

В некоторых вариантах осуществления введение популяции клеток, предусматривающей сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека) по настоящему изобретению, связано с отсутствием случаев рефрактерной к стероидам aGvHD, где ни один субъект не испытывает клинически значимых (например, степени 2-4) симптомов рефрактерной к стероидам aGvHD после введения. В некоторых вариантах осуществления введение популяции клеток, предусматривающей сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека) по настоящему изобретению, связано с частичным возникновением случаев рефрактерной к стероидам aGvHD, где менее 1%, менее 2%, менее 3%, менее 4%, менее 5%, менее 6%, менее 7%, менее 8%, менее 9%, менее 10%, менее 11%, менее 12%, менее 13%, менее 14%, менее 15%, менее 16%, менее 17% или менее 18% субъектов

испытывают клинически значимые (например, степени 2-4) симптомы рефрактерной к стероидам aGvHD после введения.

В некоторых вариантах осуществления за субъектом наблюдают в течение периода до 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 дня, 32 дней, 33 дней, 34 дней, 35 дней или 36 дней после введения популяции клеток, предусматривающей сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека), в отношении симптомов aGvHD. В некоторых вариантах осуществления за субъектом наблюдают в течение по меньшей мере 20-50 дней, 25-70 дней, 28-100 дней после введения популяции клеток, предусматривающей сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека), в отношении симптомов aGvHD.

В некоторых вариантах осуществления применение HSCT в клинических условиях обеспечивает эталонные данные частоты возникновения aGvHD в ответ на введение популяции клеток, предусматривающей сконструированные Т-клетки. Общая частота возникновения клинически значимой (например, степени 2-4) aGvHD составляет примерно 50% после введения аллогенных HSCT, но может широко варьироваться в зависимости от факторов, которые включают без ограничения HLA-несовместимость донора и реципиента, пол донора и реципиента, возраст донора и реципиента, источник ткани трансплантата и интенсивность схемы подготовки к трансплантации (Hatzimichael, E. (2010) *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 3:105-117). Более конкретно, частота возникновения клинически значимой (например, степени 2-4) aGvHD после введения HSCT от HLA-совместимого родственного донора составляет примерно 20-35% (Remberger, M. et al., (2002) *Br J Haematol*. 119:751-759; Hahn, T. et al. (2008) *J Clin Oncol*. 26:5728-5734). Показатели частоты возникновения увеличиваются в случае неродственных доноров или HLA-несовместимых доноров. В некоторых вариантах осуществления введение сконструированных Т-клеток (например, сконструированных CAR-Т-клеток человека) связано с частотой возникновения клинически значимой (например, степени 2-4) aGvHD, которая является на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% более низкой, чем частота возникновения клинически значимой (например, степени 2-4) aGvHD, индуцированной введением аллогенных HSCT. В некоторых вариантах осуществления HSCT получают от HLA-совместимого родственного донора. В некоторых вариантах осуществления HSCT получают от HLA-совместимого неродственного донора. В некоторых вариантах осуществления HSCT получают от HLA-несовместимого родственного донора. В некоторых вариантах осуществления HSCT получают от HLA-несовместимого неродственного донора.

Е. Схема предварительной подготовки

В некоторых вариантах осуществления для предупреждения иммунного ответа хозяина на терапию на основе CAR-Т-клеток, описанную в данном документе, по отношению к субъекту применяют схему предварительной подготовки. Предварительная подготовка пациента с использованием одного или нескольких иммуносупрессивных

химиотерапевтических лекарственных средств перед проведением инфузии Т-клеток может повысить эффективность донорских Т-клеток после трансплантации (North, R. et al. (1982) *J Exp Med*, 155:1063-1074; Berenson, J. et al. (1975) *J. Immunol.* 115:234-238; Cheever, M. et al., (1980) *J Immunol.* 125:711-714).

Любой из раскрытых в данном документе вариантов комбинированной терапии может дополнительно включать схему предварительной подготовки. В некоторых вариантах осуществления схему предварительной подготовки применяют до, одновременно с или после применения терапии на основе CAR-T-клеток (например, сконструированных Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления схему предварительной подготовки применяют до, одновременно или после применения ингибитора NK-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, если терапия на основе CAR-T-клеток включает схему предварительной подготовки, описанную в данном документе (например, схему лимфодеплеции), то ингибитор NK-клеток применяют одновременно с применением схемы предварительной подготовки (например, схемы лимфодеплеции). В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток применяют перед применением схемы предварительной подготовки (например, схемы лимфодеплеции). В некоторых вариантах осуществления ингибитор NK-клеток применяют после применения схемы предварительной подготовки (например, схемы лимфодеплеции).

В некоторых вариантах осуществления схема предварительной подготовки включает схему лимфодеплеции.

(i) Лимфодеплеция

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки (например, сконструированные Т-клетки человека), вводят субъекту (например, пациенту-человеку, характеризующемуся наличием рака, например неходжкинской лимфомы) после того, как по отношению к субъекту применили схему лимфодеплеции, и/или он получил ингибитор NK-клеток.

Химиотерапия с применением лимфодеплеции (LD) направлена на обеспечение возможности размножения и выполнения эффекторной функции трансплантированных Т-клеток после инфузии. Известно, что эндогенные регуляторные Т-клетки и другие иммунные клетки могут поглощать определенные цитокины (например, интерлейкин 7 (IL-7), IL-15, IL-2, IL-21) из кровотока. Функция химиотерапии с применением LD заключается во временном удалении эндогенных иммунных клеток, которые функционируют как 'клеточные поглотители' стимулирующих цитокинов, тем самым обеспечивая повышенное количество цитокинов, которые способствуют активации и размножению донорских Т-клеток после введения (Gattinoni, L. et al., (2005) *J Expt Med* 202:907-912). Дополнительно, известно, что при уменьшении количества необученных Т-клеток хозяина ниже определенного порога трансплантированные донорские Т-клетки будут пролиферировать и дифференцироваться с целью восстановления истощенной популяции Т-клеток (Dummer, W. et al. (2002) *J Clin Invest.* 110:185-192; Muranski, P. et al.

(2006) Nat Clin Pract Oncol. 3:668-681). Таким образом, другой функцией химиотерапии с применением LD является временное уменьшение количества необученных Т-клеток в организме хозяина, чтобы способствовать пролиферации и дифференцировке трансплантированных донорских Т-клеток (например, сконструированных Т-клеток человека, например сконструированных аллогенных Т-клеток человека). В некоторых вариантах осуществления подготовительная терапия направлена на уменьшение количества эндогенных иммунных клеток и повышение сывороточных уровней гомеостатических цитокинов и/или проиммунных факторов, присутствующих у субъекта. В некоторых вариантах осуществления подготовительная терапия направлена на уменьшение количества эндогенных лимфоцитов ниже порогового уровня, что способствует размножению донорских Т-клеток (например, сконструированных Т-клеток человека, например сконструированных аллогенных Т-клеток человека) после применения. В некоторых вариантах осуществления подготовительная терапия создает более оптимальное микроокружение для пролиферации донорских Т-клеток (например, сконструированных Т-клеток человека, например сконструированных аллогенных Т-клеток человека) после введения реципиенту. В некоторых вариантах осуществления подготовительная терапия создает более оптимальное микроокружение для донорских Т-клеток (например, сконструированных Т-клеток человека, например сконструированных аллогенных Т-клеток человека), чтобы они могли выполнять эффекторную функцию после введения реципиенту.

В некоторых вариантах осуществления химиотерапия с примененным LD включает по меньшей мере одно, два, три или четыре химиотерапевтических лекарственных средства. В некоторых вариантах осуществления химиотерапия с примененным LD включает введение одной или нескольких доз циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления химиотерапия с примененным LD включает введение одной или нескольких доз флударабина. В некоторых вариантах осуществления химиотерапия с примененным LD включает введение одной или нескольких доз циклофосфамида в комбинации с одной или несколькими дозами дополнительного химиотерапевтического лекарственного средства (например, циклофосфамид+флударабин), как описано в патенте США № 9855298, который включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления химиотерапию с примененным LD комбинируют с облучением с целью индукции лейкафереза.

В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят внутривенно (например, в виде внутривенной инфузии). В некоторых вариантах осуществления инфузию циклофосфамида проводят в дозе, составляющей от приблизительно 200 мг/м² до приблизительно 2000 мг/м², где м² означает площадь поверхности тела реципиента. В некоторых вариантах осуществления инфузию циклофосфамида проводят в дозе, составляющей приблизительно 300 мг/м². В некоторых вариантах осуществления инфузию циклофосфамида проводят в дозе, составляющей приблизительно 500 мг/м². В некоторых вариантах осуществления инфузию циклофосфамида проводят в дозе,

составляющей приблизительно 750 мг/м^2 .

В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят в виде инфузии, включающей по меньшей мере 1 дозу, 2 дозы, 3 дозы, 4 дозы, 5 доз, 6 доз, 7 доз, 8 доз, 9 доз или 10 доз. В некоторых вариантах осуществления две или более последовательных инфузии циклофосфамида проводят с промежуточным интервалом, составляющим не более 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 часа, 22 часов, 23 часов, 24 часов, 25 часов, 26 часов, 27 часов, 28 часов, 29 часов, 30 часов, 31 часа или 32 часов. В некоторых вариантах осуществления две или более последовательных инфузии циклофосфамида проводят с промежуточным интервалом, составляющим не более 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней или 5 дней. В некоторых вариантах осуществления промежуточный интервал между последовательными инфузиями циклофосфамида является одинаковым. В некоторых вариантах осуществления промежуточный интервал между последовательными инфузиями циклофосфамида является различным. В некоторых вариантах осуществления две или более последовательных инфузии циклофосфамида проводят в интервале 2 дней, 3 дней, 4 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней или 12 дней.

В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят внутривенно (например, в виде внутривенной инфузии). В некоторых вариантах осуществления инфузию флударабина проводят в дозе, составляющей от приблизительно 10 мг/м^2 до приблизительно 900 мг/м^2 . В некоторых вариантах осуществления инфузию флударабина проводят в дозе, составляющей приблизительно 30 мг/м^2 .

В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в виде инфузии, включающей по меньшей мере 1 дозу, 2 дозы, 3 дозы, 4 дозы, 5 доз, 6 доз, 7 доз, 8 доз, 9 доз или 10 доз циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления две или более последовательных инфузии флударабина проводят с промежуточным интервалом, составляющим не более 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 часа, 22 часов, 23 часов, 24 часов, 25 часов, 26 часов, 27 часов, 28 часов, 29 часов, 30 часов, 31 часа или 32 часов. В некоторых вариантах осуществления две или более последовательных инфузии флударабина проводят с промежуточным интервалом, составляющим не более 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней или 5 дней. В некоторых вариантах осуществления промежуточный интервал между последовательными инфузиями флударабина является одинаковым. В некоторых вариантах осуществления промежуточный интервал между последовательными инфузиями флударабина является различным. В некоторых вариантах осуществления две или более последовательных инфузии флударабина проводят в интервале 2 дней, 3 дней, 4 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней или 12 дней.

В некоторых вариантах осуществления химиотерапия с примененным LD включает комбинацию химиотерапевтических лекарственных средств. В некоторых вариантах

осуществления химиотерапия с примененным LD включает комбинацию циклофосфамида и флударабина. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид и флударабин вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид и флударабин вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид и флударабин вводят последовательно, при этом промежуточный интервал между введением флударабина составляет не более 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов или 20 часов. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят до введения флударабина, при этом промежуточный интервал между введением составляет не более 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов или 20 часов.

В некоторых вариантах осуществления химиотерапию с примененным LD проводят ежедневно в течение 1 дня, в течение 2 дней, в течение 3 дней, в течение 4 дней, в течение 5 дней, в течение 6 дней, в течение 7 дней, в течение 8 дней, в течение 9 дней, в течение 10 дней, в течение 11 дней или в течение 12 дней. В некоторых вариантах осуществления химиотерапию с примененным LD проводят ежедневно в течение 1-4 дней. В некоторых вариантах осуществления химиотерапию с примененным LD проводят ежедневно в течение 3 дней.

В некоторых вариантах осуществления химиотерапию с примененным LD, включающую циклофосфамид и флударабин, проводят ежедневно в течение 1 дня, в течение 2 дней, в течение 3 дней, в течение 4 дней, в течение 5 дней, в течение 6 дней, в течение 7 дней, в течение 8 дней, в течение 9 дней, в течение 10 дней, в течение 11 дней или в течение 12 дней. В некоторых вариантах осуществления химиотерапию с примененным LD, включающую циклофосфамид и флударабин, проводят ежедневно в течение 1-4 дней. В некоторых вариантах осуществления химиотерапию с примененным LD, включающую циклофосфамид и флударабин, проводят ежедневно в течение 3 дней.

В некоторых вариантах осуществления проведение химиотерапии с примененным LD (например, циклофосфамидом и флударабином) связано с повышением сывороточных уровней IL-7, IL-15, IL-2, IL-21, IL-10, IL-5, IL-8, MCP-1, PLGF, CRP, sICAM-1, sVCAM-1 или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления проведение химиотерапии с примененным LD (например, циклофосфамидом и флударабином) связано со снижением сывороточных уровней перфорина, MIP-1b или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления проведение химиотерапии с примененным LD (например, циклофосфамидом и флударабином) связано с лимфопенией. В некоторых вариантах осуществления проведение химиотерапии с примененным LD (например, циклофосфамидом и флударабином) связано с уменьшением (например, деплецией) регуляторных Т-клеток у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления по отношению к субъекту применяют схему химиотерапии с примененным LD до введения популяции клеток,

предусматривающей сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека). В некоторых вариантах осуществления по отношению к субъекту применяют схему химиотерапии с примененным LD за один день, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, семь дней, восемь дней, девять дней или десять дней до введения популяции клеток, предусматривающей сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека). В некоторых вариантах осуществления по отношению к субъекту применяют схему химиотерапии с примененным LD за по меньшей мере один день, за по меньшей мере два дня, за по меньшей мере три дня, за по меньшей мере четыре дня, за по меньшей мере пять дней, за по меньшей мере шесть дней, за по меньшей мере семь дней, за по меньшей мере восемь дней, за по меньшей мере девять дней или за по меньшей мере десять дней до введения популяции клеток, предусматривающей сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека).

В некоторых вариантах осуществления по отношению к субъекту применяют схему химиотерапии с применением LD в течение одного дня, двух дней, трех дней, четырех дней, пяти дней, шести дней, семи дней, восьми дней, девяти дней или десяти дней, а популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека), вводят через по меньшей мере один день, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, семь дней, восемь дней, девять дней или десять дней после завершения применения схемы химиотерапии с применением LD. В некоторых вариантах осуществления по отношению к субъекту применяют схему химиотерапии с применением LD в течение 1-3 дней, а популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека), вводят по меньшей мере через два дня (например, 48 часов), но не более чем через семь дней после завершения применения схемы химиотерапии с применением LD. В некоторых вариантах осуществления по отношению к субъекту применяют схему химиотерапии с применением LD в течение приблизительно 3 дней, а популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека), вводят по меньшей мере через два дня (например, 48 часов), но не более чем через семь дней после завершения применения схемы химиотерапии с применением LD.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят циклофосфамид и флударабин до введения популяции клеток, предусматривающей сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека). В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят циклофосфамид и флударабин за один день, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, семь дней, восемь дней, девять дней или десять дней до введения популяции клеток, предусматривающей сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека). В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят циклофосфамид и флударабин за по меньшей мере один день, за по меньшей мере два дня, за по меньшей мере три дня, за по меньшей мере

четыре дня, за по меньшей мере пять дней, за по меньшей мере шесть дней, за по меньшей мере семь дней, за по меньшей мере восемь дней, за по меньшей мере девять дней или за по меньшей мере десять дней до введения популяции клеток, предусматривающей сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека).

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят циклофосфамид и флударабин в течение одного дня, двух дней, трех дней, четырех дней, пяти дней, шести дней, семи дней, восьми дней, девяти дней или десяти дней, а популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека), вводят по меньшей мере через один день, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, семь дней, восемь дней, девять дней или десять дней после завершения введения циклофосфамида и флударабина. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят циклофосфамид и флударабин в течение 1-3 дней, а популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека), вводят по меньшей мере через два дня (например, 48 часов), но не более чем через семь дней после завершения введения циклофосфамида и флударабина. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят циклофосфамид и флударабин в течение приблизительно 3 дней, а популяцию клеток, предусматривающую сконструированные Т-клетки (например, сконструированные CAR-Т-клетки человека), вводят по меньшей мере через два дня (например, 48 часов), но не более чем через семь дней после завершения введения циклофосфамида и флударабина.

IV. Набор для улучшения клинического исхода, связанного с терапией на основе CAR-Т-клеток

В настоящем изобретении также предусмотрены наборы для использования популяции генетически сконструированных CAR-Т-клеток в комбинации с ингибитором NK-клеток, которые вместе раскрыты в данном документе, для улучшения клинического исхода. Такие наборы могут включать один или несколько контейнеров, содержащих любые из генетически сконструированных CAR-Т-клеток, раскрытых в данном документе, или нуклеиновую кислоту (например, AAV вектор), кодирующую конструкцию CAR. В некоторых вариантах осуществления набор может дополнительно включать контейнер, содержащий фармацевтическую композицию, которая содержит одно или несколько средств для лимфодеплеции и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей. В качестве альтернативы или в дополнение, набор может дополнительно содержать фармацевтическую композицию, которая содержит любой из ингибиторов NK-клеток и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

В некоторых вариантах осуществления набор может содержать инструкции по применению любого из способов, описанных в данном документе. Включенные инструкции могут содержать описание введения генетически сконструированных CAR-Т-клеток, средств для лимфодеплеции и/или ингибитора NK-клеток с достижением необходимого действия у пациента-человека. Набор может дополнительно содержать описание выбора пациента-человека, подходящего для лечения, на основании

идентификации того, нуждается ли пациент-человек в лечении.

Инструкции, относящиеся к применению популяции генетически сконструированных CAR-T-клеток, средств для лимфодеплеции и/или ингибитора НК-клеток, описанных в данном документе, обычно включают информацию о дозе, схеме введения доз и пути введения для предполагаемого средства лечения. Контейнеры могут представлять собой однократные дозы, объемные упаковки (например, упаковки со множеством доз) или частичные дозы. Инструкции, поставляемые в наборах по настоящему изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или листке-вкладыше. На этикетке или в листке-вкладыше указывают, что популяцию генетически сконструированных Т-клеток применяют для лечения, задержки начала и/или облегчения почечно-клеточной карциномы у субъекта.

Наборы, предусмотренные в данном документе, находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает без ограничения флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку и т. п. Также рассматриваются упаковки для применения в комбинации со специфическим устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения или устройство для инфузии. Набор может иметь отверстие для стерильного доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон с пробкой, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций). Контейнер может также иметь отверстие для стерильного доступа.

Наборы необязательно могут содержать дополнительные компоненты, такие как буферы и пояснительная информация. Обычно набор содержит контейнер и этикетку или листок-вкладыш(листки-вкладыши) в контейнере или на нем. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены изделия, содержащие содержимое наборов, описанных выше.

Общие методики

При осуществлении настоящего изобретения на практике будут использоваться, если не указано иное, общепринятые методики молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области. Такие методики полностью объяснены в литературе, такой как *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed. 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds. 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds. 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis, et al., eds. 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E.

Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practice approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995); DNA Cloning: A practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1985); Transcription and Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. 1984); Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); и A practical Guide To Molecular Cloning (B. Perbal, John Wiley & Sons Inc., 1984).

Без дальнейшего уточнения считается, что специалист в данной области может на основании приведенного выше описания применять настоящее изобретение в его наиболее полном объеме. Следовательно, следующие конкретные варианты осуществления должны толковаться как исключительно иллюстративные и никоим образом не ограничивающие остальную часть настоящего изобретения. Все публикации, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки для целей или заявляемого объекта, упомянутых в данном документе.

ПРИМЕРЫ

Хотя настоящее изобретение описано со ссылкой на его конкретные варианты осуществления, специалистам в данной области должно быть понятно, что можно вносить различные изменения и эквиваленты можно заменять без отклонения от подлинной сути и объема изобретения. В дополнение, можно выполнять множество модификаций для адаптации конкретной ситуации, материала, смеси химически связанных веществ, способа, стадии или стадий способа к цели, сути и объему настоящего изобретения. Предполагается, что все такие модификации находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Пример 1. Получение сконструированных CAR-T-клеток человека.

В данном примере описано получение аллогенных сконструированных Т-клеток человека, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), и у которых отсутствует экспрессия гена TCR и гена $\beta 2M$. Клетки могут экспрессировать химерный антигенный рецептор, нацеливающийся на раковый антиген, например CD19 и/или BCMA. Способы получения таких CAR-T-клеток описаны в публикации заявки на патент США № 2018-0325955, включенной в данный документ посредством ссылки.

Вкратце, первичные Т-клетки человека сначала подвергали электропорации с использованием Cas9 или рибонуклеопротеиновых комплексов (RNP) Cas9:sgRNA, нацеливающих на TRAC (AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (SEQ ID NO: 28) и B2M (GCTACTCTCTCTTTCTGGCC (SEQ ID NO: 29)). Двухцепочечный разрыв ДНК в локусе TRAC репарируют посредством репарации, направляемой гомологией, как описано ниже.

Получение CAR-T-клеток к CD19

Для получения CAR-T-клеток к CD19 двухцепочечный разрыв ДНК в локусе TRAC репарировали посредством репарации, направляемой гомологией, с использованием рекомбинантного аденоассоциированного аденовирусного вектора серотипа 6 (AAV6), содержащего нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 57, содержащую правое и левое плечи гомологии к локусу TRAC, фланкирующие кассету химерного антигенного рецептора (CAR) (SEQ ID NO: 58). CAR состоял из одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), полученного из мышинового антитела, специфического в отношении CD19, шарнирной области CD8 и трансмембранного домена, а также сигнального домена, содержащего сигнальные домены CD3z и CD28. Аминокислотная последовательность CAR и кодирующая ее нуклеотидная последовательность изложены под SEQ ID NO: 39 и 40, соответственно. AAV6 доставляли с помощью RNP Cas9:sgRNA (1 мкМ Cas9, 5 мкМ gRNA) в активированные Т-клетки человека. Смесь для нуклеофекции содержала раствор Nucleofector™, 5×10^6 клеток, 1 мкМ Cas9 и 5 мкМ gRNA (как описано в Hendel et al., Nat Biotechnol. 2015; 33(9):985-989, PMID: 26121415).

Каждый комплекс RNP содержал saCas9 и одну из двух sgRNA, нацеленных на SEQ ID NO:28 в TRAC или SEQ ID NO:29 в β 2M. Иллюстративные sgRNA для TRAC включают SEQ ID NO: 18 и 22. Иллюстративные спейсеры sgRNA для TRAC включают SEQ ID NO: 19 и 23. Иллюстративные sgRNA для β 2M включают SEQ ID NO: 20 и 24. Иллюстративные спейсеры sgRNA для β 2M включают SEQ ID NO: 21 и 25. Использовали следующие sgRNA: TRAC (SEQ ID NO: 22) и β 2M (SEQ ID NO: 24). Также можно использовать немодифицированные версии (или другие модифицированные версии) gRNA (например, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 20).

Приблизительно через одну неделю после электропорации клетки либо оставляли необработанными, либо обрабатывали с использованием форболмиристатацетата (PMA)/иономицина в течение ночи. На следующий день клетки обрабатывали посредством проточной цитометрии (см., например, Kalaitzidis D et al. J Clin Invest 2017; 127(4): 1405-1413) для оценки уровней экспрессии TRAC и β 2M на клеточной поверхности клеток в популяции отредактированных клеток. Использовали следующие первичные антитела (таблица 5).

Таблица 5. Антитела.

Антитело	Клон	Флуоресцентный краситель	№ по каталогу	Разбавление	На 1
TCR	BW242/41 2	PE	130-091-236 (Miltenyi)	1:100	1 мкл
β 2M	2M2	PE-Cy7	316318 (Biolegend)	1:100	1 мкл

Экспрессию CAR к CD19 обнаруживали с использованием биотинилированного рекомбинантного человеческого CD19 (ACROBIOSYSTEMS INC; CD9-H825).

Получение CAR-T-клеток к BCMA

Для получения CAR-T-клеток к BCMA двухцепочечный разрыв в локусе TRAC репарировали посредством репарации, направляемой гомологией, с использованием AAV6, содержащего нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 83 (содержащую донорную матрицу под SEQ ID NO: 84, кодирующую CAR к BCMA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 86), который доставляют с помощью RNP Cas9:gRNA (1 мкМ Cas9 и 5 мкМ gRNA) в активированные аллогенные Т-клетки человека. Можно использовать следующие gRNA: TRAC (SEQ ID NO: 22) и β 2M (SEQ ID NO: 24). Также можно использовать немодифицированные версии (или другие модифицированные версии) gRNA (например, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 20). Приблизительно через одну (1) неделю после электропорации клетки обрабатывают посредством проточной цитометрии, как описано выше для CAR⁺-Т-клеток к CD19, со следующим отличием. Экспрессию CAR к BCMA обнаруживали с использованием биотинилированного рекомбинантного человеческого BCMA (ACROS, № по каталогу BC7-H82F0).

Пример 2. Экспрессия CD38 на CAR-T-клетках.

Клеточную экспрессию CD38 на CAR-T-клетках измеряли с помощью проточной цитометрии. В частности, примерно через пятнадцать дней после стадии электропорации, описанной выше, CAR-T-клетки к CD19 и к BCMA, полученные, как описано в примере 1, окрашивали с использованием панели антител и измеряли экспрессию CD38.

Живые CAR-T-клетки гейтировали по их профилям прямого светорассеяния (FSC) и бокового светорассеяния (SSC) и с использованием красителя для определения живых/мертвых клеток (номер по каталогу L34965, ThermoFisher Scientific). Затем клетки окрашивали с использованием панели антител: CD38 FITC (клон HIT2, BioLegend), CD3 PE (UCHT1, Biolegend), CD4 APC/Cy7 (RPA-T4, Biolegend) и CD8 Pacific Blue (SK-1, Biolegend). Затем CD3-Т-клетки гейтировали с измерением экспрессии CD38. Для установления порогового значения гейтирования популяции CD38⁺ использовали окрашивание по протоколу контроля флуоресценции без одного антитела (FMO) (фиг. 1С). Из данных видно, что большинство CAR-T-клеток к BCMA (70,5%) и к CD19 (87,1%) экспрессируют CD38⁺.

Пример 3. Экспрессия CD38 на NK- и Т-клетках из нормальных PBMC.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) собирали у здоровых доноров для оценки экспрессии CD38 в нормальных иммунных клетках. PBMC, собранные от двух доноров (донор 3469 и донор 3383), культивировали в среде (среда X-vivo (номер по каталогу 04-744, Lonza) с добавлением 5% сыворотки АВ человека (номер по каталогу HP1022HI, Valley Biomedical), IL-2 и IL7) с 10% комплемента или без него (объединенная сыворотка с комплементом, Innovative Research, Inc.). Поскольку лизис, опосредованный комплементом, инициируется антителами к CD38, клетки культивировали в среде с комплементом или без него для оценки влияния комплемента на клетки CD38⁺. Проточную цитометрию использовали для оценки экспрессии CD38 в NK-

клетках (CD3⁻, CD56⁺) и Т-клетках (CD3⁺) в день 0 (**фиг. 2А-2D и 3А-3D**) и через 72 часа (**фиг. 4А-4D и 5А-5D**) культивирования *in vitro*. Панель антител, использованная для проточной цитометрии, представляла собой CD3 PE (UCHT1, BioLegend), CD38 FITC (клон HIT2, BioLegend), CD56 APC (HCD56, BioLegend) и CD69 PE-CY5 (FN50, BioLegend).

В день 0 (через 1 час после начала культивирования) большинство НК-клеток и примерно половина Т-клеток экспрессировали CD38 на своей клеточной поверхности. РВМС от донора 3469 показали экспрессию CD38 в 96,1% (только среда) и 96,6% (среда+10% комплемента) НК-клеток (**фиг. 2С-2D**). Экспрессия CD38 на Т-клетках, культивируемых только в среде или среде с добавлением 10% комплемента, при измерении составила 46,5% и 44,9% соответственно (**фиг. 2А-2В**). Аналогично, РВМС от донора 3383, которые культивировали только в среде или среде с добавлением 10% комплемента, экспрессировали CD38 97,2% (только среда) и 97,0% (среда+10% комплемента) НК-клеток и 57,9% (только среда) и 58,2% (среда+комплемент) Т-клеток (**фиг. 3А-3D**).

Через 72 часа культивирования большинство НК-клеток и Т-клеток экспрессировали CD38 на своей клеточной поверхности. При культивировании РВМС от донора 3469 только в среде или в среде с добавлением 10% комплемента экспрессию CD38 обнаружили в 98,4% (только среда) и 99,5% (среда+10% комплемента) НК-клеток (**фиг. 4С-4D**). Экспрессия CD38 на Т-клетках, культивируемых только в среде или среде с добавлением 10% комплемента, при измерении составила соответственно 85,3% и 87,9% (**фиг. 4А-4В**). Аналогично, РВМС от донора 3383, которые культивировали только в среде или среде с добавлением 10% комплемента, экспрессировали CD38 99,2% (только среда) и 99% (среда+10% комплемента) НК-клеток и 71% (только среда) и 82,6% (среда+комплемент) Т-клеток (**фиг. 5А-5D**).

Эти данные продемонстрировали, что маркер активации CD38 присутствует в большинстве (> 90%) НК-клеток и что высокие уровни экспрессии CD38 поддерживаются при культивировании клеток *in vitro* с комплементом или без него. Хотя экспрессия CD38 является относительно более низкой в нормальной популяции Т-клеток (~ 50%), экспрессия CD38 в CD3⁺-Т-клетках увеличилась до 71% и 85,3% через 72 часа культивирования только в среде и до 87,9% и 82,6% через 72 часа культивирования в среде с добавлением 10% комплемента. Хотя ранее сообщалось, что опосредованный комплементом лизис вызывается антителами к CD38 (например, даратумумабом), данные показывают, что присутствие комплемента не влияет на количества CD38⁺-НК- или -Т-клеток.

Пример 4. Обработка даратумумабом приводила к истощению НК-клеток, в то время как количества Т-клеток оставались неизменными.

На основании уровней экспрессии CD38 в НК- и Т-клетках оценивали влияние антитела к CD38, даратумумаба (ТАВ-236, Creative Biolabs), на такие клетки. РВМС от здорового донора культивировали в течение 96 часов в среде, содержащей 0,01, 0,1 или 1

мкг/мл даратумумаба. Также тестировали влияние 10% комплемента на культуры клеток. Необработанные клетки и клетки, обработанные с применением 0,01, 0,1 или 1 мкг/мл изотипического контрольного mAb (IgG1k человека) (номер по каталогу 403501, BioLegend), использовали в качестве контролей. Через 96 часов культивирования измеряли частоту встречаемости и количества NK- и Т-клеток.

Культивирование *in vitro* с даратумумабом приводило к дозозависимому снижению частоты встречаемости и количеств NK-клеток (**фиг. 6А-6В**). В самой высокой протестированной дозе, 1 мкг/мл, даратумумаб уменьшал количества NK-клеток приблизительно на 75% через 96 часов. Данный эффект является специфичным для даратумумаба, поскольку обработка с использованием изотипического контрольного mAb не влияла на количества NK-клеток. Уменьшение количества NK-клеток не зависит от комплемента в данных условиях культивирования, поскольку добавление 10% комплемента к культуре клеток не изменяло влияние даратумумаба на NK-клетки.

Во втором эксперименте с РВМС от другого донора даратумумаб снижал количества NK-клеток на ~ 57% всего через 72 часа (данные не показаны). Из этих данных видно, что даратумумаб оказывает сходное влияние на NK-клетки из популяций от разных доноров.

В отличие от своего влияния на NK-клетки даратумумаб не влиял на количества или частоту встречаемости Т-клеток (**фиг. 6С-6D**). Хотя экспрессию CD38 обнаружили на Т-клетках (**фиг. 2А-2В** и **фиг. 3А-3В**), а культивирование РВМС *in vitro* приводило к повышению поверхностной экспрессии CD38 в Т-клетках (**фиг. 4А-4В** и **фиг. 5А-5В**), добавление даратумумаба в культуральную среду неожиданно не повлияло на количества Т-клеток.

Пример 5. Обработка даратумумабом не влияет на количества CAR-Т-клеток.

Для оценки того, влияет ли обработка даратумумабом на CAR-Т-клетки с нарушенным геном $\beta 2M$, CAR-Т-клетки к ВСМА, полученные в примере 1, обрабатывали даратумумабом с 10% комплемента или без него. После 72-часового периода культивирования количества и частоту встречаемости CAR-Т-клеток к ВСМА измеряли с помощью анализа проточной цитометрии, как описано в примере 3 (**фиг. 7А-7В**). Хотя большинство (70,5%) CAR-Т-клеток к ВСМА экспрессировали CD38 (**фиг. 1А**), обработка даратумумабом, с 10% комплемента или без него, не влияла на количества или частоту встречаемости CAR-Т-клеток к ВСМА.

Пример 6. Обработка даратумумабом не активует CAR-Т-клетки.

Для определения того, активует ли даратумумаб CAR-Т-клетки и вызывает ли последующую пролиферацию или индуцированную активацией гибель клеток, CAR-Т-клетки к CD19 культивировали только с даратумумабом или с даратумумабом и 2 мкг/мл антитела козы к изотипическому контрольному антителу человека в течение 24 часов. Даратумумаб применяли в концентрации 0,01, 0,1 или 1 мкг/мл. Необработанные клетки или CAR-Т-клетки к CD19, обработанные с использованием изотипического контрольного mAb IgG1k, применяли в качестве контролей. Экспрессию маркера ранней активации,

CD69, оценивали в конце 24-часового периода инкубации (фиг. 8А-8N). Как показано на репрезентативных панелях проточной цитометрии, экспрессия CD69 не изменилась во всех протестированных популяциях CAR-T-клеток к CD19, независимо от обработки. Таким образом, данные показывают, что, несмотря на экспрессию маркера клеточной поверхности CD38 (87,1%) на CAR-T-клетках к CD19 (фиг. 1В) обработка даратумумабом не индуцировала активацию CAR-T-клеток к CD19.

Пример 7. Предварительная обработка даратумумабом снижала индуцированный NK-клетками лизис CAR-T-клеток.

Для определения того, подавляет ли даратумумаб опосредованный NK-клетками лизис CAR-T-клеток, CAR-T-клетки к ВСМА культивировали совместно с очищенными NK-клетками, которые предварительно обрабатывали в течение 60 часов либо даратумумабом, либо изотипическим контрольным mAb в концентрациях 0,01, 0,1 или 1 мкг/мл (фиг. 9А). В конце 60-часового периода предварительной обработки 50000 меченых красителем efluor CAR-T-клеток к ВСМА добавляли в планшет, содержащий 150000 NK-клеток и Dapa/изотипический контроль, и инкубировали в течение дополнительных 24 часов. В конце 24-часового периода совместного культивирования лизис CAR-T-клеток к ВСМА измеряли в анализе уничтожения клеток с DAPI.

В частности, CAR-T-клетки к ВСМА метили с использованием 5 мкМ efluor670 (номер по каталогу 65-0840-90; ThermoFisher Scientific), промывали и инкубировали в совместных культурах с NK-клетками в соотношении 3:1 (NK:T). Совместную культуру инкубировали в течение 24 часов. После инкубации лунки промывали и среду заменяли на 150 мкл 1X буфера FACS, содержащего 5 мг/мл DAPI (Molecular Probes) в разведении 1:500 и 12,5 мкл шариков CountBright (C36950; ThermoFisher Scientific). Клетки анализировали в отношении жизнеспособности клеток с помощью проточной цитометрии (т. е. жизнеспособные клетки являлись отрицательными в отношении окрашивания DAPI). Предварительная обработка даратумумабом приводила к снижению лизиса CAR-T-клеток к ВСМА дозозависимым образом (фиг. 9А). NK-клетки, предварительно обработанные в течение 60 часов даратумумабом в концентрации 1 мкг/мл, продемонстрировали 50% снижение их способности вызывать лизис CAR-T-клеток к ВСМА. Этот эффект является специфичным для даратумумаба, поскольку CAR-T-клетки к ВСМА, которые совместно культивировали с NK-клетками, предварительно обработанными изотипическим контрольным mAb, не влияли на изменение опосредованного NK-клетками лизиса CAR-T-клеток.

Пример 8. Влияние высоких концентраций даратумумаба на NK- и CAR-T-клетки.

Для определения того, активируют ли более высокие концентрации даратумумаба (10 мкг/мл) CAR-T-клетки и вызывают ли последующую пролиферацию или индуцированную активацией гибель клеток, CAR-T-клетки к ВСМА с дефицитом B2M культивировали с даратумумабом в концентрациях, составляющих 0,1, 1 или 10 мкг/мл, в течение 24 часов. Необработанные клетки или CAR-T-клетки к ВСМА с дефицитом B2M,

обработанные изотипическим контрольным mAb, IgG1k, применяли в качестве контролей. На **фиг. 10А** продемонстрировано, что увеличение концентрации даратумумаба до 10 мкг/мл не приводило к значительному снижению количеств CAR-T-клеток с дефицитом В2М.

Для определения того, подавляет ли даратумумаб в концентрации 10 мкг/мл опосредованный NK-клетками лизис CAR-T-клеток, CAR-T-клетки к ВСМА с дефицитом В2М культивировали совместно с очищенными NK-клетками, которые предварительно обрабатывали в течение 60 часов либо даратумумабом, либо изотипическим контрольным mAb в концентрациях 0,1, 1 или 10 мкг/мл. Вкратце, NK-клетки высевали по 50000 или 150000 клеток на лунку и обрабатывали даратумумабом или изотипическим контролем в концентрациях 0, 0,1, 1 и 10 мкг/мл. После 60 часов обработки NK-клеток даратумумабом CAR-T-клетки к ВСМА метили с использованием 5 мкМ efluor670 (номер по каталогу 65-0840-90; ThermoFisher Scientific), промывали и высевали по 50000 клеток на лунку в совместные культуры с NK-клетки, обработанные даратумумабом, с получением соотношения 1:1 или 3:1 (NK:T). Совместную культуру инкубировали в течение дополнительных 24 часов. После инкубации лунки промывали и среду заменяли на 150 мкл 1X буфера FACS, содержащего 5 мг/мл DAPI (Molecular Probes) в разведении 1:500 и 12,5 мкл шариков CountBright (C36950; ThermoFisher Scientific). Клетки анализировали в отношении жизнеспособности клеток с помощью проточной цитометрии (т. е. жизнеспособные клетки являлись отрицательными в отношении окрашивания DAPI). Предварительная обработка даратумумабом защищала CAR-T-клетки к ВСМА от индуцированного NK клеточного лизиса дозозависимым образом (**фиг. 10В-10С**). При совместном культивировании CAR-T-клеток с NK-клетками в соотношении 1:1 предварительная обработка NK-клеток даратумумабом в концентрации 0,1 мкг/мл демонстрировала максимальный защитный эффект, составляющий 91%, от лизиса CAR-T-клеток к ВСМА (**фиг. 10В**). При увеличении соотношения NK: CAR-T-клеток до 3:1 даратумумаб все еще оказывал значительный защитный эффект от лизиса NK-клетками (85% защиты) при несколько более высокой дозе, составляющей 1 мкг/мл (**фиг. 10С**).

Пример 9. Влияние возрастающих доз даратумумаба на NK- и CAR-T-клетки.

Даратумумаб назначают в медицинских учреждениях в дозе, составляющей 16 мг/кг (эквивалент 225 мкг/мл). Для определения влияния даратумумаба в высоких концентрациях на NK- и CAR-T-клетки, CAR-T-клетки к ВСМА с дефицитом В2М культивировали совместно с очищенными NK-клетками, которые предварительно обрабатывали в течение 60 часов либо IgG1k человека, либо даратумумабом, при этом концентрации каждого из них составляли 0,01, 0,1, 1, 10, 100 или 300 мкг/мл, с применением способов, описанных в предыдущих примерах. Проточную цитометрию применяли для оценки количеств NK- и CAR-T-клеток через 72 часа после совместного культивирования с предварительно обработанными NK-клетками с применением способов, описанных в предыдущих примерах.

На **фиг. 11А** продемонстрировано, что возрастающие дозы даратумумаба снижали

количество NK-клеток через 72 часа после воздействия. Уменьшение количества NK-клеток на 29% наблюдали после воздействия 1 мкг/мл даратумумаба, в то время как воздействие 300 мкг/мл даратумумаба приводит к дальнейшему снижению количества NK-клеток на 38%. Напротив, на количества CAR-T-клеток к ВСМА высокие концентрации даратумумаба не влияли (фиг. 11В).

Пример 10. Влияние даратумумаба на NK- и CAR T-клетки *in vivo* в мышинной модели ксенотрансплантата острого лимфобластного лейкоза.

Диссемированную мышиную модель использовали для дополнительной оценки *in vivo* эффективности CAR-T-клеток к CD19, не содержащих B2M, в присутствии NK-клеток как с даратумумабом, так и без него.

Двадцать четыре самки мышей CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Sug}/JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержащиеся в условиях отсутствия патогенов, за 5-7 дней до начала исследования. В начале исследования мышей разделили на 12 групп по варианту обработки. Мышей инокулировали внутривенно (хвостовая вена) для моделирования диссемированного заболевания. В день 1 все мыши получали внутривенную инъекцию опухолевых клеток NALM6 ($0,5 \times 10^6$ клеток на мыш). Опухолевые клетки NALM6, использованные в данном эксперименте, представляли собой линию опухолевых клеток острого лимфобластного лейкоза (ALL) человека, экспрессирующих GFP и люциферазу. В день 2 группы 2-12 получали внутривенную инъекцию NK-клеток, PBS, даратумумаба (DARA) и/или IgG1. PBS и IgG1 включили в качестве отрицательных контролей. Группы 1-3 и 7-8 также получали внутривенную инъекцию CAR-T-клеток к CD19 (4×10^6 клеток на мыш) в день 4 исследования. Вводимые CAR-T-клетки к CD19 получали, как описано в примере 1. Группы 3, 6, 9 и 12 являлись группами отрицательного контроля, которые обрабатывали с использованием IgG1 вместо даратумумаба. В группах IgG1 неожиданные эффекты отсутствовали (данные не показаны). Подробная информация об экспериментальных группах представлена ниже в **таблице 6**.

Таблица 6. Группы по варианту обработки в мышинной модели ксенотрансплантата ALL.

Группа	Клетки NALM6 $0,5 \times 10^6$ клеток/мышь	NK-клетки 4×10^6 клеток/мышь	PBS	DARA 100 мкг/мышь	IgG1 100 мкг/мышь	CAR-T-клетки 4×10^6 клеток/мышь	n
1	X					X	5
2	X			X		X	5
3	X				X	X	5
4	X	X					5

Группа	Клетки NALM6 $0,5 \times 10^6$ клеток/мышь	NK-клетки 4×10^6 клеток/мышь	PBS	DARA 100 мкг/мышь	IgG1 100 мкг/мышь	CAR-T-клетки 4×10^6 клеток/мышь	n
5	X	X		X			5
6	X	X			X		5
7	X	X				X	5
8	X	X		X		X	5
9	X	X			X	X	5
10	X		X				5
11	X		X	X			5
12	X		X		X		5

В ходе исследования мышей ежедневно контролировали, а вес тела измеряли два раза в неделю. Через две недели после инъекции у мышей брали кровь и измеряли количество клеток с помощью проточной цитометрии для определения влияния DARA на NK-клетки в кровотоке. На **фиг. 12** показано, что DARA эффективно снижает количества NK-клеток в мышечных моделях *in vivo*.

Нагрузку заболевания измеряли с помощью биолюминесцентной визуализации опухолевых клеток NALM6, маркированных лентивирусными векторами, экспрессирующими люциферазу. Вкратце, мышей анестезировали и вводили люциферин путем внутрибрюшинной инъекции. Лейкозные клетки NALM6, помеченные люциферазой, метаболизировали люциферин и излучали свет, обнаруживаемый и количественно оцениваемый с применением способов, применяемых Translations Drug Development, LLC (Скоттсдейл, штат Аризона, США) и описанных в данном документе. Применяя данный способ, биолюминесценцию (BLI; общая ROI, фотон/с) измеряли дважды в неделю, начиная в день 2 исследования, что обеспечивало возможность измерения лейкозной нагрузки и обнаружения приживления.

Контрольные группы 10, 11 и 12, которые не получали NK-клетки, DARA или CAR-T-клетки к CD19, показали стремительный рост биолюминесценции через 15 дней и не выживали больше 20 дней (**фиг. 13**). Обработка CAR-T-клетками к CD19 (группа 1; **фиг. 13**) задерживала прогрессирование опухоли, увеличивая выживаемость по сравнению с контролем. Присутствие NK-клеток, по-видимому, не оказывало отрицательного влияния на эффективность CAR-T-клеток к CD19, вводимых отдельно. Однако добавление даратумумаба резко увеличивало эффективность CAR-T-клеток к CD19 в присутствии NK-клеток (группа 8; **фиг. 13**). Неожиданно отдельно даратумумаб (группа 11) и даратумумаб в присутствии NK-клеток (группа 5) также замедляли рост опухоли по сравнению с контролем и оказывали синергический эффект в комбинации с

CAR-T-клетками к CD19 (группа 2) (фиг. 13).

Также оценивали значимую конечную точку (время до проявления периморбидности) и эффект приживления T-клеток. Процент смертности животных и время до гибели регистрировали для каждой группы в исследовании. Мышей подвергали эвтаназии до наступления агонального состояния. Мышей определяли как находящихся в агональном состоянии и умерщвляли, если удовлетворялись один или несколько из следующих критериев:

- потеря массы тела, составляющая 20% или более, сохраняющаяся в течение периода времени, превышающего 1 неделю;
- опухоли, которые подавляют нормальные физиологические функции, такие как прием пищи, питье, подвижность и способность мочиться и/или испражняться;
- продолжительная обильная диарея, приводящая к чрезмерной потере массы (> 20%); или
- непрекращающиеся хрипы и дыхательная недостаточность.

Животных также считали находящимися в агональном состоянии, если имели место длительная или чрезмерная боль или дистресс, определенные посредством клинических наблюдений, такие как прострация, сутулость, паралич/парез, вздутие живота, изъязвления, абсцессы, судорожные припадки и/или кровоизлияния. Влияние даратумумаба на выживаемость животных представлено ниже в **таблице 7**, где статистическую значимость определяли с использованием критерия Манна-Уитни, а значения p рассчитывали по сравнению с контролем PBS (например, группа 10 по сравнению с группой 1, группой 2 и т. д.).

Таблица 7. Влияние даратумумаба на выживаемость в группах по варианту обработки в мышинной модели ксенотрансплантата ALL.

Группа	Обработка	Макс. выживаемость (дни)	Медианная выживаемость (дни)	Значимость (p)
1	CAR-T-клетки к CD19	28	25	0,0079
2	CAR-T-клетки к CD19+DARA	44	42	0,0079
5	NK-клетки+DARA	31	30	0,0079
7	CAR-T-клетки к CD19+NK	28	28	0,0079
8	CAR-T-клетки к CD19+NK+DARA	44	42	0,0079
10	PBS	22	22	0,0079

Пример 11. Даратумумаб усиливает противоопухолевую активность CAR-T-клеток к ВСМА и продлевает выживаемость в мышинной модели ксенотрансплантата множественной миеломы.

Эффект комбинирования даратумумаба с обработкой CAR-T-клетками к ВСМА тестировали на модели подкожного ксенотрансплантата MM.1S на иммунодефицитных мышях NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Sug}/JicTac). Вкратце, самок мышей NOG в возрасте от 5 до 8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы и содержали в условиях отсутствия патогенов. Каждое животное получало подкожную инокуляцию в правый бок 5×10^6 клеток MM.1S в 50% матригеле. Когда средний объем опухоли достигал 150 мм^3 (примерно от 125 до 175 мм^3), мышей случайным образом разделяли на группы по 5 мышей в группе. Тестируемые группы включали группу с отсутствием обработки, группы обработки отдельно даратумумабом, обработки отдельно CAR-T-клетками к ВСМА (в низкой дозе или высокой дозе) и обработки CAR-T-клетками к ВСМА (в низкой дозе или высокой дозе) в комбинации с даратумумабом. CAR-T-клетки к ВСМА вводили посредством внутривенной инъекции в количестве $0,8 \times 10^6$ (низкая доза) или $2,4 \times 10^6$ (высокая доза) CAR⁺-Т-клеток в день 0. Даратумумаб вводили IP в дозе 15 мг/кг, два раза в неделю, начиная за 2 дня до введения CAR-T-клеток к ВСМА.

Объем опухоли и значения массы тела измеряли дважды в неделю и отдельных мышей умерщвляли, когда объем их опухоли достигал $\geq 2000 \text{ мм}^3$. В случае обеих протестированных доз CAR-T-клеток к ВСМА самую высокую эффективность в отношении ингибирования опухоли наблюдали в группе комбинированной обработки по сравнению с каждой группой отдельной обработки. Дополнительно, в группе комбинированной обработки наблюдали пролонгированную выживаемость при обработке как низкой дозой (**фиг. 14А**), так и высокой дозой (**фиг. 14В**) CAR-T-клеток к ВСМА, по сравнению с любой группой отдельной обработки даратумумабом или CAR-T-клетками к ВСМА. Объем опухоли в день 26 показан на **фиг. 14С**. Животные, которых обрабатывали отдельно либо высокой дозой CAR-T-клеток к ВСМА, либо даратумумабом, демонстрировали средний объем опухоли, составляющий $\sim 1500 \text{ мм}^3$ (1486 мм^3 и 1475 мм^3 , соответственно), в то время как средний объем опухоли в группе комбинированной обработки составлял в среднем 668 мм^3 (**фиг. 14С**).

В целом, по данным результатам видно, что комбинация CAR-T-клеток к ВСМА и даратумумаба демонстрировала повышенную эффективность как в подавлении опухоли, так и в увеличении выживаемости на мышинной модели множественной миеломы по сравнению с CAR-T-клетками к ВСМА или даратумумабом, вводимыми отдельно.

ТАБЛИЦА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	Отредактированный ген TRAC	AAGAGCAACAAATCTGACT
2	Отредактированный ген TRAC	AAGAGCAACAGTGCTGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT
3	Отредактированный ген TRAC	AAGAGCAACAGTGCTGGAGCAACAAATCTGACT

	й ген TRAC	
4	Отредактированны й ген TRAC	AAGAGCAACAGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT
5	Отредактированны й ген TRAC	AAGAGCAACAGTGCCTGACT
6	Отредактированны й ген TRAC	AAGAGCAACAGTGCCTGTGGGCCTGGAGCAACAAAT CTGACT
7	Отредактированны й ген TRAC	AAGAGCAACAGTGCCTGGCCTGGAGCAACAAATCTG ACT
8	Отредактированны й ген TRAC	AAGAGCAACAGTGCCTGTGTGCCTGGAGCAACAAAT CTGACT
9	Отредактированны й ген B2M	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT GCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCT CCCGCT
10	Отредактированны й ген B2M	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT GCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCT CCCGCT
11	Отредактированны й ген B2M	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT GGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCG CT
12	Отредактированны й ген B2M	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT GGATAGCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCT ACCCTCCCGCT
13	Отредактированны й ген B2M	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTATCCAGCGTGAG TCTCTCCTACCCTCCCGCT
14	Отредактированны й ген B2M	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT GTGGCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTAC CCTCCCGCT
15	sgRNA	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaau aaggcuaguccguuuucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcuuuu
16	sgRNA	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaau aaggcuaguccguuuucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc
17	sgRNA	n ₍₁₇₋ 30)guuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaauaaggcuaguccguuauc

		aacuugaaaaaguggcaccgagucggugcu ₍₁₋₈₎
18	Немодифицированная sgRNA для TRAC	AGAGCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU
19	Немодифицированный спейсер sgRNA для TRAC	AGAGCAACAGUGCUGUGGCC
20	Немодифицированная sgRNA для B2M	GCUACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU
21	Немодифицированный спейсер sgRNA для B2M	GCUACUCUCUCUUUCUGGCC
22	Модифицированная sgRNA для TRAC *: остаток 2'-О-метилфосфотиоата	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U
23	Модифицированный спейсер sgRNA для TRAC *: остаток 2'-О-метилфосфотиоата	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCC
24	Модифицированная sgRNA для B2M *: остаток 2'-О-метилфосфотиоата	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U
25	Модифицированный спейсер sgRNA для B2M *: остаток 2'-О-метилфосфотиоата	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCC
26	Целевая последовательность TRAC с PAM	AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (TGG)

27	Целевая последовательность B2M с PAM	GCTACTCTCTCTTTCTGGCC (TGG)
28	Иллюстративная целевая последовательность TRAC	5'-AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3'
29	Иллюстративная целевая последовательность B2M	5'- GCTACTCTCTCTTTCTGGCC-3'
30	Сигнальный пептид	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP
31	Сигнальный пептид	MALPVTALLLPLALLLHAARP
32	Трансмембранный домен CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY
33	Нуклеотидная последовательность 4-1BB	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAA ACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAG AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAAGAA GAAGAAGGAGGATGTGAACTG
34	Аминокислотная последовательность 4-1BB	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE GGCEL
35	Нуклеотидная последовательность CD28	TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATG AATATGACTCCTCGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAA ACATTACCAACCCTATGCCCCCCCACGAGACTTCGC TGCGTACAGGTCC
36	Аминокислотная последовательность CD28	SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFA AYRS
37	Нуклеотидная последовательность CD3-дзета	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGC ATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAAC TGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTT GATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGG GTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCAAGAAGGACTC

		TACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGC CTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGAC GGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTG AGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCA TATGCAGGCCCTGCCTCCCAGA
38	Аминокислотная последовательность CD3-дзета	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
39	CAR к CD19 FMC63-28Z (FMC63-CD8[tm]- CD28[костимулиру ющий домен]- CD3z)	ATGCTTCTTTTGGTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGAAC TTCCTCATCCAGCGTTCTTGCTGATCCCCGATATTC AGATGACTCAGACCACCAGTAGCTTGTCTGCCTCAC TGGGAGACCGAGTAACAATCTCCTGCAGGGCAAGT CAAGACATTAGCAAATACCTCAATTGGTACCAGCA GAAGCCCGACGGAACGGTAAACTCCTCATCTATC ATACGTCAAGGTTGCATTCCGGAGTACCGTCACGAT TTTCAGGTTCTGGGAGCGGAACTGACTATTCCTTGA CTATTTCAAACCTCGAGCAGGAGGACATTGCGACA TATTTTTGTCAACAAGGTAATACCCTCCCTTACACT TTCGGAGGAGGAACCAAACCTCGAAATTACCGGGTC CACCAGTGGCTCTGGGAAGCCTGGCAGTGGAGAAG GTTCCACTAAAGGCGAGGTGAAGCTCCAGGAGAGC GGCCCCGGTCTCGTTGCCCCCAGTCAAAGCCTCTCT GTAACGTGCACAGTGAGTGGTGTATCATTGCCTGAT TATGGCGTCTCCTGGATAAGGCAGCCCCCGCGAAA GGGTCTTGAATGGCTTGGGGTAATATGGGGCTCAG AGACAACGTATTATAACTCCGCTCTCAAAGTCGCT TGACGATAATAAAAGATAACTCCAAGAGTCAAGTT TTCCTTAAAATGAACAGTTTGCAGACTGACGATACC GCTATATATTATTGTGCTAAACATTATTACTACGGC GGTAGTTACGCGATGGATTATTGGGGGCAGGGGAC TTCTGTACAGTCAGTAGTGCTGCTGCCTTTGTCCC GGTATTTCTCCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGC CCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTC TCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACC

		<p>CGCCGCCGGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCTTGG ACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGG CGGGTACGTGCGGGCCTCTTTTGTGTCACTCGTTA TACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGC GGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGA CTCCTCGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTAC CAACCCTATGCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTAC AGGTCCCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGC TCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATA ACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGAC GTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAT GGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCAAGAA GGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGC GGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAAC GACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAA GGGTTGAGTACGGCAACCAAGATACGTACGATGC ACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGA</p>
40	<p>CAR к CD19 Аминокислотная последовательность FMC63-28Z (FMC63-CD8[tm]- CD28[костимулиру ющий домен]- CD3z)</p>	<p>MLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTSSLSASLGD RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRL HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGN TLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQ ESGPNLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLVGIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFL KMNSLQTDDBTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTS VTVSSAAAFVFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGD GLYQGLSTATKDTYDALHMALPPR</p>
41	<p>Левый ITR (5' ITR)</p>	<p>TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT GAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGG CTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGT TCCT</p>

42	Левый ITR (5' ITR) (альтернативный)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGCCCGGGCGTTCGGGCGACCTTTGGTTCGCCCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAACTCCATCACTAGGGGGTTCCT
43	Правый ITR (3' ITR)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC TGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTTCGGGCGACCTTTGGTTCGCCCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAA
44	Правый ITR (3' ITR) (альтернативный)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC TGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCA AAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
45	TRAC-LHA (800 п. о.)	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCC TTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGAC GCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCA ATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTC CCAACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTC TGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCC AGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTT TTCCCATGCCTGCCTTACTCTGCCAGAGTTATATT GCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAG AATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGG TTCCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAAC GTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGCCCAAGATTGAT AGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGA GCAGCTGGTTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAG CATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCC GCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTG GGTTGGGGCAAAGAGGGGAAATGAGATCATGTCCTA ACCCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCC TGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATC CAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGA TTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTG ATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATG AGGTCTATGGACTTCA
46	TRAC-RHA (800 п. о.)	TGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGC CTTCAACAACAGCATTATCCAGAAGACACCTTCTT CCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGC AGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTG CCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACCTCCTCT GATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAA CCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTG GCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGAT GAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCA GCCTCAGTCTCTCAAACCTGAGTTCCCTGCCTGCCTGC CTTTGCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCTTCTAG GCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCT TATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCAGCT CACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCA CCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCA GGTGTGAAAGTGGAGGAATTA AAAAGTCAGATGAG

		GGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATCTAGTTGGGG GAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAAC TTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAA AACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGC TCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTA CCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGG ACAGGAGCTCAATGAGAAAGG
47	EF1a	GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATC GCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCTG GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGG GTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCG CCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAA GTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACG GGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGT GGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGC CCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGT ACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTG GGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCC CCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGG CGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCT TCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGC CATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTT TTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAG ATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGG GCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGT TCGGCGAGGCGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAG AATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTG CTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCC CGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCA GTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCC TGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCT CGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAG GAAAAGGGCCTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATG TGACTIONACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACC TCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTT TAGGTTGGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTT CCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCC

		AGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGC CCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCT CAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTAG GTGTCGTGA
48	Кодирующая последовательность сигнального пептида GM-CSF	ATGCTTCTTTTGGTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGAAC TTCCTCATCCAGCGTTCTTGCTGATCCCC
49	Кодирующая последовательность scFv к CD19	GATATTCAGATGACTCAGACCACCAGTAGCTTGTCT GCCTCACTGGGAGACCGAGTAACAATCTCCTGCAG GGCAAGTCAAGACATTAGCAAATACCTCAATTGGT ACCAGCAGAAGCCCCGACGGAACGGTAAACTCCTC ATCTATCATAACGTCAAGGTTGCATTCCGGAGTACCG TCACGATTTTCAGGTTCTGGGAGCGGAACTGACTAT TCCTTGACTATTTCAAACCTCGAGCAGGAGGACATT GCGACATATTTTTGTCAACAAGGTAATACCCTCCCT TACACTTTCGGAGGAGGAACCAAACCTCGAAATTAC CGGGTCCACCAGTGGCTCTGGGAAGCCTGGCAGTG GAGAAGGTTCCACTAAAGGCGAGGTGAAGCTCCAG GAGAGCGGCCCCGGTCTCGTTGCCCCAGTCAAAG CCTCTCTGTAACGTGCACAGTGAGTGGTGTATCATT GCCTGATTATGGCGTCTCCTGGATAAGGCAGCCCC GCGAAAGGGTCTTGAATGGCTTGGGGTAATATGGG GCTCAGAGACAACGTATTATAACTCCGCTCTCAA AGTCGCTTGACGATAATAAAAGATAACTCCAAGAG TCAAGTTTTCTTAAATGAACAGTTTGCAGACTGA CGATACCGCTATATATTATTGTGCTAAACATTATTA CTACGGCGGTAGTTACGCGATGGATTATTGGGGGC AGGGGACTTCTGTACAGTCAGTAGT
50	Аминокислотная последовательность scFv к CD19 Линкер подчеркнут	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT <u>GSTSGS</u> <u>GKPGSGEGSTKGEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVS</u> GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNS ALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS
51	Внеклеточная часть CD8a+трансмембра нная часть CD8a+5' линкер (подчеркнут)	<u>GCTGCTGCCTTTGTCCC</u> GGTATTTCTCCCAGCCAAA CCGACCACGACTCCC GCCCGCGCCCTCCGACACCC GCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGC CCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGT TCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTA CATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGGCCTCCT TTTGTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCAC AGGAATCGC
52	Внеклеточная часть CD8a+трансмембра нная часть CD8a (без линкера)	TTTGTCCC GG TATTTCTCCCAGCCAAACCGACCACG ACTCCC GCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACC ATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCGAGGCA TGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTTCATACGAG GGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGC TCCGTTGGCGGGTACGTGCGGGCCTTTTGTGTC

		ACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCG C
53	Внеклеточная часть CD8a+трансмембра нная часть CD8a	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT LYCNHRNR
54	VH к CD19	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNS KSQVFLKMNSLQTDDBTAIYYCAKHYYYGGSYAMDY WGQGTSVTVSS
55	VL к CD19	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT
56	Линкер CD19	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
57	CD19 rAAV,	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCAC GCGTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAA GGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTT AGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAACCTCT ATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAG ATTTCCCAACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCC CATTCTGCTAATGCCAGCCTAAGTTGGGGAGACC ACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGG GCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTACTCTGCCAGAGTT ATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATA AAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTT CAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCTGGCCGT GAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTGGCCAAGAT TGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATC ACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTAT AAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAG CCCCGCCCTTGTCATCACTGGCATCTGGACTCCAG CCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGT CCTAACCTGATCCTCTTGTCACAGATATCCAGA ACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTA AATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATT TTGATTCTCAAACAATGTGTCACAAAGTAAGGATT CTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGAC ATGAGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTGCCCCGTCA GTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGA AGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCC TAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACCTGGGAAAGTG ATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTG GGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTG AACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACA CAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGG CCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAAT TACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCC GAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAG GCCTTGCCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTG AGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCG

	TGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTG CTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGAT GACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTC TTGTA AATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTT CGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGT GCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGGCGGGGCCT GCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT CTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCG CGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGG CTGGCCCGGTTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAG ATGGCCGCTTCCC GGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAA AATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGG TGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGT CCTCAGCCGTTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACC GGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCT TTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGT TTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGG AGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAA TTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTT GGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTT TTTTTCTTCCATTT CAGGTGTCGTGACCACCATGCTT CTTTTGGTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGAACTTCCTC ATCCAGCGTTCTTGCTGATCCCCGATATTCAGATGA CTCAGACCACCAGTAGCTTGTCTGCCTCACTGGGAG ACCGAGTAACAATCTCCTGCAGGGCAAGTCAAGAC ATTAGCAAATACCTCAATTGGTACCAGCAGAAGCC CGACGGAACGGTAAA ACTCCTCATCTATCATA CGTC AAGGTTGCATTCCGGAGTACCGTCACGATTTTCAGG TTCTGGGAGCGGAACTGACTATTCTTGACTATTTTC AAACCTCGAGCAGGAGGACATTGCGACATATTTTT GTCAACAAGGTAATAACCCTCCCTTACACTTTCGGAG GAGGAACCAA ACTCGAAATTACCGGGTCCACCAGT GGCTCTGGGAAGCCTGGCAGTGGAGAAGGTTCCAC TAAAGGCGAGGTGAAGCTCCAGGAGAGCGGCCCCG GTCTCGTTGCCCCAGTCAAAGCCTCTCTGTAACGT GCACAGTGAGTGGTGTATCATTGCCTGATTATGGCG TCTCCTGGATAAGGCAGCCCCCGGAAAGGGTCTT GAATGGCTTGGGGTAATATGGGGCTCAGAGACAAC GTATTATAACTCCGCTCTCAAAGTCGCTTGACGAT AATAAAAGATAACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTA AAATGAACAGTTTGCAGACTGACGATACCGCTATA TATTATTGTGCTAAACATTATTACTACGGCGGTAGT TACGCGATGGATTATTGGGGGCAGGGGACTTCTGT CACAGTCAGTAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATT TCTCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGC GCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAAC CTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCG CCGGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCTTGGACTTC GCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGT ACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTT TGTATTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGGAGT AGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCT
--	--

		<p>CGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACC CTATGCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTC CCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGG CATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAA CTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCT TGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGG GGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCAAGAAGGACT CTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGG CCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGA CGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTT GAGTACGGCAACCAAGATACGTACGATGCACTGC ATATGCAGGCCCTGCCTCCAGATAATAATAAAAT CGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTT GTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCA AACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACAC CTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGC CTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAG GTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAAC TCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCA CCAAAACCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTT GTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAG CAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTG GCCAGCCTCAGTCTCTCCAAGTGGTTCCTGCCTG CCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTTACTGCTCT TCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCC TCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTCC CAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATT ACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATG CACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAAGTCAG ATGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGT TGGGGGAGCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAA ATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTT GAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGA AGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCA GCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGG CCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGTAACCACG TGCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGA ACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCA AAGG TCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG</p>
58	CD19 LHA-RHA	<p>GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCC TTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGAC GCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAAACCTCTATCA ATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCC CCAACCTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATT TGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGGAGACCACTCC AGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTT TTTCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATT GCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAG AATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAAG TTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAAC</p>

GTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGAT
AGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGA
GCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAG
CATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCC
GCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTG
GGTTGGGGCAAAGAGGGGAAATGAGATCATGTCCTA
ACCCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCC
TGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATC
CAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGA
TTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTG
ATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATG
AGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTG
GGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGT
TGGGGGGAGGGGTCCGGCAATTGAACCGGTGCCTAG
AGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGT
CGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGG
AGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGG
TAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCT
TTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTA
CCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCT
TCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTT
GCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTG
AGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGA
ATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTC
GATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCT
GCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA
AATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCCGTT
TTTGGGGCCCGGGCGGGCGACGGGGCCCGTGCGTC
CCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAG
CGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAA
GCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCG
CCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGC
CCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGC
CGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGG
AGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTC
ACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAG
CCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGC
CGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGA
GTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATG
CGATGGAGTTTCCCACACTGAGTGGGTGGAGACT
GAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATCTCC
TTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCA
TTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTC
TTCCATTTAGGTGTCGTGACCACCATGCTTCTTTTG
GTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGAACTTCCTCATCCA
GCGTTCTTGCTGATCCCCGATATTCAGATGACTCAG
ACCACCAGTAGCTTGTCTGCCTCACTGGGAGACCG
AGTAACAATCTCCTGCAGGGCAAGTCAAGACATTA
GCAAATACCTCAATTGGTACCAGCAGAAGCCCGAC
GGAACGGTAAAACTCCTCATCTATCATAACGTCAAG
GTTGCATTCCGGAGTACCGTCACGATTTTCAGGTTT

TGGGAGCGGA ACTGACTATTCCTTGACTATTTCAA
CCTCGAGCAGGAGGACATTGCGACATATTTTTGTCA
ACAAGGTAATACCCTCCCTTACACTTTCGGAGGAG
GAACCAA ACTCGAAATTACCGGGTCCACCAGTGGC
TCTGGGAAGCCTGGCAGTGGAGAAGGTTCCACTAA
AGGCGAGGTGAAGCTCCAGGAGAGCGGCCCCCGTC
TCGTTGCCCCCAGTCAAAGCCTCTCTGTAACGTGCA
CAGTGAGTGGTGTATCATTGCCTGATTATGGCGTCT
CCTGGATAAGGCAGCCCCCGCGAAAGGGTCTTGAA
TGGCTTGGGGTAATATGGGGCTCAGAGACAACGTA
TTATAACTCCGCTCTCAAAGTCGCTTGACGATAAT
AAAAGATAACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAAA
TGAACAGTTTGCAGACTGACGATACCGCTATATATT
ATTGTGCTAAACATTATTACTACGGCGGTAGTTACG
CGATGGATTATTGGGGGCAGGGGACTTCTGTACA
GTCAGTAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTC
CCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCC
TCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCT
TAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCGCCG
GGGGTGCTGTTCATAACGAGGGGCTTGGACTTCGCTT
GTGATATTTACATTTGGGGCTCCGTTGGCGGGTACGT
GCGGCGTCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTTTGTA
TTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGGAGTAGGT
TGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCTCGCC
GGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTAT
GCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCG
AGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCAT
ATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTG
AATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGA
TAAACGCCGGGGGAGAGACCCGAAATGGGGGGT
AAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTA
CAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCT
ACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGG
GGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAG
TACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATA
TGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATAAATCGCT
ATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGT
GTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACG
CCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCT
TCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCG
CAGGCTGTTTCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCT
GCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAACTCCTC
TGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAA
ACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTCT
GGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGA
TGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCC
AGCCTCAGTCTCTCAACTGAGTTCCTGCCTGCCTG
CCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCTTCTA
GGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTC
CTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCAG
CTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACC
CACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCAC

		<p>CAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAGTCAGATG AGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGG GGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATA ACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAG AAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGG GCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATAACCAGCC CTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCT GGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGG</p>
59	CD38	<p>MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRALCLGVLSILVLILVVV LAVVVPRWRQQWSGPGTTKRFETVLARCVKYTEIH PEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLM KLGQTVPCKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLED TLLGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNN PVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKN STFGSVEVHNLQPEKVQTLEAWVIHGGREDSRDLCQ DPTIKELESIISKRNIFSCKNYRDPDKFLQCVKNPEDSS CTSEI</p>
60	mRNA CD38	<p>ATGGCCA ACTGCGAGTTCAGCCCGGTGTCCGGGGA CAAACCCTGCTGCCGGCTCTCTAGGAGAGCCCAAC TCTGTCTTGGCGTCAGTATCCTGGTCCTGATCCTCG TCGTGGTGCTCGCGGTGGTCGTCCCGAGGTGGCGCC AGCAGTGGAGCGGTCCGGGCACCACCAAGCGCTTT CCCGAGACCGTCCTGGCGCGATGCGTCAAGTACAC TGAAATTCATCCTGAGATGAGACATGTAGACTGCC AAAGTGTATGGGATGCTTTCAAGGGTGCATTTATTT CAAACATCCTTGCAACATTACTGAAGAAGACTAT CAGCCACTAATGAAGTTGGGAACTCAGACCGTACC TTGCAACAAGATTCTTCTTTGGAGCAGAATAAAAG ATCTGGCCCATCAGTTCACACAGGTCCAGCGGGAC ATGTTACCCCTGGAGGACACGCTGCTAGGCTACCTT GCTGATGACCTCACATGGTGTGGTGAATTCAACACT TCCAAAATAAACTATCAATCTTGCCAGACTGGAG AAAGGACTGCAGCAACAACCCTGTTTCAGTATTCTG GAAAACGGTTTCCCGCAGGTTTGCAGAAGCTGCCT GTGATGTGGTCCATGTGATGCTCAATGGATCCCGCA GTAAAATCTTTGACAAAAACAGCACTTTTGGGAGT GTGGAAGTCCATAATTTGCAACCAGAGAAGGTTCA</p>

		GACACTAGAGGCCTGGGTGATACATGGTGGGAAGAG AAGATTCCAGAGACTTATGCCAGGATCC CACCATAAAAGAGCTGGAATCGATTATAAGCAAAA GGAATATTCAATTTTCCTGCAAGAATATCTACAGAC CTGACAAGTTTCTTCAGTGTGTGAAAAATCCTGAGG ATTCATCTTGCACATCTGAGATCTGA
61	полная последовательность тяжелой цепи даратумумаба	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFTFN SFAMSWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGGTY ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAED TAVYFCAKDK ILWFGPEVFD YWGQGTLLVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSV VTPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYK TTP PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNV FSC SVMHEALHNH Y TQKSLSLSP GK
62	вариабельная область тяжелой цепи даратумумаба	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGPEVFD YWGQGTLLVTVSSAS
63	полная последовательность легкой цепи даратумумаба	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP QAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPS FIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN R GEC
64	вариабельная область легкой цепи даратумумаба	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP

		EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ GTKVEIK
65	CDR1 тяжелой цепи даратумумаба	SFAMS
66	CDR2 тяжелой цепи даратумумаба	AISGSGGGTY YADSVKG
67	CDR3 тяжелой цепи даратумумаба	DKILWFGEPV FDY
68	CDR1 легкой цепи даратумумаба	RASQSVSSYL A
69	CDR2 легкой цепи даратумумаба	DASNRAT
70	CDR3 легкой цепи даратумумаба	QQRSNWPPT
71	sgRNA CD70 (E1_T7)	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGCguuuuagagcuagaaauagcaaguuuuuuagggcuaguccguuuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU
72	sgRNA CD70 (E1_T8)	GCCCGCAGGACGCACCCAUAguuuuagagcuagaaauagcaaguuuuuuagggcuaguccguuuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU
73	sgRNA PD-1	CUGCAGCUUCUCCAACACAUguuuuagagcuagaaauagcaaguuuuuuagggcuaguccguuuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU
74	CD70 LHA-RHA (scFV к CD70B с 41BB)	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCC TTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGAC GCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCA ATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTC CCAACCTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTC TGCTAATGCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCC AGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTT TTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATT GCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAG AATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAGG TTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAAC

GTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGAT
AGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGA
GCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAG
CATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCC
GCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTG
GGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTA
ACCCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCC
TGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATC
CAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGA
TTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTG
ATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATG
AGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTG
GGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGT
TGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAG
AGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGT
CGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGG
AGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGG
TAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCT
TTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTA
CCTACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCT
TCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTT
GCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTG
AGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGA
ATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTC
GATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCT
GCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA
AATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCCGGTT
TTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTC
CCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAG
CGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAA
GCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCG
CCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGC
CCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGC
CGCTTCCC GGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGG

AGGACGCGGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTC
ACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCTCAG
CCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGC
CGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGG
GTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATG
CGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACT
GAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCC
TTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCA
TTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTC
TTCCATTTAGGTGTCGTGACCACCATGGCGCTTCC
GGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGTTGCT
CCACGCAGCAAGGCCGCAGGTCCAGTTGGTGCAA
GCGGGGCGGAGGTGAAAAAACCCGGCGCTTCCGTG
AAGGTGTCCTGTAAGGCGTCCGGTTATACGTTACG
AACTACGGGATGAATTGGGTTCCGCAAGCGCCGGG
GCAGGGACTGAAATGGATGGGGTGGATAAATACCT
ACACCGGCGAACCTACATACGCCGACGCTTTTAAA
GGGCGAGTCACTATGACGCGCGATACCAGCATATC
CACCGCATACATGGAGCTGTCCCGACTCCGGTCAG
ACGACACGGCTGTCTACTATTGTGCTCGGGACTATG
GCGATTATGGCATGGACTACTGGGGTCAGGGTACG
ACTGTAACAGTTAGTAGTGGTGGAGGCGGCAGTGG
CGGGGGGGGAAGCGGAGGAGGGGGTTCTGGTGAC
ATAGTTATGACCCAATCCCCAGATAGTTTGGCGGTT
TCTCTGGGCGAGAGGGCAACGATTAATTGTCGCGC
ATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGGATATTCTTTTAT
GCATTGGTACCAGCAAAAACCCGGACAACCGCCGA
AGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGTCTG
GGGTGCCGACCGATTTTCTGGTAGTGGAAGCGGA
ACTGACTTTACGCTCACGATCAGTTCAGTGCAGGCT
GAGGATGTAGCGGTCTATTATTGCCAGCACAGTAG
AGAAGTCCCCTGGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAG
TAGAAATTAAGTGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTAT
TTCTCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGC
GCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAAC

CTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCG
CCGGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCTTGGACTTC
GCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGT
ACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTT
TGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGA
AAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATG
AGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTG
TAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGAT
GTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGAC
GCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTA
TAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATG
ACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAA
ATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGA
AGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGG
CGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAA
CGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCA
AGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATG
CACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCAGATAATAAT
AAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGT
TTTTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATG
TGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAG
ACACCTTCTTCCCCAGCCAGGTAAGGGCAGCTTTG
GTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGG
CCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTA
AAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATT
GCCACCAAACCCCTCTTTTACTAAGAAACAGTGA
GCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAA
AAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGC
ACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAACTGAGTTCCT
GCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTTACT
GCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAG
TTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATC
TTTCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACT
CATTAAACCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATG
AATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAG

		<p>TCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTC TAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGT CCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAG GGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCA GGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGAT ACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATA GAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGG</p>
75	<p>Нуклеотидная последовательност ь CAR к CD70 (scFV к CD70B с 41BB)</p>	<p>ATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTG GCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTCCA GTTGGTGCAAAGCGGGGCGGAGGTGAAAAACCCG GCGCTTCCGTGAAGGTGTCCTGTAAGGCGTCCGGTT ATACGTTACGAACACTACGGGATGAATTGGGTTCGC CAAGCGCCGGGGCAGGGACTGAAATGGATGGGGTG GATAAATACCTACACCGGCGAACCTACATACGCCG ACGCTTTTAAAGGGCGAGTCACTATGACGCGCGAT ACCAGCATATCCACCGCATACATGGAGCTGTCCCG ACTCCGGTCAGACGACACGGCTGTCTACTATTGTGC TCGGGACTATGGCGATTATGGCATGGACTACTGGG GTCAGGGTACGACTGTAACAGTTAGTAGTGGTGGA GGCGGCAGTGGCGGGGGGGGAAGCGGAGGAGGGG GTTCTGGTGACATAGTTATGACCCAATCCCCAGATA GTTTGGCGGTTTCTCTGGGCGAGAGGGCAACGATT AATTGTCGCGCATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGG ATATTCTTTTATGCATTGGTACCAGCAAAAACCCGG ACAACCGCCGAAGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAA TCTTGAGTCTGGGGTGCCGGACCGATTTTCTGGTAG TGGAAGCGGAACTGACTTTACGCTCACGATCAGTTC ACTGCAGGCTGAGGATGTAGCGGTCTATTATTGCCA GCACAGTAGAGAAGTCCCCTGGACCTTCGGTCAAG GCACGAAAGTAGAAATTAAGAGTGCTGCTGCCTTT GTCCCGGTATTTCTCCCAGCCAAACCGACCACGACT CCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATC GCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGC CGACCCGCGCCGGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGG CTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCC</p>

		<p>GTTGGCGGGTACGTGCGGGCGTCCTTTTGTGTGCACT CGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAA ACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAAC AACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAG GAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGA AGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCC GAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAG AATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCG CGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGA GAGACCCGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAA GAATCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGA AGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGT ATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACG ATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAA GATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCT CCCAGATAA</p>
76	<p>Аминокислотная последовательность CAR к CD70 (scFV к CD70B с 41BB)</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMG WINTYTGEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQTTVTVSSGG GGSGGGSGGGSGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINC RASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRE VPWTFGQGTKVEIKSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRKRGRKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPP R</p>
77	<p>CD70A Нуклеотидная последовательность scFv</p>	<p>GATATAGTTATGACCCAATCACCCGATAGTCTTGCG GTAAGCCTGGGGGAGCGAGCAACAATAAACTGTGCG GGCATCAAAATCCGTCAGTACAAGCGGGTATTCAT TCATGCACTGGTATCAACAGAAACCCGGTCAGCCA</p>

		<p>CCCAAGCTCCTGATTTATCTTGCGTCTAATCTTGAG TCCGGCGTCCCAGACCGGTTTTCCGGCTCCGGGAGC GGCACGGATTTTACTCTTACTATTTCTAGCCTTCAG GCCGAAGATGTGGCGGTATACTACTGCCAGCATTC AAGGGAAGTTCCTTGGACGTTTCGGTCAGGGCACGA AAGTGGAAATTAAGGCGGGGGGGGATCCGGCGG GGGAGGGTCTGGAGGAGGTGGCAGTGGTCAGGTCC AACTGGTGCAGTCCGGGGCAGAGGTAAAAAACCC GGCGCGTCTGTAAAGGTTTCATGCAAGGCCAGTGG ATATACTTTCACCAATTACGGAATGAACTGGGTGA GGCAGGCCCTGGTCAAGGCCTGAAATGGATGGGA TGGATAAACACGTACACCGGTGAACCTACCTATGC CGATGCCTTTAAGGGTCGGGTACGATGACGAGAG ACACCTCCATATCAACAGCCTACATGGAGCTCAGC AGATTGAGGAGTGACGATACGGCAGTCTATTACTG TGCAAGAGACTACGGCGATTATGGCATGGATTACT GGGGCCAGGGCACTACAGTAACCGTTTCCAGC</p>
78	<p>CD70A Аминокислотная последовательност ь scFv (линкер подчеркнут)</p>	<p>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMH WYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDF TLTISSLQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIK<u>G</u> <u>GGGSGGGGSGGGGSGQVQLVQSGAEVKKPGASVKV</u> SCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTY TGEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDT AVYYCARDYGDYGM DYWGQGT TTVTVSS</p>
79	<p>CD70B Нуклеотидная последовательность scFv</p>	<p>CAGGTCCAGTTGGTGCAAAGCGGGGCGGAGGTGAA AAAACCCGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCCTGTAAGG CGTCCGGTTATACGTTACGAACTACGGGATGAATT GGGTTCCGCAAGCGCCGGGGCAGGGACTGAAATGG ATGGGGTGGATAAATACCTACACCGGCGAACCTAC ATACGCCGACGCTTTTAAAGGGCGAGTCACTATGA CGCGCGATAACCAGCATATCCACCGCATACATGGAG CTGTCCCGACTCCGGTCAGACGACACGGCTGTCTAC TATTGTGCTCGGGACTATGGCGATTATGGCATGGAC TACTGGGGTCAGGGTACGACTGTAACAGTTAGTAG TGGTGGAGGCGGCAGTGGCGGGGGGGGAAGCGGA</p>

		GGAGGGGGTTCTGGTGACATAGTTATGACCCAATC CCCAGATAGTTTGGCGGTTTCTCTGGGCGAGAGGG CAACGATTAATTGTCGCGCATCAAAGAGCGTTTCA ACGAGCGGATATTCTTTTATGCATTGGTACCAGCAA AAACCCGGACAACCGCCGAAGCTGCTGATCTACTT GGCTTCAAATCTTGAGTCTGGGGTGCCGGACCGATT TTCTGGTAGTGGAAGCGGAACTGACTTTACGCTCAC GATCAGTTCCTGACAGGCTGAGGATGTAGCGGTCT ATTATTGCCAGCACAGTAGAGAAGTCCCCTGGACC TTCGGTCAAGGCACGAAAGTAGAAATTA
80	CD70В Аминокислотная последовательност ь scFv (линкер подчеркнут)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMN WVRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPYADAFKGRVT MTRDTSISTAYMELSR LR SDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGT TVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQ SPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQK PGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIK
81	VH к CD70	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMN WVRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPYADAFKGRVT MTRDTSISTAYMELSR LR SDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGT TVTVSS
82	VL к CD70	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMH WYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDF TLTISSLQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIK
83	rAAV BCMA	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGCCCGGGCGTGGGGCGACCTTGGTGGCCCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCAC GCGTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAA GGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTT AGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCT ATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAG ATTTCCCAACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCC CATTCTGCTAATGCCAGCCTAAGTTGGGGAGACC ACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGG

		GCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTT ATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATA AAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTT CAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGT GAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGAT TGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATC ACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTAT AAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAG CCCCGCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAG CCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGT CCTAACCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGA ACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTA AATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATT TTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATT CTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGAC ATGAGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTGCCCGTCA GTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGA AGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCC TAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTG ATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTG GGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTG AACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACA CAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGG CCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCCTTGAAT TACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCC GAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAG GCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTG AGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCG TGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTG CTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGAT GACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTC TTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTT CGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGT GCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCT GCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT
--	--	--

	CTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCG CGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGG CTGGCCCGGTTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAG ATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAA AATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGG TGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGT CCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACC GGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCT TTTGGAGTACGTCTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGT TTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGG AGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAA TTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTT GGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTT TTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGACCACCATGGC GCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCT GTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTGCAGCTGG TGCAGAGCGGAGCCGAGCTCAAGAAGCCCGGAGCC TCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCAACAC CCTGACCAACTACGTGATCCACTGGGTGAGACAAG CCCCCGCCAAAGGCTGGAGTGGATGGGCTACATC CTGCCCTACAACGACCTGACCAAGTACAGCCAGAA GTTCCAGGGCAGGGTGACCATCACCAGGGATAAGA GCGCCTCCACCGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTG AGGAGCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGTACAAG GTGGGACTGGGACGGCTTCTTTGACCCCTGGGGCC AGGGCACAACAGTGACCGTCAGCAGCGGCGGCGGA GGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGCGGAA GCGAAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACACTG AGCGTGAGCCCTGGCGAGAGGGCCAGCATCTCCTG CAGGGCTAGCCAAAGCCTGGTGCACAGCAACGGCA ACACCCACCTGCACTGGTACCAGCAGAGACCCGGA CAGGCTCCCAGGCTGCTGATCTACAGCGTGAGCAA CAGGTTCTCCGAGGTGCCTGCCAGGTTTAGCGGCA GCGGAAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGC AGCGTGGAGTCCGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGC
--	--

AGCCAGACCAGCCACATCCCTTACACCTTCGGCGG
CGGCACCAAGCTGGAGATCAAAGTGCTGCTGCCT
TTGTCCCGGTATTTCTCCCAGCCAAACCGACCACGA
CTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCA
TCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCAT
GCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTCATACGAGG
GGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCT
CCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCA
CTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGC
AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAA
ACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAG
AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAA
GAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTC
CCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGAC
AGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGC
CGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGG
GAGAGACCCGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGA
AAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCA
GAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAG
GTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCA
CGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCA
AAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTG
CCTCCCAGATAATAATAAAATCGCTATCCATCGAA
GATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAAC
AAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAAC
AGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCAGCCCA
GGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTC
CTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTC
TGGTCAATGATGTCTAAAACCTCCTCTGATTGGTGGT
CTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAACCTCTTTTT
ACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTCTGGCAGTCCAG
AGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAG
GTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCT
CTCCAACCTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAG
ACTGTTTGCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCT

		<p>AAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCC TGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCA GTCTCACGCAGTCACTCATTAAACCCACCAATCACTG ATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAG TGGAGGAATTA AAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCC AGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCT GTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGG AATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTAC CTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAG AAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGC AGGGAGAGGACCCTATAGAGGCTGGGACAGGAG CTCAATGAGAAAGGTAACCACGTGCGGACCGAGGC TGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCA CTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCCG GGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGCTGCCTGCAGG</p>
84	BCMA RHA-LHA	<p>GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCC TTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGAC GCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCA ATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTC CCAACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTC TGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCC AGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTT TTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATT GCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAG AATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAGG TTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAAC GTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGAT AGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGA GCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAG CATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCC GCCCTTGTCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTG GGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTA ACCCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCC</p>

TGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATC
CAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGA
TTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTG
ATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATG
AGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTG
GGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGT
TGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAG
AGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGT
CGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGG
AGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG
TTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGG
TAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCT
TTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTA
CCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCT
TCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTT
GCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTG
AGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGA
ATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTC
GATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCT
GCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA
AATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCCGGTT
TTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTC
CCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAG
CGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAA
GCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCG
CCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGC
CCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGC
CGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGG
AGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTC
ACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCTCAG
CCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGC
CGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGG
GTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATG
CGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACT
GAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCC

	TTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCA TTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTC TTCCATTTAGGTGTCGTGACCACCATGGCGCTTCC GGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGTTGCT CCACGCAGCAAGGCCGCAGGTGCAGCTGGTGCAGA GCGGAGCCGAGCTCAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTG AAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCAACACCCTGAC CAACTACGTGATCCACTGGGTGAGACAAGCCCCG GCCAAAGGCTGGAGTGGATGGGCTACATCCTGCCC TACAACGACCTGACCAAGTACAGCCAGAAGTTCCA GGGCAGGGTGACCATCACCAGGGATAAGAGCGCCT CCACCGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGC GAGGACACCGCTGTGTACTACTGTACAAGGTGGGA CTGGGACGGCTTCTTTGACCCCTGGGGCCAGGGCA CAACAGTGACCGTCAGCAGCGGCGGCGGAGGCAGC GGCGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGCGGAAGCGAAA TCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACACTGAGCGTG AGCCCTGGCGAGAGGGCCAGCATCTCCTGCAGGGC TAGCCAAAGCCTGGTGCACAGCAACGGCAACACCC ACCTGCACTGGTACCAGCAGAGACCCGGACAGGCT CCCAGGCTGCTGATCTACAGCGTGAGCAACAGGTT CTCCGAGGTGCCTGCCAGGTTTAGCGGCAGCGGAA GCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCAGCGTG GAGTCCGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCAGCCA GACCAGCCACATCCCTTACACCTTCGGCGGCGGCA CCAAGCTGGAGATCAAAGTGCTGCTGCCTTTGTCC CGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCG CCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCT CTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGAC CCGCCGCCGGGGGTGCTGTTCATAACGAGGGGCTTG GACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTG GCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTTGTCACCTCGTT ATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGG GGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACC ATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAG
--	--

ATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAA
GGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAG
CGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATC
AGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAG
GAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGA
CCCGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATC
CCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGAT
AAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAA
GGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGC
CTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATAC
GTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAG
ATAATAATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATG
TGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGA
CTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTAT
TCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGG
GCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTT
CAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCA
ATGATGTCTAAAACCTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGC
CTTATCCATTGCCACCAAACCCTCTTTTTACTAAG
AAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATG
ACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCA
GGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAA
CTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTT
GCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCC
CTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTG
CCAAAAAATCTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCA
CGCAGTCACTCATTAAACCACCAATCACTGATTGTG
CCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGG
AATTAAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGA
AGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCT
GGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGT
TTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGG
ACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCT
ACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGA
GGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGA

		GAAAGG
85	Нуклеотидная последовательность CAR к BCMA	ATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTG GCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTGCA GCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGCTCAAGAAGCCCG GAGCCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGC AACACCCTGACCAACTACGTGATCCACTGGGTGAG ACAAGCCCCCGGCCAAAGGCTGGAGTGGATGGGCT ACATCCTGCCCTACAACGACCTGACCAAGTACAGC CAGAAGTTCCAGGGCAGGGTGACCATCACCAGGGA TAAGAGCGCCTCCACCGCCTATATGGAGCTGAGCA GCCTGAGGAGCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGT ACAAGGTGGGACTGGGACGGCTTCTTTGACCCCTG GGGCCAGGGCACAACAGTGACCGTCAGCAGCGGCG GCGGAGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGAGG CGGAAGCGAAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCA CACTGAGCGTGAGCCCTGGCGAGAGGGCCAGCATC TCCTGCAGGGCTAGCCAAAGCCTGGTGCACAGCAA CGGCAACACCCACCTGCACTGGTACCAGCAGAGAC CCGGACAGGCTCCCAGGCTGCTGATCTACAGCGTG AGCAACAGGTTCTCCGAGGTGCCTGCCAGGTTTAG CGGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCA TCAGCAGCGTGGAGTCCGAGGACTTCGCCGTGTATT ACTGCAGCCAGACCAGCCACATCCCTTACACCTTCG GCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAAAGTGCTGCT GCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCCAGCCAAACCGACC ACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCC ACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAG GCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTCATAC GAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTG GGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTT GTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAA TCGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATAT TCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACT CAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGA AGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAG

		<p>TTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCA AGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGG GACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGC CGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTAAACCCC GAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAA CTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGA AATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAA GGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGC AACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGG CCCTGCCTCCCAGA</p>
86	<p>Аминокислотная последовательность CAR к ВСМА</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAELKKPG ASVKVSCKASGNLTNYVIHWVRQAPGQRLEWMGYI LPYNDLTKYSQKFQGRVTITRDKSASTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRWDWDGFFDPWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERASISCRASQS LVHSNGNTHLHWYQQRPGQAPRLLIYSVSNRFSEVPA RFSGSGSGTDFTLTISSEDFAVYYCSQTSHPYTFG GGTKLEIKSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIA QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAG TCGVLLLSLVITLYCNHRNRKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
87	<p>ВСМА Нуклеотидная последовательность scFv</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGCTCAA GAAGCCCGGAGCCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGG CCAGCGGCAACACCCTGACCAACTACGTGATCCAC TGGGTGAGACAAGCCCCGGCCAAAGGCTGGAGTG GATGGGCTACATCCTGCCCTACAACGACCTGACCA AGTACAGCCAGAAGTTCCAGGGCAGGGTGACCATC ACCAGGGATAAGAGCGCCTCCACCGCCTATATGGA GCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCTGTGT ACTACTGTACAAGGTGGGACTGGGACGGCTTCTTTG ACCCCTGGGGCCAGGGCACAACAGTGACCGTCAGC AGCGGCGGCGGAGGCAGCGGCGGCGGCGGCGGAGCGG</p>

		GCGGAGGCGGAAGCGAAATCGTGATGACCCAGAGC CCCGCCACACTGAGCGTGAGCCCTGGCGAGAGGGC CAGCATCTCCTGCAGGGCTAGCCAAAGCCTGGTGC ACAGCAACGGCAACACCCACCTGCACTGGTACCAG CAGAGACCCGGACAGGCTCCCAGGCTGCTGATCTA CAGCGTGAGCAACAGGTTCTCCGAGGTGCCTGCCA GGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTTACC CTGACCATCAGCAGCGTGGAGTCCGAGGACTTCGC CGTGTATTACTGCAGCCAGACCAGCCACATCCCTTA CACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAA
88	BCMA Аминокислотная последовательност ь scFv (линкер подчеркнут)	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSKASGNTLTNYVIHW VRQAPGQRLEWMGYILPYNDLTKYSQKFQGRVTITR DKSASTAYMELSSLRSEDТАVYYCTRWDWDGFFDP WGQGTТVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPAT LSVSPGERASISCRASQSLVHSNGNTHLHWYQQRPGQ APRLLIYSVSNRFSEVPARFSGSGSGTDFTLTISSVESE DFAVYYCSQTSHIPYTFGGGТKLEIK
89	VH к BCMA	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSKASGNTLTNYVIHW VRQAPGQRLEWMGYILPYNDLTKYSQKFQGRVTITR DKSASTAYMELSSLRSEDТАVYYCTRWDWDGFFDP WGQGTТVTVSS
90	VL к BCMA	EIVMTQSPATLSVSPGERASISCRASQSLVHSNGNTHL HWYQQRPGQAPRLLIYSVSNRFSEVPARFSGSGSGTD FTLTISSVESEDFAVYYCSQTSHIPYTFGGGТKLEIK
91	CDR1 VL к CD70 (Kabat)	RASKSVSTSGYSFMH
92	CDR1 VL к CD70 (Chothia)	SKSVSTSGYSF
93	CDR2 VL к CD70 (Kabat)	LASNLES
N/A	CDR2 VL к CD70 (Chothia)	LAS
95	CDR3 VL к CD70 (Kabat)	QHSREVPWT

96	CDR3 VL κ CD70 (Chothia)	SREVPW
97	CDR1 VH κ CD70 (Kabat)	NYGMN
98	CDR1 VH κ CD70 (Chothia)	GYTFTNYGMN
99	CDR2 VH κ CD70 (Kabat)	WINTYTGEPTYADAFKG
100	CDR2 VH κ CD70 (Chothia)	NTYTGE
101	CDR3 VH κ CD70 (Kabat)	DYGDYGMDY
102	CDR3 VH κ CD70 (Chothia)	CARDYGDYGMDYWG
103	CDR1 VL κ BCMA (Kabat и Chothia)	RASQSLVHSNGNTHLH
104	CDR2 VL κ BCMA (Kabat и Chothia)	SVSNRFS
105	CDR3 VL κ BCMA (Kabat)	SQTSHIPYT
105	CDR3 VL κ BCMA (Chothia)	SQTSHIPYT
106	CDR1 VH κ BCMA (Kabat)	NYVIH
107	CDR1 VH κ BCMA (Chothia)	GNTLTNY
108	CDR2 VH κ BCMA (Kabat)	YILPYNDLTKYSQKFQG
109	CDR2 VH κ BCMA (Chothia)	LPYNDL
110	CDR3 VH κ BCMA (Kabat)	WDWDGFFDP
110	CDR3 VH κ BCMA (Chothia)	WDWDGFFDP

111	<p>CAR к CD33</p> <p>Донор</p> <p>LHA-RHA</p> <p>Костимулирующий домен 41BB</p>	<p>GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCC TTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGAC GCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCA ATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTT CCCAACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATT CTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTC CAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCT TTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATA TTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAA AGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTC AGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTG AACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATT GATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCA CGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATA AAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGC CCCGCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGC CTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTC CTAACCCCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAA CCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTA AATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATT TTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGAT TCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGA CATGAGGTCTATGGACTTCAggctccggtgcccgtcagtgggca gagcgcacatgccccacagtccccgagaagttggggggaggggtcggcaattga accggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgctgtactg gctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgt gaacgttcttttcgaacggggttgcgccagaacacaggaagtccggtgtgtggtt cccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattactccact ggctgcagtagctgattcttgatcccagcttcgggttggaaagtgggtgggagagttc gaggccttgcgcttaaggagccccctcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgg gcgctggggccgccgcgtcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgtgctttt cgataagtcctagccatttaaaattttgatgacctgctgcgacgctttttctggcaag atagctttagtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttggggccgcg ggcggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctg cgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgct</p>
-----	---	---

		<p>ctggtgcctggcctcgcgcccgctgtatcggcccgccctgggcggcaaggctgg cccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccgccctgctgc agggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcac ccacacaaaggaaaaggcctttccgtcctcagccgtcgttcatgtgactccacgg agtaccgggcgccgtccaggeacctcgattagtctcagcttttggaglacgtcgc tttaggtggggggaggggtttatgcgatggagttccccacactgagtggtggag actgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaaattgccctttttagtt tggatcttgggtcattctcaagcctcagacagtgggtcaagttttttctccattcaggt gtcgtgaCCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCT CCTCCCCTTGGCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCC GGAAATCGTCCTCACACAATCCCCGGGGAGCCTCG CAGTCAGTCCTGGGGAACGAGTCACTATGAGCTGC AAATCCAGTCAGAGTGTTTTTTCTCAAGTAGCCAG AAGAACTACCTCGCATGGTACCAACAAATACCGGG GCAATCTCCCCGCTTGCTTATATACTGGGCAAGTAC CCGCGAATCCGGCGTACCGGATCGATTCACGGGAT CTGGGTCAGGTA CTGATTTCACTTTGACTATCAGCT CTGTT CAGCCTGAAGATTTGGCAATTTACTACTGTC ACCAATACTTGAGTAGCCGA ACTTTCGGCCAGGGC ACGAAGCTCGAAATCAAGGGCGGAGGGGGAGGTT CTGGTGGGGGCGGTTCTGGCGGTGGAGGAAGCCAA GTACAGTTGCAACAGCCAGGGGCGGAGGTTCGTA ACCTGGGGCGTCTGTCAAGATGAGCTGTAAAGCAA GTGGATACACCTTCACCTCCTACTATATACATTGGA TTAAGCAA ACTCCGGGTCAGGGGCTGGAATGGGTT GGCGTTATATACCCCGGGAACGATGATATATCATA CAACCAAAAATTTCAAGGCAAGGCGACTCTGACTG CCGATAAGAGTAGCAC AACAGCTTACATGCAGCTT TCTTCCCTGACCAGCGAAGATTCAGCAGTTTACTAC TGCGCTCGGGAAGTGCGCCTGCGATACTTTGATGTC TGGGGTCAAGGAACTACAGTTACTGTATCAAGCAG TGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAA ACCGACCAGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACAC CCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTC GCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCCGGGGGTGCT</p>
--	--	--

GTTCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATT
TACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGGCGTC
CTTTTGTGTGCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATC
ACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCT
GTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTAC
AAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGA
TTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCG
AGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCAT
ATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTG
AATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGA
TAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGT
AAACCCCGAAGAAAGAATCCCAAGAAGGACTCTA
CAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCT
ACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACG
GGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGA
GTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCAT
ATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATAAAATCG
CTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTGT
GTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAA
CGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCT
TCTTCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCT
TCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGT
TCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAACTC
CTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACC
AAAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGT
TCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGC
AGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGG
CCCAGCCTCAGTCTCTCCAAGTTCCTGCCTGC
CTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCTT
CTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCT
CTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCC
AGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTA
CCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGC
ACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAGTCAGA
TGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTT

		<p>GGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAA TAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTG AGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGA AGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCA GCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAG GCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGG</p>
112	<p>CAR к CD33 Костимулирующий домен 41BB</p>	<p>CCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCC CCTTGGCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGGAA ATCGTCCTCACACAATCCCCGGGGAGCCTCGCAGT CAGTCCTGGGGAACGAGTCACTATGAGCTGCAAAT CCAGTCAGAGTGTTTTTTTCTCAAGTAGCCAGAAGA ACTACCTCGCATGGTACCAACAAATACCGGGGCAA TCTCCCCGCTTGCTTATATACTGGGCAAGTACCCGC GAATCCGGCGTACCGGATCGATTCACGGGATCTGG GTCAGGTACTGATTTCACTTTGACTATCAGCTCTGT TCAGCCTGAAGATTTGGCAATTTACTACTGTCACCA ATACTTGAGTAGCCGAACTTTCGGCCAGGGCACGA AGCTCGAAATCAAGGGCGGAGGGGGAGGTTCTGGT GGGGGCGGTTCTGGCGGTGGAGGAAGCCAAGTACA GTTGCAACAGCCAGGGGCGGAGGTCGTAAAACCTG GGGCGTCTGTCAAGATGAGCTGTAAAGCAAGTGGA TACACCTTCACCTCCTACTATATACATTGGATTAAG CAAACCTCCGGGTCAGGGGCTGGAATGGGTTGGCGT TATATACCCCGGGAACGATGATATATCATAACAACC AAAAATTTCAAGGCAAGGCGACTCTGACTGCCGAT AAGAGTAGCACAAACAGCTTACATGCAGCTTTCTTC CCTGACCAGCGAAGATTCAGCAGTTTACTACTGCG CTCGGGAAGTGCGCCTGCGATACTTTGATGTCTGG GGTCAAGGAACTACAGTTACTGTATCAAGCAGTGC TGCTGCCTTTGTCCCAGGATTTCTCCCAGCCAAACC GACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCG CTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCC CCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTT CATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTAC</p>

		<p>ATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTT TTGTTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACA GGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTAT ATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAAC TACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTTC CAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGT GAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATC AGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAAT TTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAA ACGCCGGGGGAGAGACCCGAAATGGGGGGTAAA CCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAA TGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACT CAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGG AAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTA CGGCAACCAAGATACGTACGATGCACTGCATATG CAGGCCCTGCCTCCAGATAATAATAAAATCGCTA TCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTG</p>
113	<p>scFv к CD33 Линкер подчеркнут</p>	<p>EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSQKNY LAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGT DFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIK<u>G</u> <u>GGGGSGGGSGGGGSQVQLQQPGA</u>EVVKPGASVKM SCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDD ISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVY YCAREVRLRYFDVWGQGTITVTVSS</p>
114	<p>scFv к CD33</p>	<p>GAAATCGTCCTCACACAATCCCCGGGGAGCCTCGC AGTCAGTCCTGGGGAACGAGTCACTATGAGCTGCA AATCCAGTCAGAGTGTTTTTTTTCTCAAGTAGCCAGA AGAACTACCTCGCATGGTACCAACAAATACCGGGG CAATCTCCCCGCTTGCTTATACTGGGCAAGTACC CGCGAATCCGGCGTACCGGATCGATTCACGGGATC TGGGTCAGGTA CTGATTTCACTTTGACTATCAGCTC TGTTCA GCCTGAAGATTTGGCAATTTACTACTGTCA CCAATACTTGAGTAGCCGA ACTTTTCGGCCAGGGCA CGAAGCTCGAAATCAAGGGCGGAGGGGGAGGTTCT</p>

		GGTGGGGGCGGTTCTGGCGGTGGAGGAAGCCAAGT ACAGTTGCAACAGCCAGGGGCGGAGGTCGTAAAAC CTGGGGCGTCTGTCAAGATGAGCTGTAAAGCAAGT GGATACACCTTCACCTCCTACTATATACATTGGATT AAGCAAACCTCCGGGTCAGGGGCTGGAATGGGTTGG CGTTATATACCCCGGGAACGATGATATATCATAACA ACCAAAAATTTCAAGGCAAGGCGACTCTGACTGCC GATAAGAGTAGCACAAACAGCTTACATGCAGCTTTC TCCCTGACCAGCGAAGATTCAGCAGTTTACTACTG CGCTCGGGAAGTGCGCCTGCGATACTTTGATGTCTG GGGTCAAGGAACTACAGTTACTGTATCAAGC
115	CAR к CD33 Костимулирующий домен 41BB	MALPVTALLLPLALLHAARPEIVLTQSPGSLAVSPGE RVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYY CHQYLSSRTFGQGTKLEIKGGGGGSGGGGSGGGGSQ VQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWI KQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQGKATLTAD KSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWG QGTTVTVSSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVITLYCNHRNRKRGRKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
116	VH антитела к CD33	QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHW IKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQGKATLTAD KSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWG QGTTVTVSS
117	VL антитела к CD33	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNY LAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGT DFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIK
118	Антитело к CD33 CDR1 VH (Kabat)	SYIHW

119	Антитело к CD33 CDR2 VH (Kabat)	VIYPGNDDISYNQKFQG
120	Антитело к CD33 CDR3 VH (Kabat)	EVRLRYFDV
121	Антитело к CD33 CDR1 VL (Kabat и Chothia)	KSSQSVFFSSSQKNYLA
122	Антитело к CD33 CDR2 VL (Kabat и Chothia)	WASTRES
123	Антитело к CD33 CDR3 VL (Kabat и Chothia)	HQYLSRT
124	CDR1 VL к CD19 (Kabat)	RASQDISKYLN
125	CDR2 VL к CD19 (Kabat)	HTSRLHS
126	CDR3 VL к CD19 (Kabat)	QQGNTLPYT
127	CDR1 VH к CD19 (Kabat)	DYGVS
128	CDR2 VH к CD19 (Kabat)	VIWGSETTYYNSALKS
129	CDR3 VH к CD19 (Kabat)	HYYYGGSYAMDY
124	CDR1 VL к CD19 (Chothia)	RASQDISKYLN
125	CDR2 VL к CD19 (Chothia)	HTSRLHS

126	CDR3 VL к CD19 (Chothia)	QQGNTLPYT
130	CDR1 VH к CD19 (Chothia)	GVSLPDY
131	CDR2 VH к CD19 (Chothia)	WGSET
129	CDR3 VH к CD19 (Chothia)	HYYYGGSYAMDY
132	CDR1 VH к CD33 (Chothia)	GYTFTSY
94	CDR2 VH к CD33 (Chothia)	YPGNDD
120	CDR3 VH к CD33 (Chothia)	EVRLRYFDV

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Все признаки, раскрытые в настоящем описании, могут быть объединены в любой комбинации. Каждый признак, раскрытый в настоящем описании, может быть заменен альтернативным признаком для той же, эквивалентной или сходной цели. Таким образом, если явно не указано иное, каждый раскрытый признак является только примером общего ряда эквивалентных или сходных признаков.

Из приведенного выше описания специалист в данной области может легко установить существенные характеристики настоящего изобретения и, не выходя за рамки его сути и объема, может внести различные изменения и модификации настоящего изобретения для адаптации его к различным путям применения и условиям. Таким образом, другие варианты осуществления также находятся в пределах формулы изобретения.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Хотя в данном документе были описаны и проиллюстрированы несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, специалисты в данной области легко смогут представить множество других средств и/или структур для выполнения функции, и/или получения результатов, и/или одно или нескольких преимуществ, описанных в данном документе, и каждый из таких вариантов и/или модификаций считается находящимся в пределах объема вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. В более общем плане специалисты в данной области легко поймут, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в

данном документе, предназначены для примера, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или путей применения, при которых используются идеи настоящего изобретения. Специалисты в данной области поймут или смогут установить с применением не более чем стандартного эксперимента многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Следовательно, следует понимать, что вышеупомянутые варианты осуществления представлены только в качестве примера и что в пределах прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов варианты осуществления настоящего изобретения могут быть реализованы на практике иным образом, чем как конкретно описано и заявлено. Варианты осуществления настоящего изобретения по настоящему раскрытию направлены на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанные в данном документе. Кроме того, в объем настоящего изобретения по настоящему раскрытию включена любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не являются взаимно несовместимыми.

Все определения, как определено и используется в данном документе, следует понимать как имеющие приоритет над определениями из словаря, определениями в документах, включенных посредством ссылки, и/или обычными значениями определенных терминов.

Все ссылочные материалы, патенты и заявки на патенты, раскрытые в данном документе, включены посредством ссылки в отношении заявляемого объекта, для которого каждые из них цитируются, что в некоторых случаях может охватывать весь документ.

Форму единственного числа, используемую в данном документе в описании и формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как "по меньшей мере один".

Фразу "и/или", используемую в данном документе в описании и в формуле изобретения, следует понимать как означающую "один или оба" из элементов, соединенных таким образом, т. е. элементов, которые в одних случаях присутствуют вместе, а в других случаях присутствуют раздельно. Множественные элементы, перечисленные с помощью "и/или", следует толковать одинаково, т. е. "один или несколько" элементов, соединенных таким образом. Необязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных союзом "и/или", независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на "А и/или В" при использовании в сочетании с открытой фразой, такой как "содержащий", может относиться в одном варианте осуществления только к А (необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления только к В (необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления одновременно к

А и В (необязательно включая другие элементы) и т. д.

Используемый в данном документе в описании и формуле изобретения союз "или" следует понимать как имеющий то же значение, что и "и/или", как определено выше. Например, при разделении пунктов в перечне союзы "или" или "и/или" следует интерпретировать как включающие, т. е. включающие по меньшей мере один, но также включающие более одного из числа или перечня элементов и необязательно дополнительные элементы, не внесенные в перечень. Только термины, явно указывающие на обратное, такие как "только один из" или "ровно один из" или, при использовании в формуле изобретения, "состоящий из", будут относиться к включению ровно одного элемента из числа или перечня элементов. В целом, термин "или", используемый в данном документе, следует интерпретировать только как указывающий на исключаящие альтернативы (т. е. "один или другой, но не оба"), если ему предшествуют термины исключительности, такие как "любой", "один из", "только один из" или "ровно один из". Термин "состоящий по сути из" при использовании в формуле изобретения имеет обычное значение, используемое в области патентного права.

Используемая в данном документе в описании и в формуле изобретения фраза "по меньшей мере один" применительно к перечню из одного или нескольких элементов, как следует понимать, означает по меньшей мере один элемент, выбранный из любых одного или нескольких элементов в перечне элементов, но необязательно включая по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно перечисленного в перечне элементов, и не исключая любые комбинации элементов в перечне элементов. Данное определение также допускает, что элементы могут необязательно присутствовать помимо элементов, конкретно обозначенных в перечне элементов, к которым относится фраза "по меньшей мере один", независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера "по меньшей мере один из А и В" (или, что эквивалентно, "по меньшей мере один из А или В" или, что эквивалентно, "по меньшей мере один из А и/или В") может относиться в одном варианте осуществления к по меньшей мере одному А, необязательно включая более одного, без присутствия В (и необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления к по меньшей мере одному В, необязательно включая более одного, без присутствия А (и необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления к по меньшей мере одному А, необязательно включая более одного, и к по меньшей мере одному В, необязательно включая более одного (и необязательно включая другие элементы), и т. д.

Также следует учитывать, что, если явно не указано иное, в любых заявляемых в данном документе способах, которые предусматривают более чем одну стадию или одно действие, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничивается порядком, в котором стадии или действия способа упоминаются.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ улучшения клинического исхода у субъекта, получающего терапию на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), при этом способ включает введение субъекту эффективного количества популяции сконструированных Т-клеток человека, экспрессирующих CAR (CAR-Т-клеток), где сконструированные CAR-Т-клетки человека содержат нарушенный МНС класса I, и где субъект получил или получает эффективное количество ингибитора NK-клеток, за счет чего обеспечивается улучшение клинического исхода у субъекта.

2. Способ улучшения клинического исхода у субъекта, получающего терапию на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), при этом способ включает введение субъекту эффективного количества ингибитора NK-клеток, где субъект получил или получает эффективное количество популяции сконструированных Т-клеток человека, экспрессирующих CAR (CAR-Т-клеток), и где сконструированные CAR-Т-клетки человека содержат нарушенный МНС класса I, вследствие чего снижается активность NK-клеток у субъекта, за счет чего обеспечивается улучшение клинического исхода у субъекта.

3. Способ улучшения клинического исхода у субъекта, получающего терапию на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), при этом способ включает введение субъекту эффективного количества

(a) эффективного количества ингибитора NK-клеток и

(b) эффективного количества популяции сконструированных Т-клеток человека, экспрессирующих CAR (CAR-Т-клеток), где сконструированные CAR-Т-клетки человека содержат нарушенный МНС класса I, за счет чего обеспечивается улучшение клинического исхода у субъекта.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где улучшенный клинический исход предусматривает одно или несколько из следующего:

(i) снижение активности натуральных киллерных (NK) клеток у субъекта;

(ii) повышение клинического ответа на терапию на основе CAR-Т-клеток у субъекта, который необязательно повышается по сравнению с терапией на основе CAR-Т-клеток в отдельности или по сравнению с терапией, предусматривающей только ингибитор NK-клеток;

(iii) повышение степени сохраняемости сконструированных CAR-Т-клеток человека у субъекта и

(iv) снижение степени клеточного лизиса сконструированных CAR-Т-клеток человека у субъекта, где необязательно клеточный лизис сконструированных CAR-Т-клеток человека уменьшается у субъекта на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% по сравнению с субъектом, получающим сконструированные CAR-Т-клетки человека без ингибитора NK-клеток.

5. Способ по п. 4, где в (ii) повышение клинического ответа является аддитивным или синергическим.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где субъект представляет собой пациента с раком, и где улучшенный клинический исход предусматривает одно или несколько из следующего:

- (i) уменьшение размера опухоли или количеств опухолевых клеток у субъекта и
- (ii) повышение противоопухолевого ответа у субъекта.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где экспрессия МНС класса I сконструированными CAR-T-клетками человека подавлена.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где сконструированные CAR-T-клетки человека содержат нарушенный ген бета-2-микроглобулина (B2M).

9. Способ по любому из пп. 1-8, где сконструированные CAR-T-клетки человека содержат нарушенный ген HLA-A, HLA-B или HLA-C.

10. Способ по любому из пп. 1-6, где сконструированные CAR-T-клетки человека содержат

(i) нарушенный ген константной области альфа-цепи T-клеточного рецептора (TRAC);

(ii) нарушенный ген B2M и

(iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где CAR содержит эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает опухолевый антиген.

12. Способ по п. 11, где опухолевый антиген представляет собой CD19, CD33, CD70 или BCMA.

13. Способ по любому из пп. 8-12, где по меньшей мере 50% сконструированных CAR-T-клеток человека не экспрессируют поверхностный белок B2M на обнаруживаемом уровне.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где ингибитор NK-клеток уменьшает количество NK-клеток, ингибирует активность NK-клеток или обеспечивает и то и другое.

15. Способ по п. 14, где ингибитор NK-клеток уменьшает количество NK-клеток на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%.

16. Способ по любому из пп. 1-15, где ингибитор NK-клеток уменьшает количество NK-клеток посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплементзависимой цитотоксичности (CDC), апоптоза или любых их комбинаций.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где ингибитор NK-клеток представляет собой малую молекулу, моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, полинуклеотид или их комбинации.

18. Способ по любому из пп. 1-16, где ингибитор NK-клеток представляет собой антитело, которое специфически связывает CD38.

19. Способ по п. 18, где антитело представляет собой даратумумаб, SAR650984 или MOR202 или его антигенсвязывающий фрагмент.

20. Способ по п. 19, где антитело представляет собой антитело, которое

связывается с тем же эпитопом, что и даратумумаб, и/или конкурирует с даратумумабом за связывание с CD38.

21. Способ по п. 20, где антитело содержит такие же определяющие комплементарность области тяжелой цепи и легкой цепи, что и даратумумаб.

22. Способ по п. 21, где антитело содержит такую же переменную область тяжелой цепи и такую же переменную область легкой цепи, что и даратумумаб.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где ингибитор NK-клеток не приводит к существенному уменьшению количества эндогенных T-клеток.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где ингибитор NK-клеток не активирует сконструированные CAR-T-клетки человека.

25. Способ по любому из пп. 1-24, где ингибитор NK-клеток вводят одновременно с введением популяции сконструированных CAR-T-клеток человека.

26. Способ по любому из пп. 1-24, где популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека вводят перед введением ингибитора NK-клеток.

27. Способ по любому из пп. 1-24, где ингибитор NK-клеток вводят перед введением популяции сконструированных CAR-T-клеток человека.

28. Способ по любому из пп. 1-27, где способ дополнительно включает схему предварительной подготовки перед введением популяции сконструированных CAR-T-клеток человека.

29. Способ по п. 28, где схема предварительной подготовки включает схему лимфодеплеции.

30. Способ по п. 29, где популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека вводят через по меньшей мере 48 часов после применения схемы лимфодеплеции.

31. Способ по п. 30, где популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека вводят через по меньшей мере два дня, по меньшей мере три дня, по меньшей мере четыре дня, по меньшей мере пять дней, по меньшей мере шесть дней или по меньшей мере семь дней после применения схемы лимфодеплеции.

32. Способ по п. 30 или п. 31, где популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека вводят через не более чем семь дней после применения схемы лимфодеплеции.

33. Способ по любому из пп. 29-32, где схему лимфодеплеции применяют в течение по меньшей мере одного дня, по меньшей мере двух дней, по меньшей мере трех дней или по меньшей мере четырех дней.

34. Способ по любому из пп. 29-33, где популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека вводят в период от 48 часов до семи дней после применения схемы лимфодеплеции, и где схему лимфодеплеции применяют в течение двух-трех дней.

35. Способ по любому из пп. 1-34, дополнительно включающий введение субъекту последующей дозы ингибитора NK-клеток.

36. Способ по п. 35, где последующую дозу ингибитора NK-клеток вводят субъекту, когда количества NK-клеток у субъекта восстанавливаются до приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% от количества NK-клеток до

введения ингибитора НК-клеток.

37. Способ по любому из пп. 1-36, где популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека вводят посредством одной или нескольких внутривенных инфузий.

38. Способ по любому из пп. 1-36, где популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека вводят посредством однократной внутривенной инфузии.

39. Способ по любому из пп. 1-36, где популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека вводят посредством более чем одной внутривенной инфузии.

40. Способ по любому из пп. 1-39, где ингибитор НК-клеток вводят посредством одной или нескольких внутривенных инфузий.

41. Способ по п. 40, где ингибитор НК-клеток представляет собой даратумумаб, который вводят в дозе от 1 до 24 мг/кг.

42. Способ по п. 40 или п. 41, где ингибитор НК-клеток представляет собой даратумумаб, который вводят в виде инфузии однократной дозы, составляющей 16 мг/кг.

43. Способ по п. 42, где ингибитор НК-клеток представляет собой даратумумаб, который вводят в виде инфузии дробной дозы, составляющей 8 мг/кг.

44. Способ по п. 43, где дробную дозу вводят в последовательные дни.

45. Способ по любому из пп. 29-44, где схема лимфодеплеции включает введение по меньшей мере одного химиотерапевтического средства.

46. Способ по п. 45, где по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство представляет собой циклофосфамид, флударабин или их комбинацию.

47. Способ улучшения клинического исхода у субъекта, при этом способ включает применение по отношению к субъекту терапии на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), предусматривающей популяцию сконструированных Т-клеток человека, экспрессирующих CAR (CAR-T-клеток), где сконструированные CAR-T-клетки человека содержат (i) нарушенный ген B2M; (ii) нарушенный ген TRAC и (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, и где субъект получил или получает эффективное количество антитела к CD38, за счет чего обеспечивается улучшение клинического исхода у субъекта.

48. Способ улучшения клинического исхода у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества антитела к CD38, где субъект получил или получает терапию на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), предусматривающую популяцию сконструированных Т-клеток человека, экспрессирующих CAR (CAR-T-клеток), где сконструированные CAR-T-клетки человека содержат (i) нарушенный ген B2M; (ii) нарушенный ген TRAC и (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, за счет чего обеспечивается улучшение клинического исхода у субъекта.

49. Способ улучшения клинического исхода у субъекта, при этом способ включает введение субъекту

(а) эффективного количества популяции сконструированных CAR-T-клеток человека, где сконструированные CAR-T-клетки человека содержат (i) нарушенный ген

B2M; (ii) нарушенный ген TRAC и (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR; и
(b) эффективного количества моноклонального антитела к CD38,
за счет чего обеспечивается улучшение клинического исхода у субъекта.

50. Способ по любому из пп. 47-49, где улучшенный клинический исход предусматривает одно или несколько из следующего:

- (i) снижение активности натуральных киллерных (NK) клеток у субъекта;
- (ii) повышение клинического ответа на терапию на основе CAR-T-клеток у субъекта, который необязательно повышается по сравнению с терапией на основе CAR-T-клеток в отдельности или по сравнению с терапией, предусматривающей только ингибитор NK-клеток;
- (iii) повышение степени сохраняемости сконструированных CAR-T-клеток человека у субъекта и
- (iv) снижение степени клеточного лизиса сконструированных CAR-T-клеток человека у субъекта, где необязательно клеточный лизис сконструированных CAR-T-клеток человека уменьшается у субъекта на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% по сравнению с субъектом, получающим сконструированные CAR-T-клетки человека без ингибитора NK-клеток.

51. Способ по п. 50, где в (ii) повышение клинического ответа является аддитивным или синергическим.

52. Способ по любому из пп. 47-51, где субъект представляет собой пациента с раком, и где улучшенный клинический исход предусматривает одно или несколько из следующего:

- (i) уменьшение размера опухоли или количества опухолевых клеток у субъекта и
- (ii) повышение противоопухолевого ответа у субъекта.

53. Способ по любому из пп. 47-52, где CAR содержит эктодомен, который содержит антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с CD19, CD33, BCMA или CD70.

54. Способ по п. 53, где антигенсвязывающий фрагмент связывает BCMA.

55. Способ по п. 54, где антигенсвязывающий фрагмент к BCMA представляет собой scFv к BCMA.

56. Способ по п. 54 или п. 55, где антигенсвязывающий фрагмент к BCMA представляет собой гуманизированный антигенсвязывающий фрагмент к BCMA.

57. Способ по любому из пп. 47-56, где моноклональное антитело к CD38 представляет собой даратумумаб или его антигенсвязывающий фрагмент.

58. Способ по любому из пп. 47-57, дополнительно включающий применение схемы лимфодеплеции, предусматривающей комбинацию флударабина и циклофосфида, вводимых посредством внутривенной инфузии.

59. Способ по п. 58, где субъекту вводят дозу, составляющую приблизительно от 1×10^7 до 3×10^8 сконструированных CAR-T-клеток человека, экспрессирующих CAR на обнаруживаемом уровне, через по меньшей мере 48 часов, но не более чем через семь

дней после терапии с применением лимфодеплеции.

60. Способ по любому из пп. 47-59, где нарушенный ген В2М предусматривает вставку, делецию и/или замену по меньшей мере одной пары нуклеотидных оснований.

61. Способ по п. 60, где нарушенный ген В2М сконструированных CAR-T-клеток человека содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14.

62. Способ по любому из пп. 1-61, где сконструированные CAR-T-клетки человека предусматривают делецию в нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 26 в гене TRAC по сравнению с немодифицированными T-клетками.

63. Способ по любому из пп. 1-62, где по меньшей мере 50% сконструированных CAR-T-клеток человека экспрессируют CAR на обнаруживаемом уровне, и где менее 0,5% популяции клеток экспрессируют TCR на обнаруживаемом уровне.

64. Способ по любому из пп. 1-63, где нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, расположена внутри нарушенного гена TRAC.

65. Композиция, содержащая популяцию сконструированных T-клеток человека с химерным антигенным рецептором (CAR), для применения в терапии на основе CAR-T-клеток в комбинации с эффективным количеством ингибитора NK-клеток для лечения рака, где необязательно сконструированные CAR-T-клетки человека указаны в любом из пп. 1-3, 7-13, 47-49, 53-56 и пп. 60-64, и/или где необязательно ингибитор NK-клеток указан в любом из пп. 14-24 и п. 57.

66. Применение композиции по п. 65 в терапии на основе CAR-T-клеток для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, где первый лекарственный препарат содержит популяцию клеток, предусматривающую сконструированные CAR-T-клетки человека, и где первый лекарственный препарат вводится в комбинации со вторым лекарственным препаратом, содержащим ингибитор NK-клеток и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

67. Набор, содержащий первый лекарственный препарат, содержащий композицию по п. 65, и листок-вкладыш в упаковке, содержащий инструкции по введению композиции в комбинации со вторым лекарственным препаратом, содержащим композицию, которая содержит ингибитор NK-клеток, указанный в п. 65, и необязательный фармацевтически приемлемый носитель, нуждающемуся в этом субъекту.

68. Набор, содержащий первую композицию, содержащую популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека, указанную в п. 65, вторую композицию, содержащую ингибитор NK-клеток, указанный в п. 65, и листок-вкладыш в упаковке, содержащий инструкции по введению первой композиции в комбинации со второй композицией субъекту, нуждающемуся в этом.

69. Набор, содержащий первую композицию, содержащую популяцию сконструированных CAR-T-клеток человека, указанную в п. 65, для применения в терапии на основе CAR-T-клеток, вторую композицию, содержащую ингибитор NK-клеток,

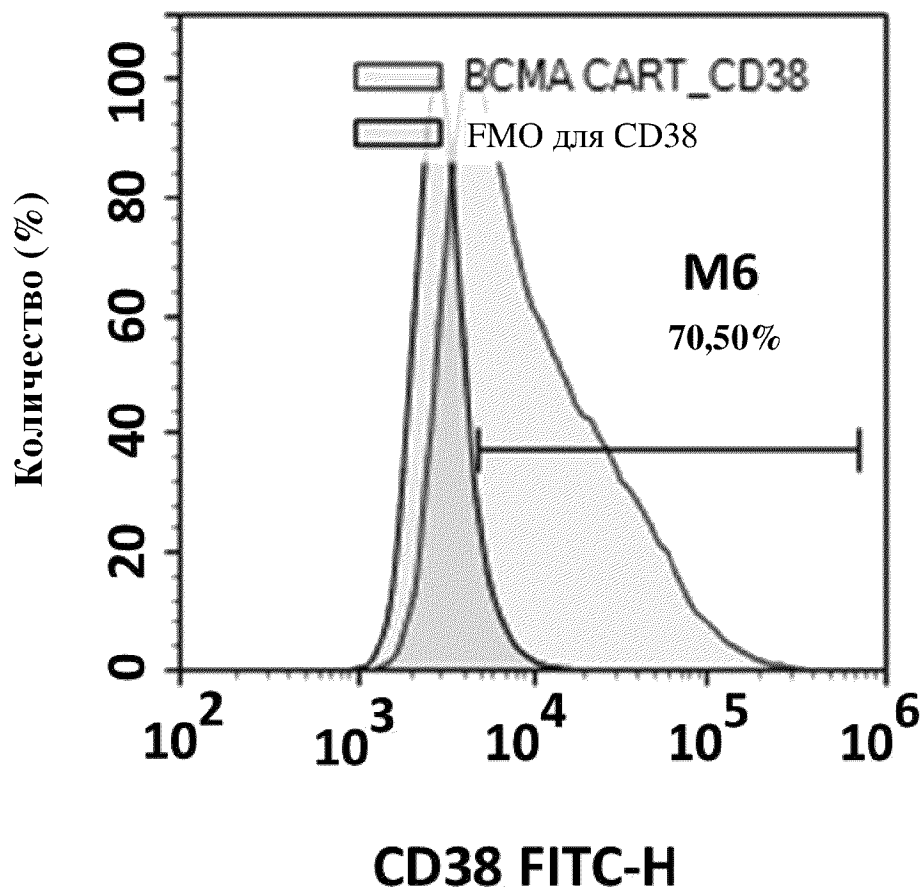
указанный в п. 65, и листок-вкладыш в упаковке, содержащий инструкции по введению первой композиции в комбинации со второй композицией субъекту для лечения рака.

По доверенности

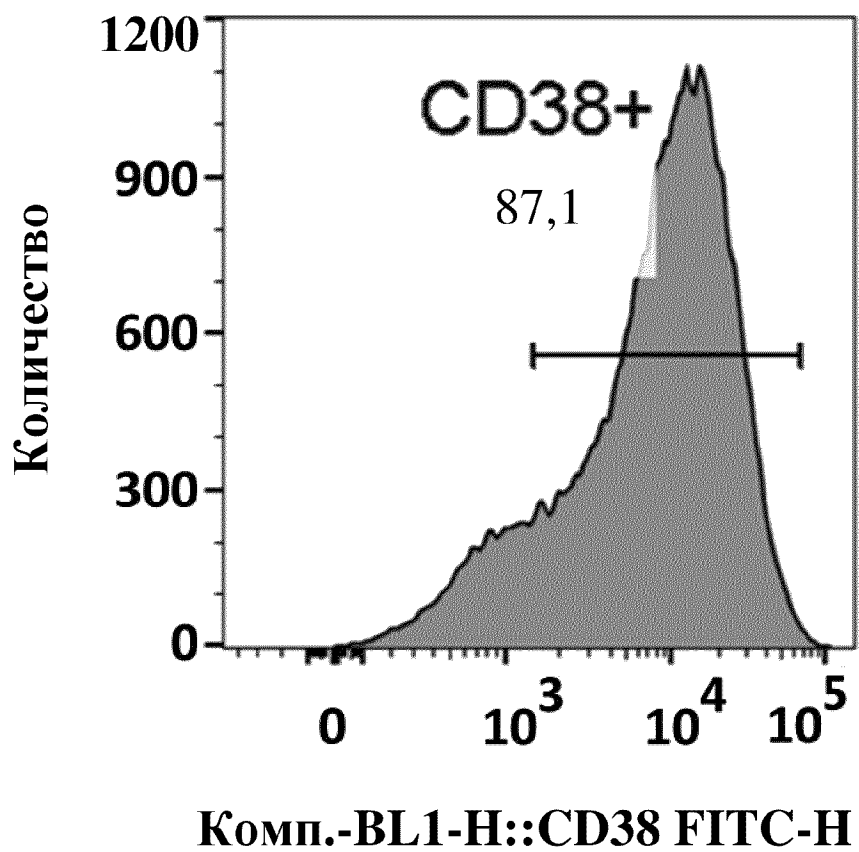
1/43

ФИГ. 1А

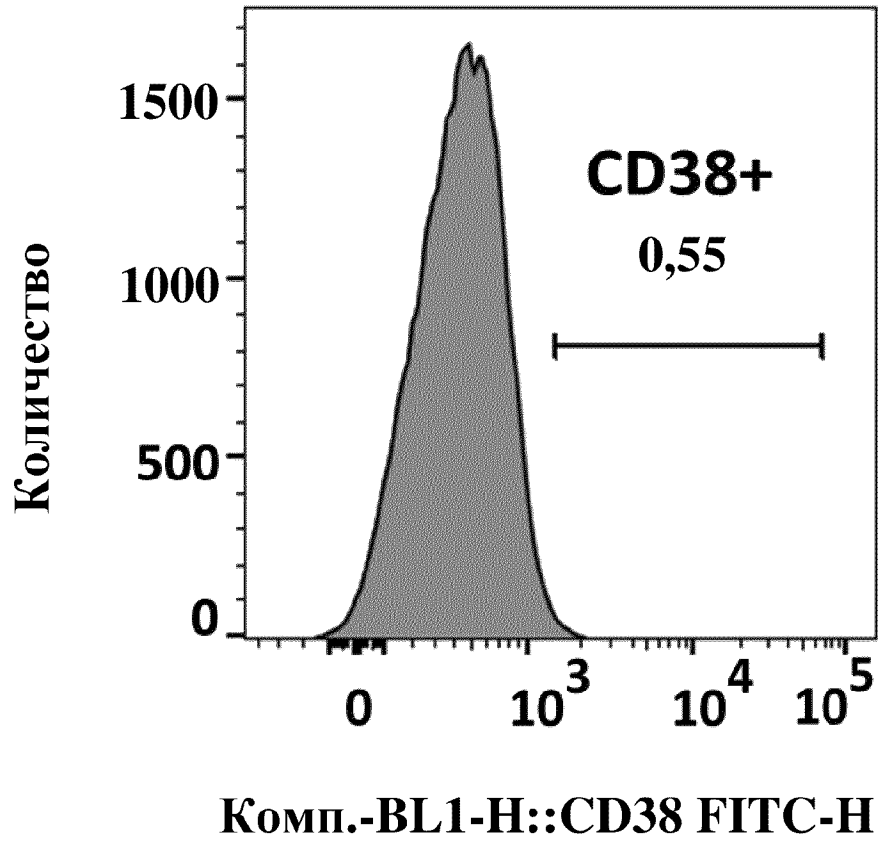
ВСМАСART_CD38/основные/P2/P3/P4/M5



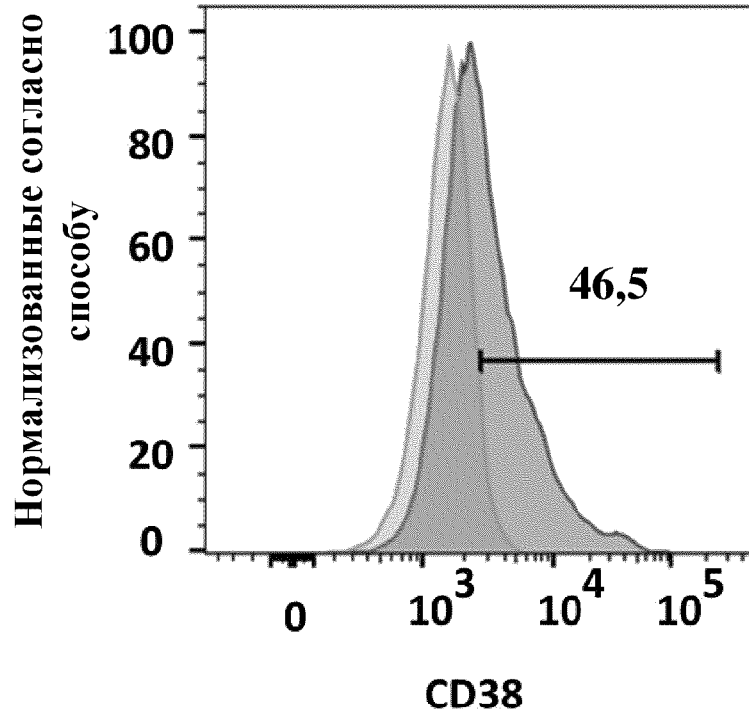
ФИГ. 1В



ФИГ. 1С



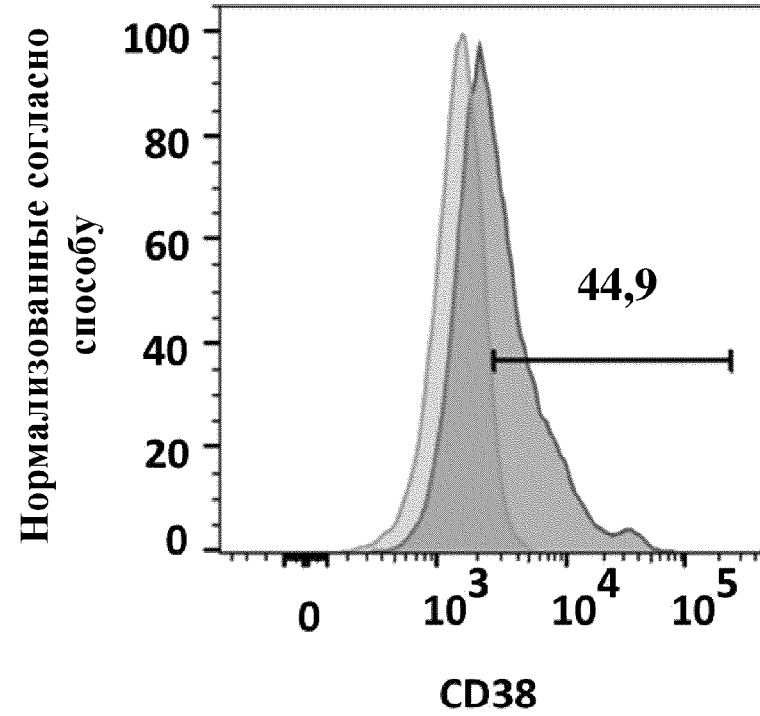
ФИГ. 2А



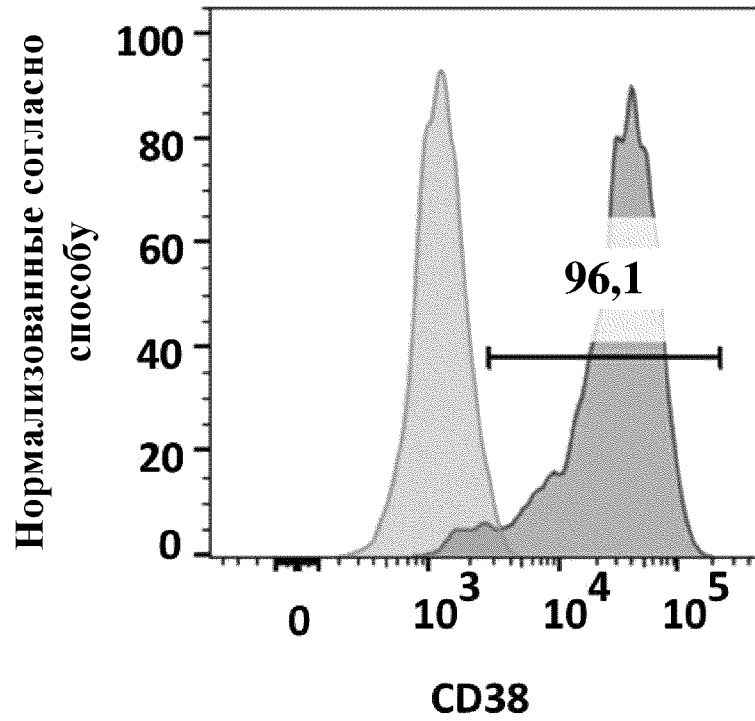
→ CD38-T-cells

ФИГ. 2В

10% complement



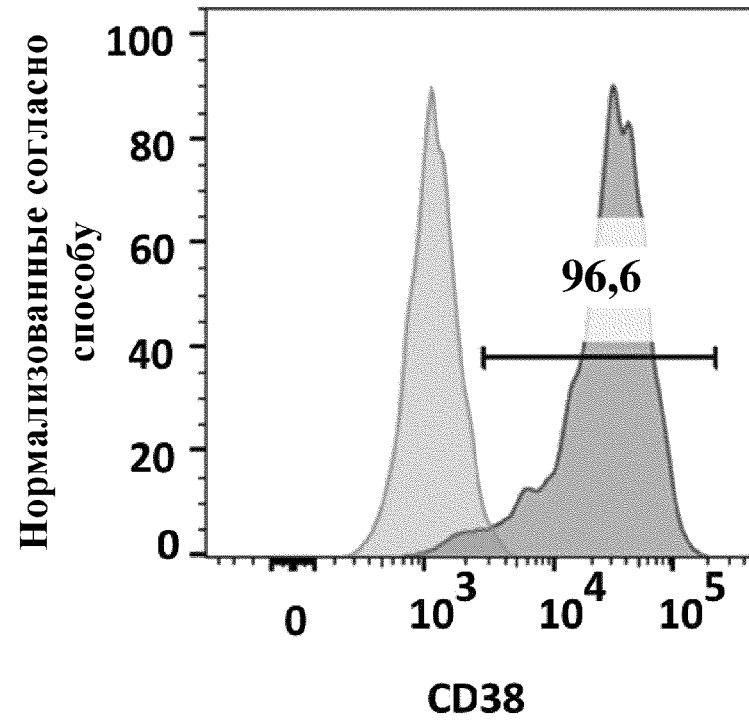
ФИГ. 2С



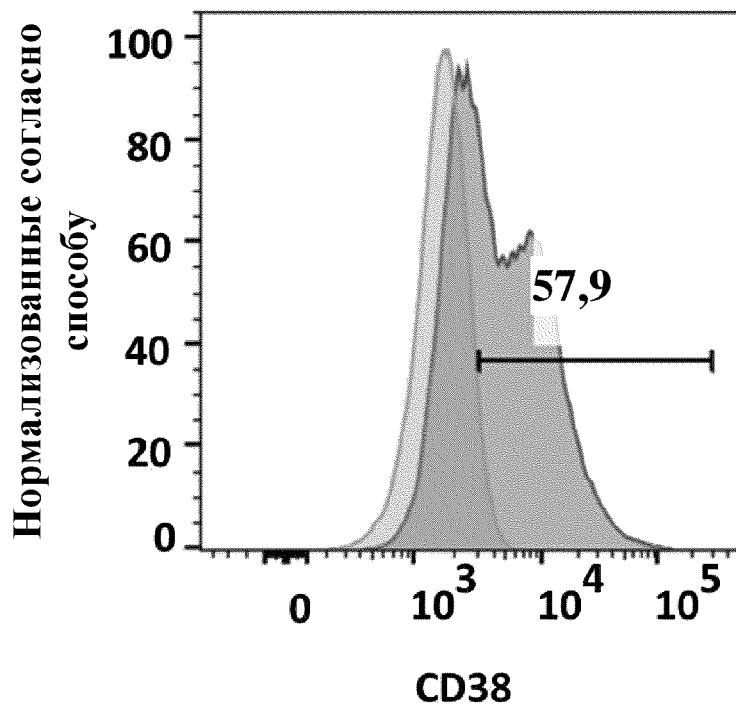
→ CD38-NK-клетки

ФИГ. 2D

10% complement



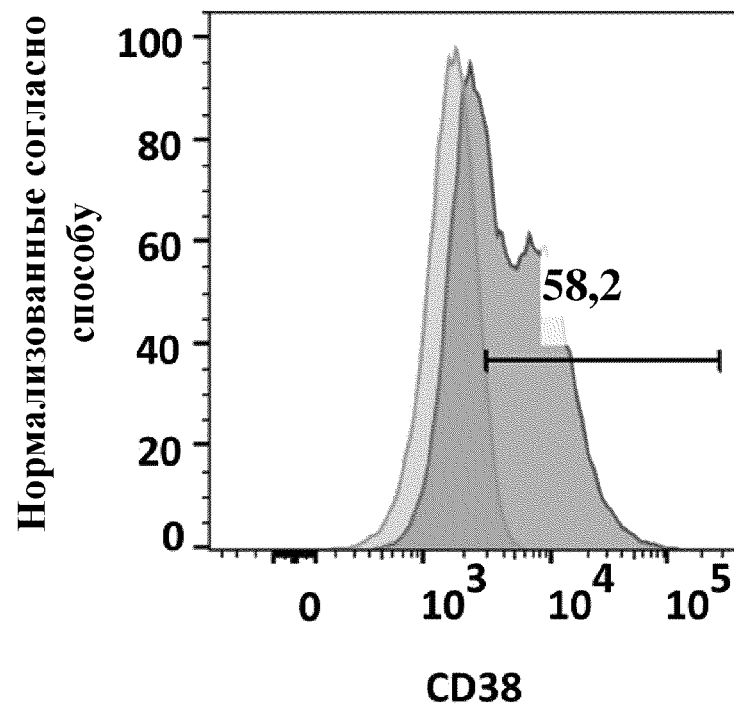
ФИГ. 3А



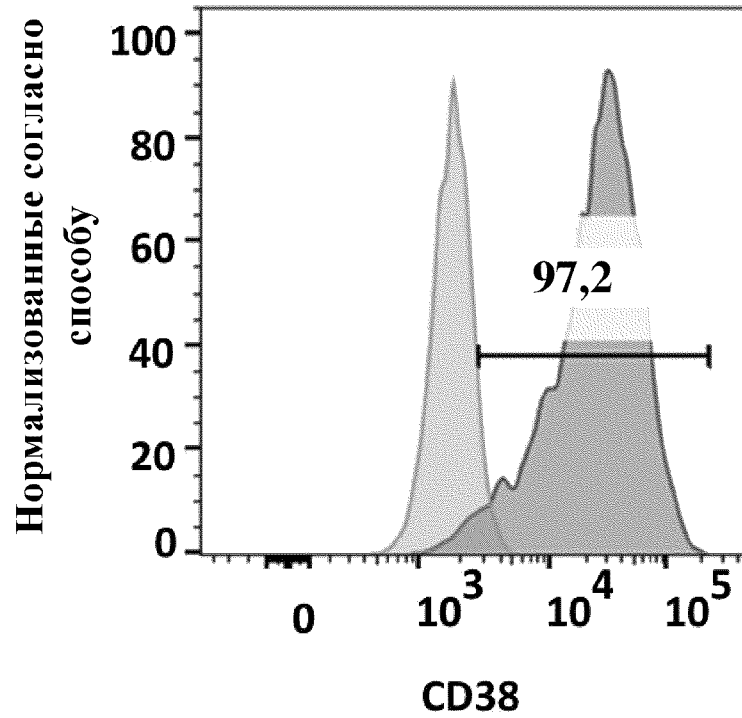
→ CD38-T-клетки

ФИГ. 3В

10% компонента



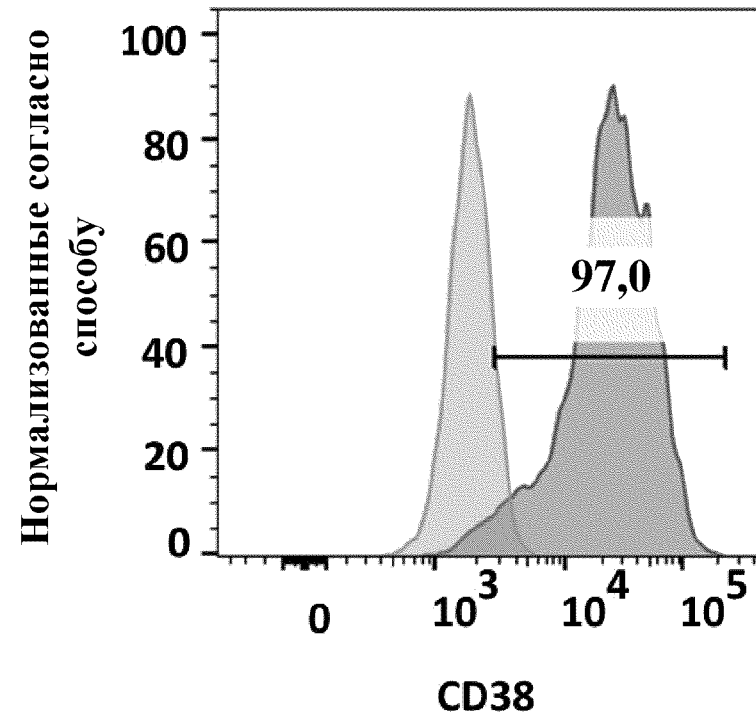
ФИГ. 3С



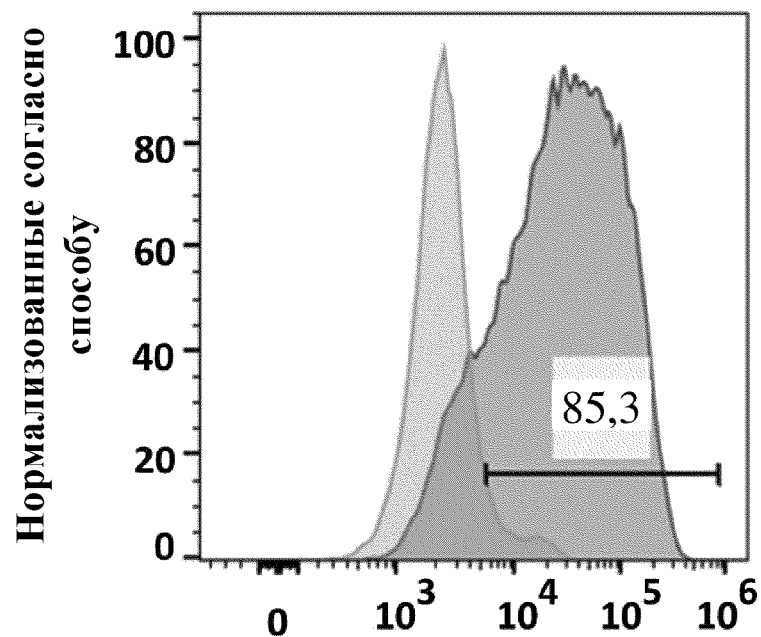
→ CD38-NK-клетки

ФИГ. 3D

10% компонента



ФИГ. 4А

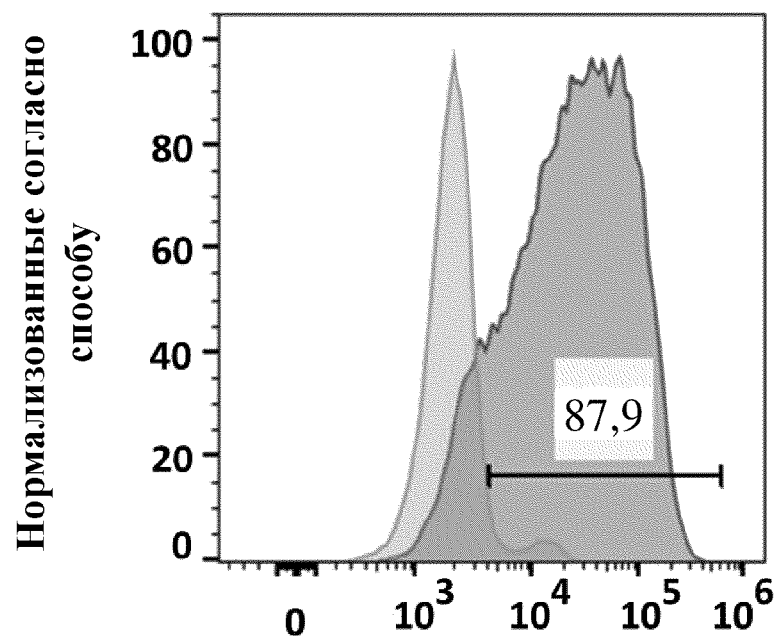


Комп.-В530-Н :: CD38 FITC-Н

→ CD38-Т-клетки

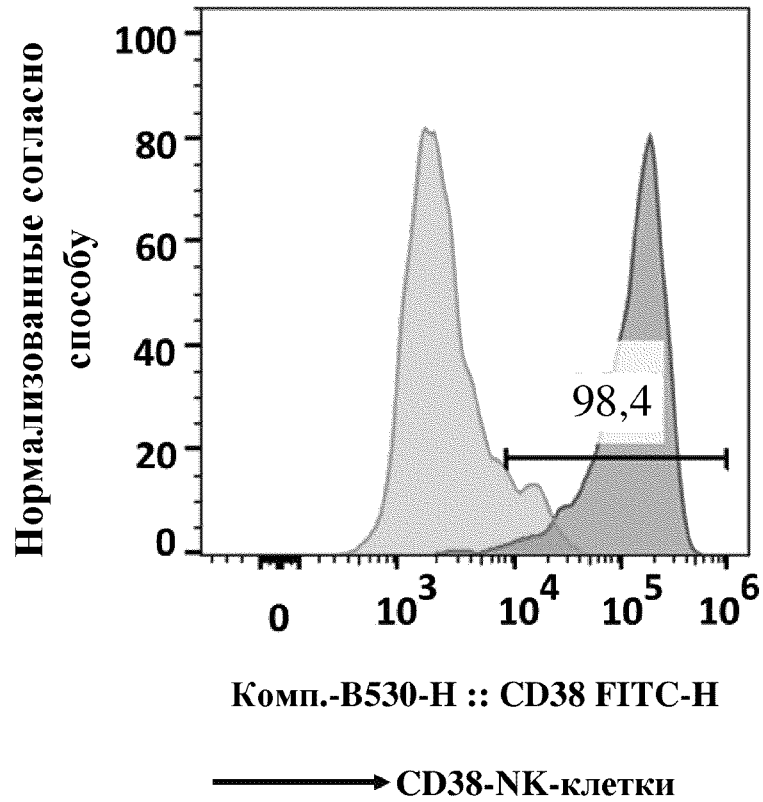
ФИГ. 4В

10% компонента



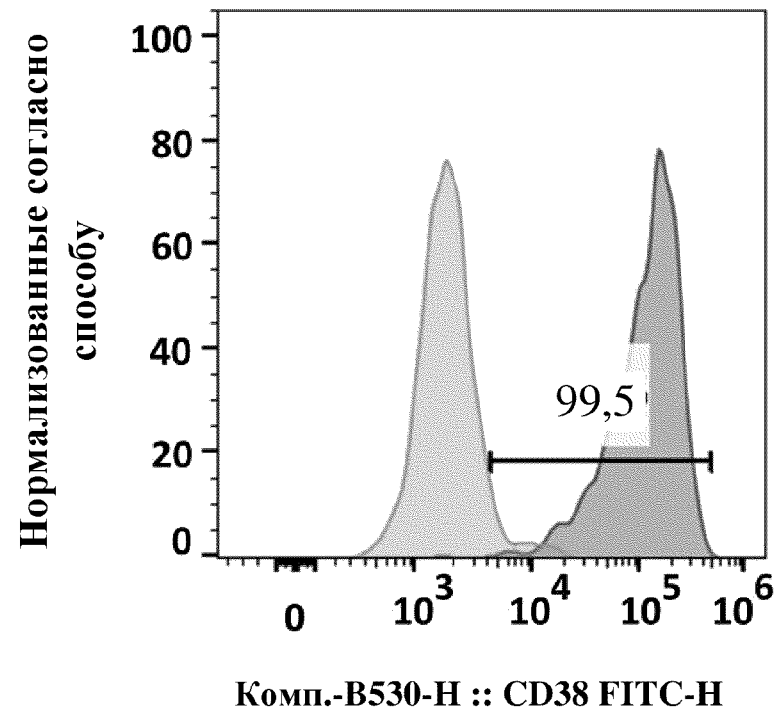
Комп.-В530-Н :: CD38 FITC-Н

ФИГ. 4С

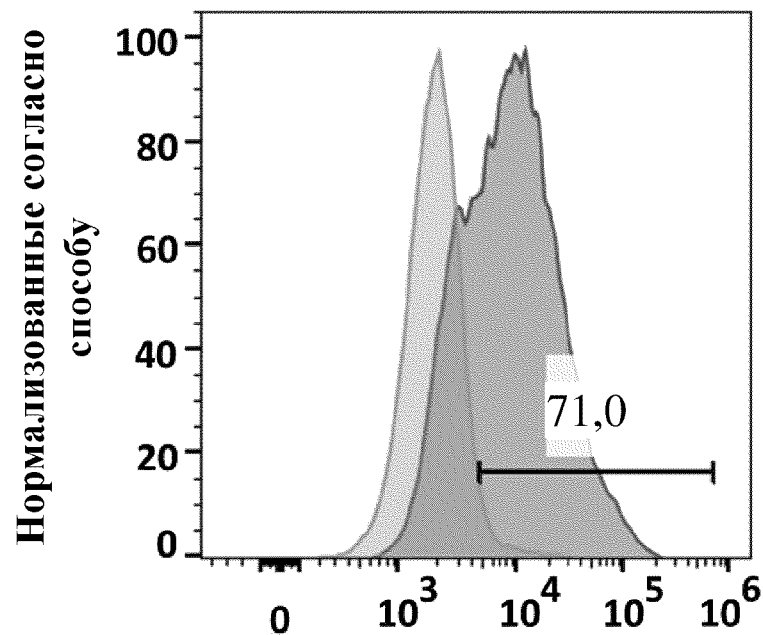


ФИГ. 4D

10% компонента



ФИГ. 5А

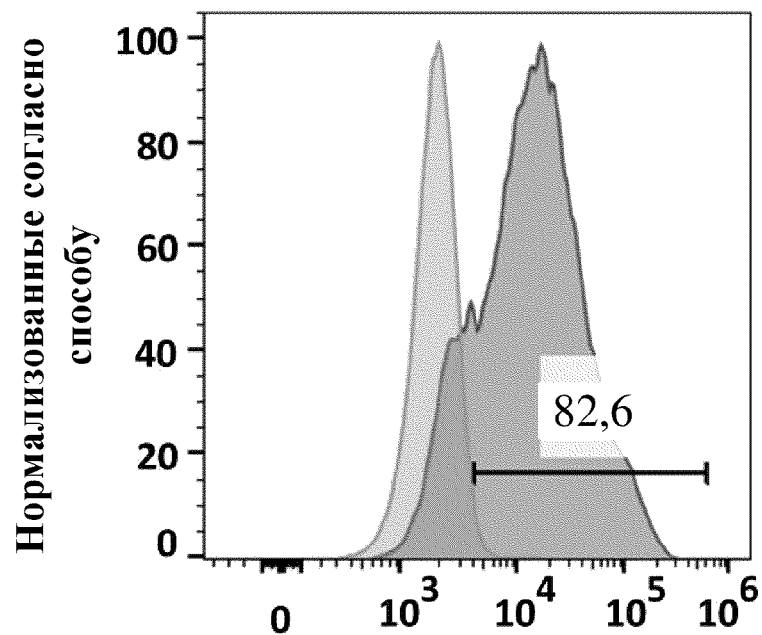


Комп.-В530-Н :: CD38 FITC-Н

→ CD38-Т-клетки

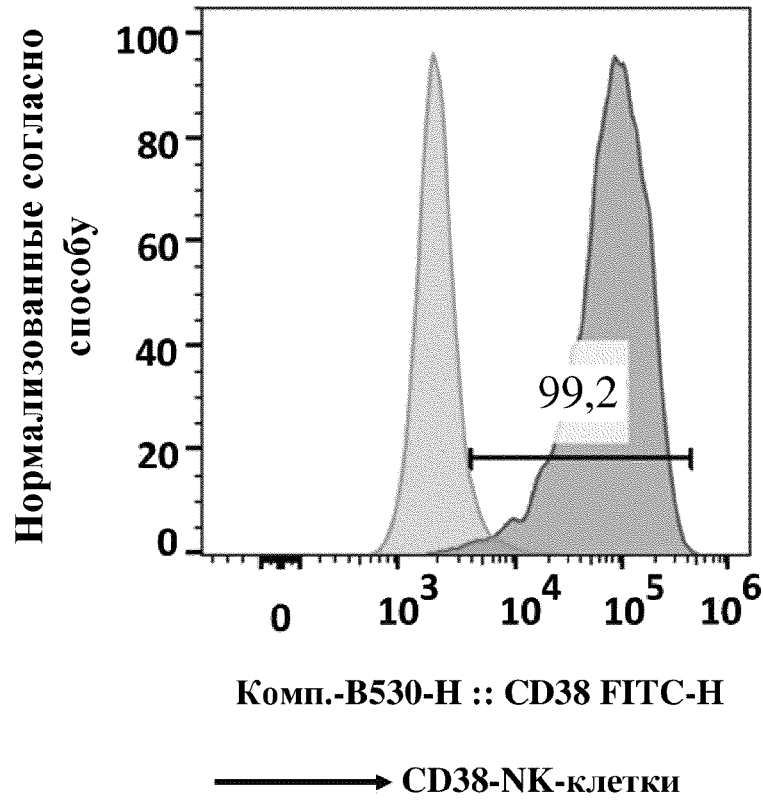
ФИГ. 5В

10% компонента

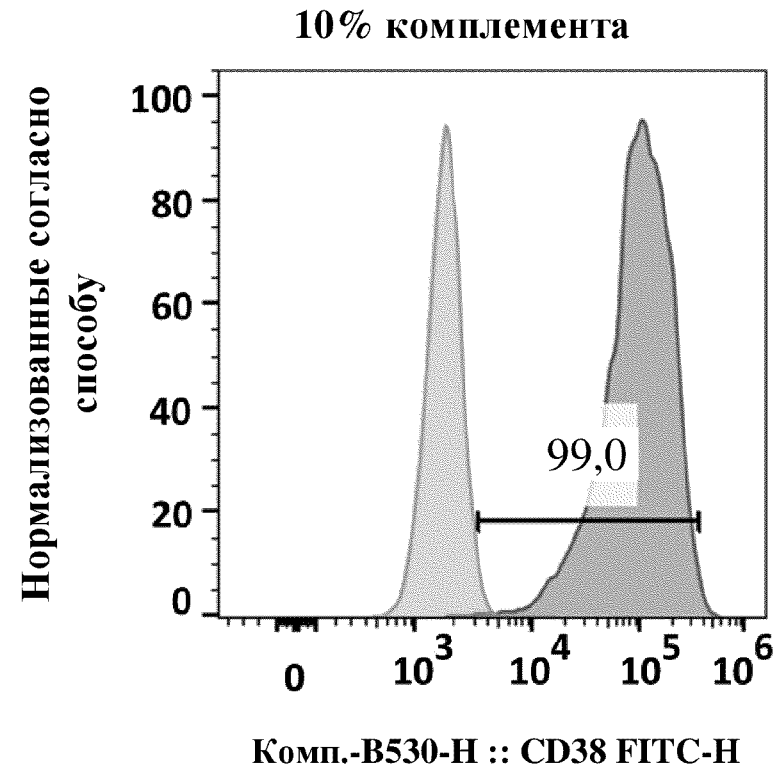


Комп.-В530-Н :: CD38 FITC-Н

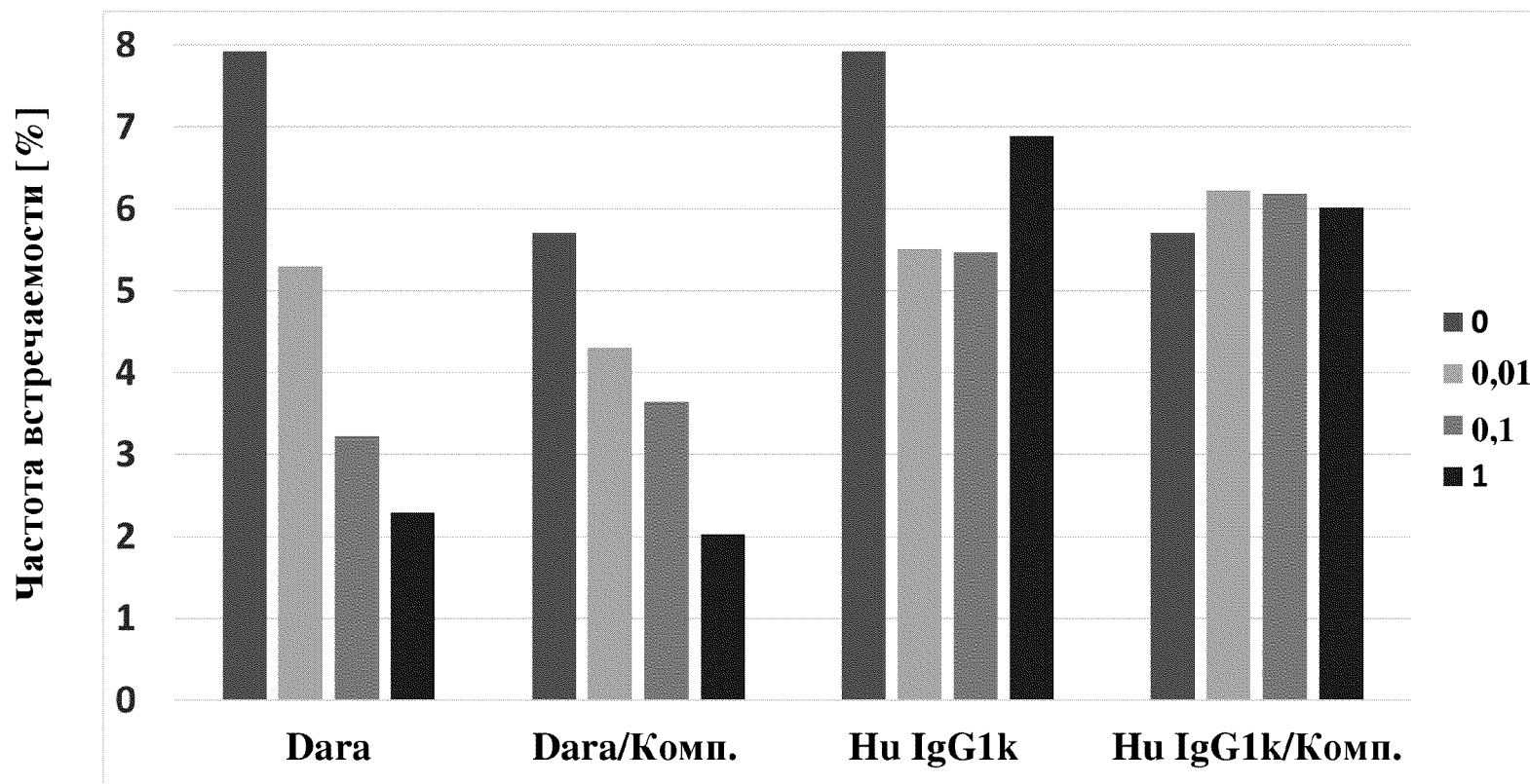
ФИГ. 5С



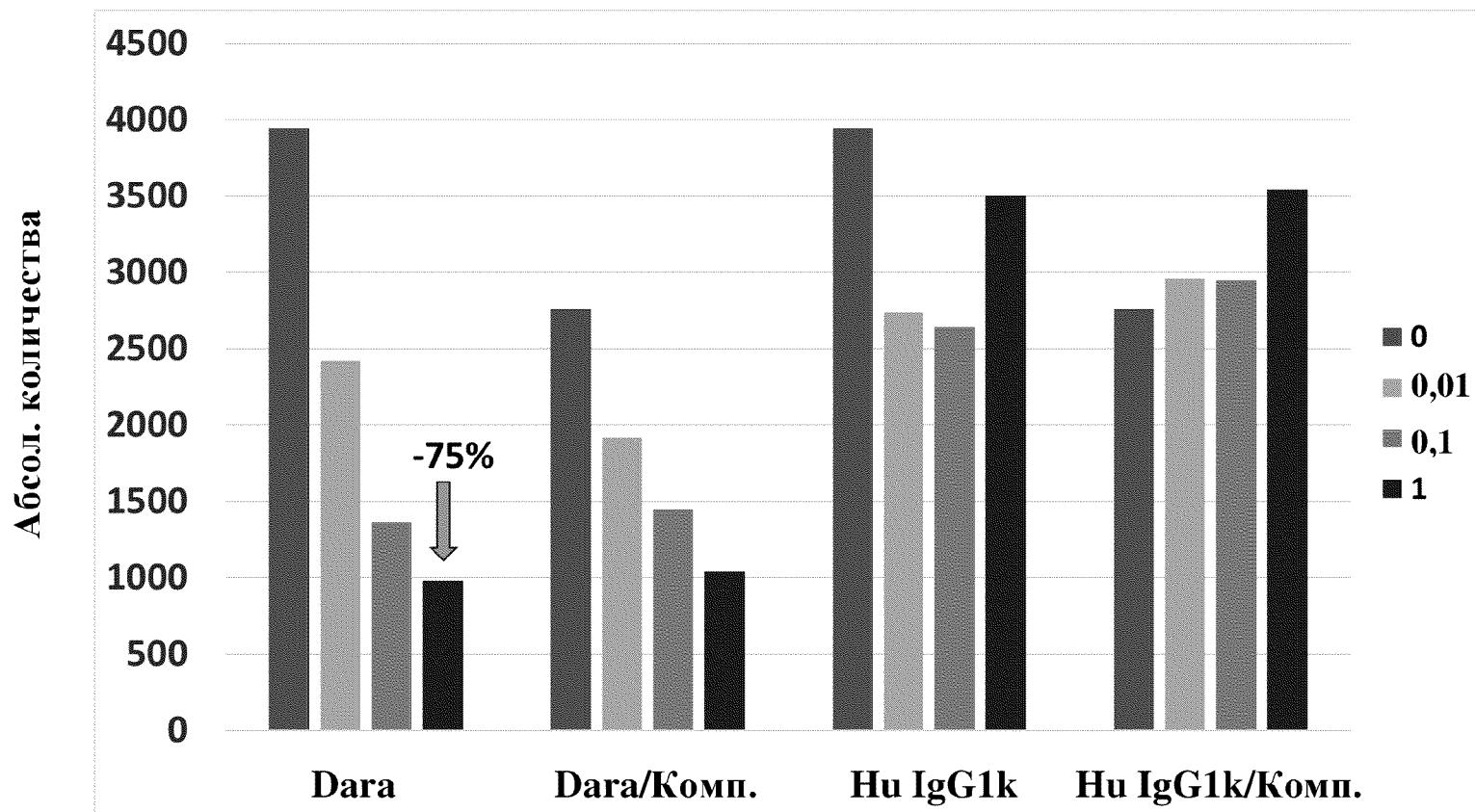
ФИГ. 5D



ФИГ. 6А
NK-клетки

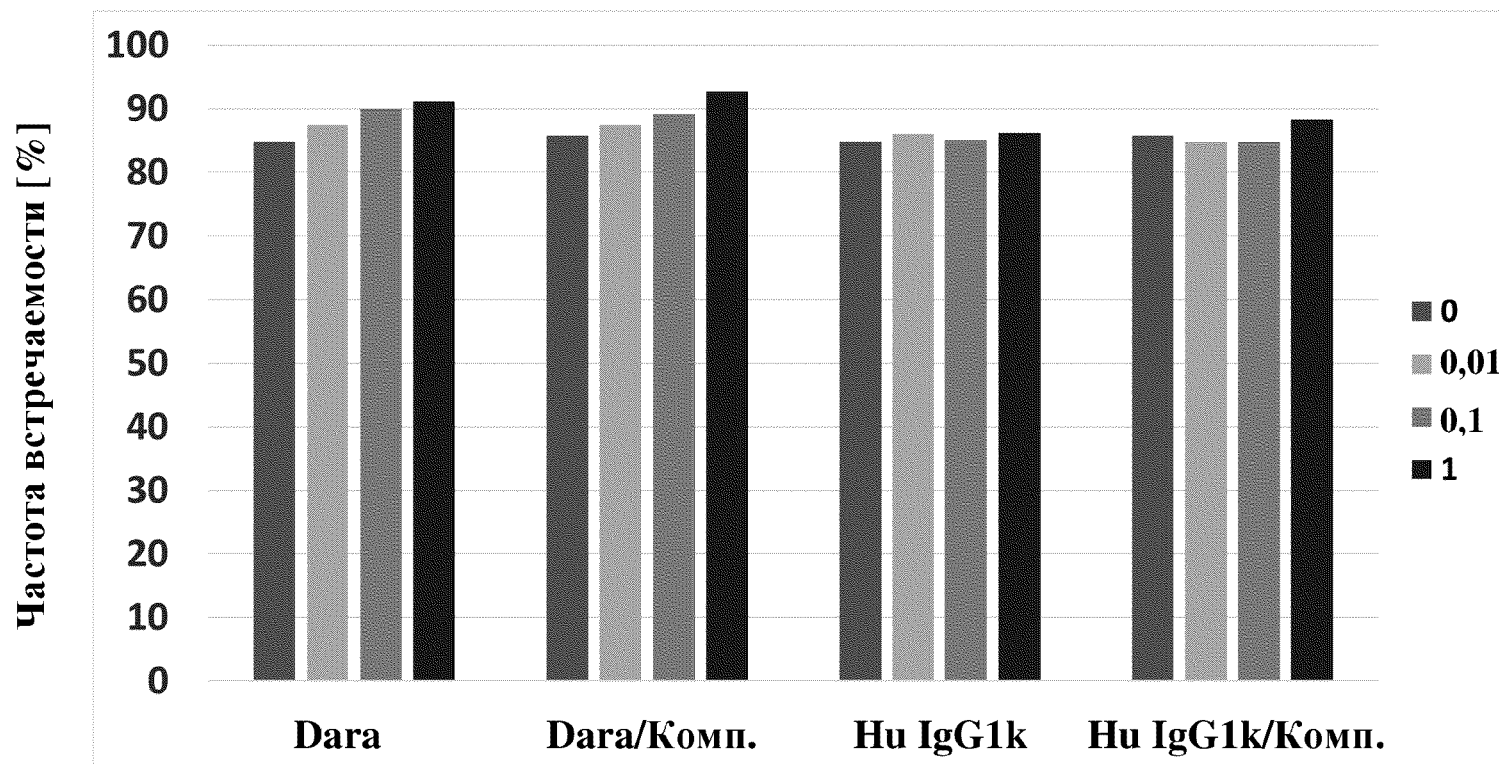


ФИГ. 6В

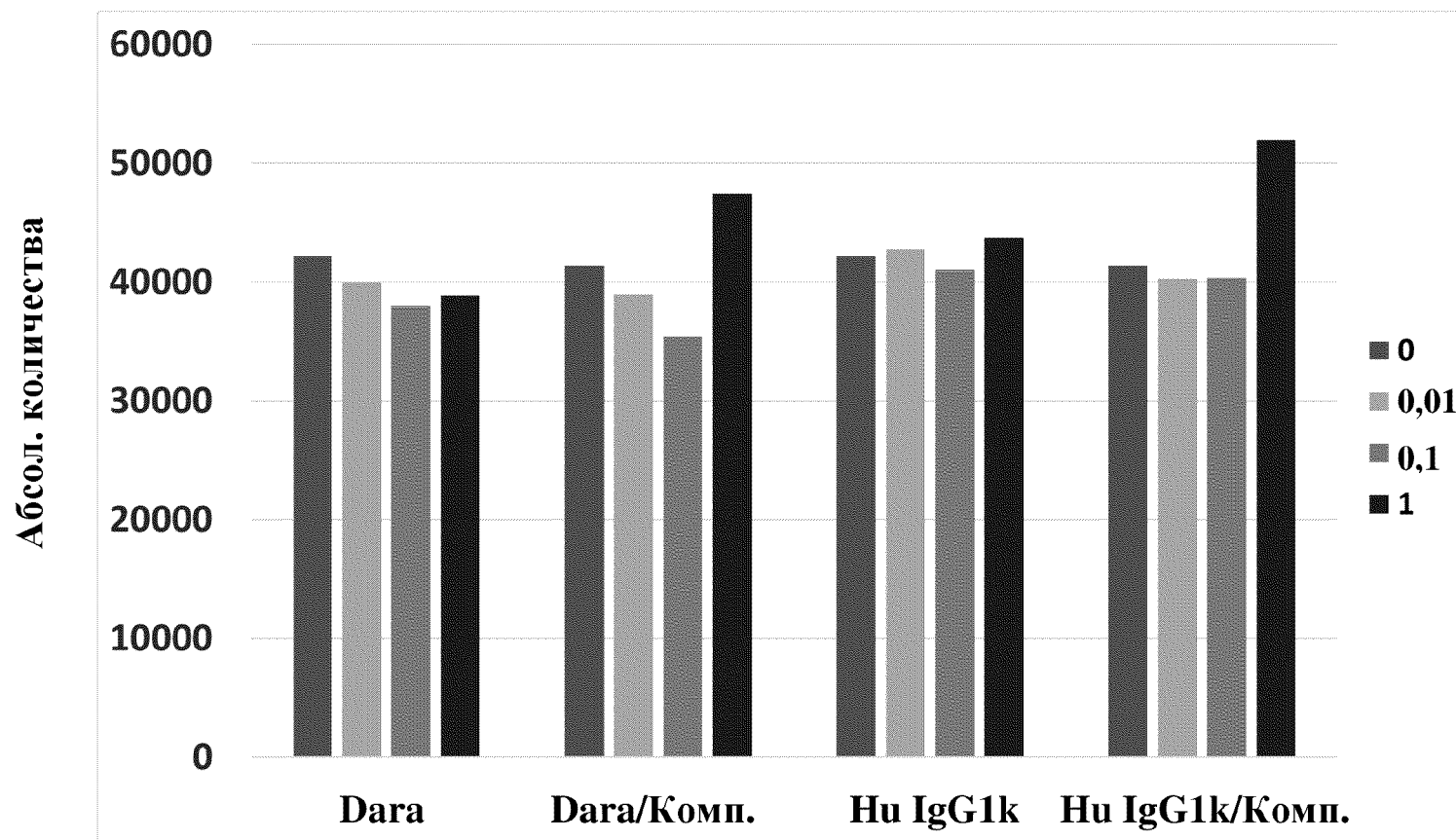


ФИГ. 6С

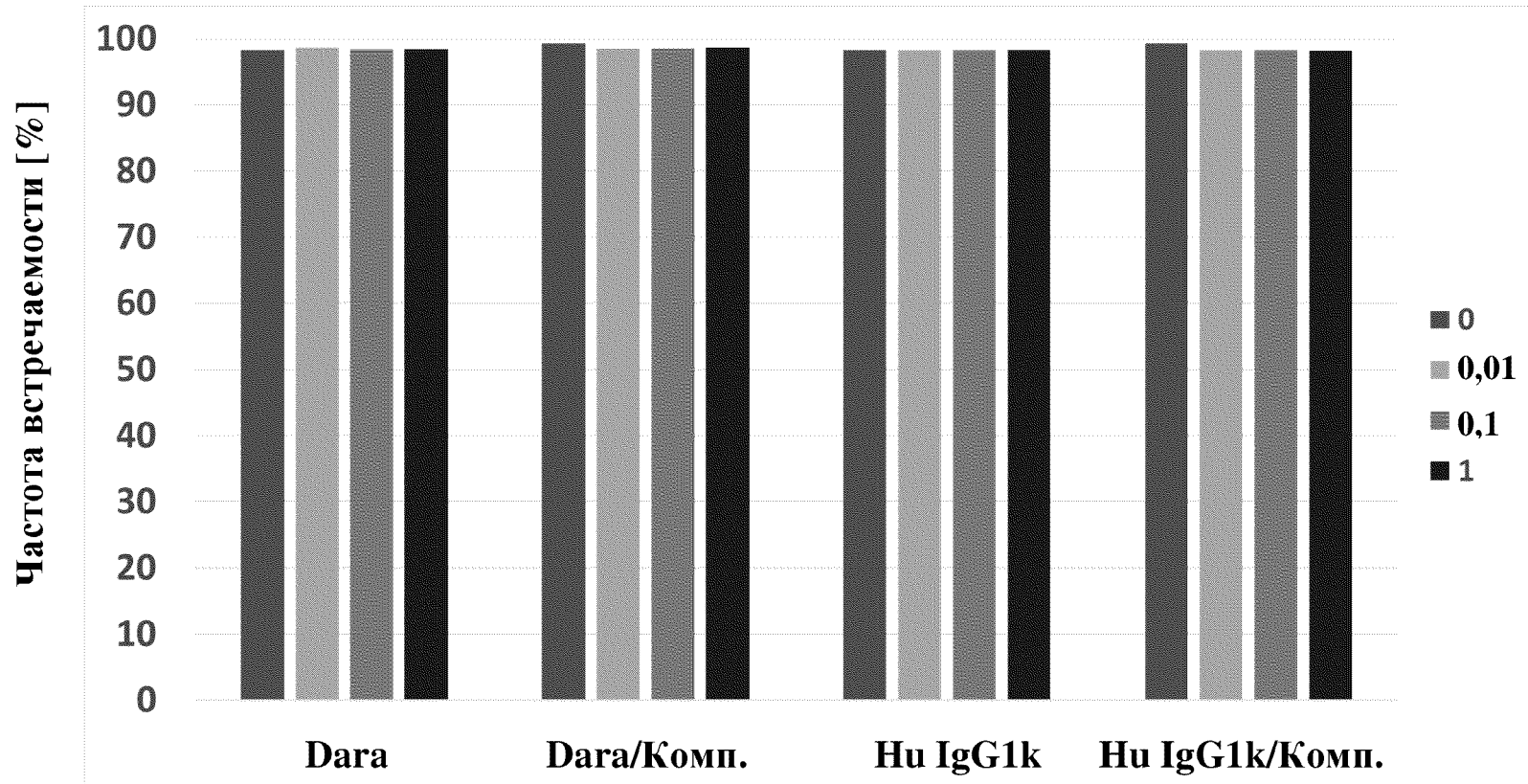
CD3⁺-Т-клетки



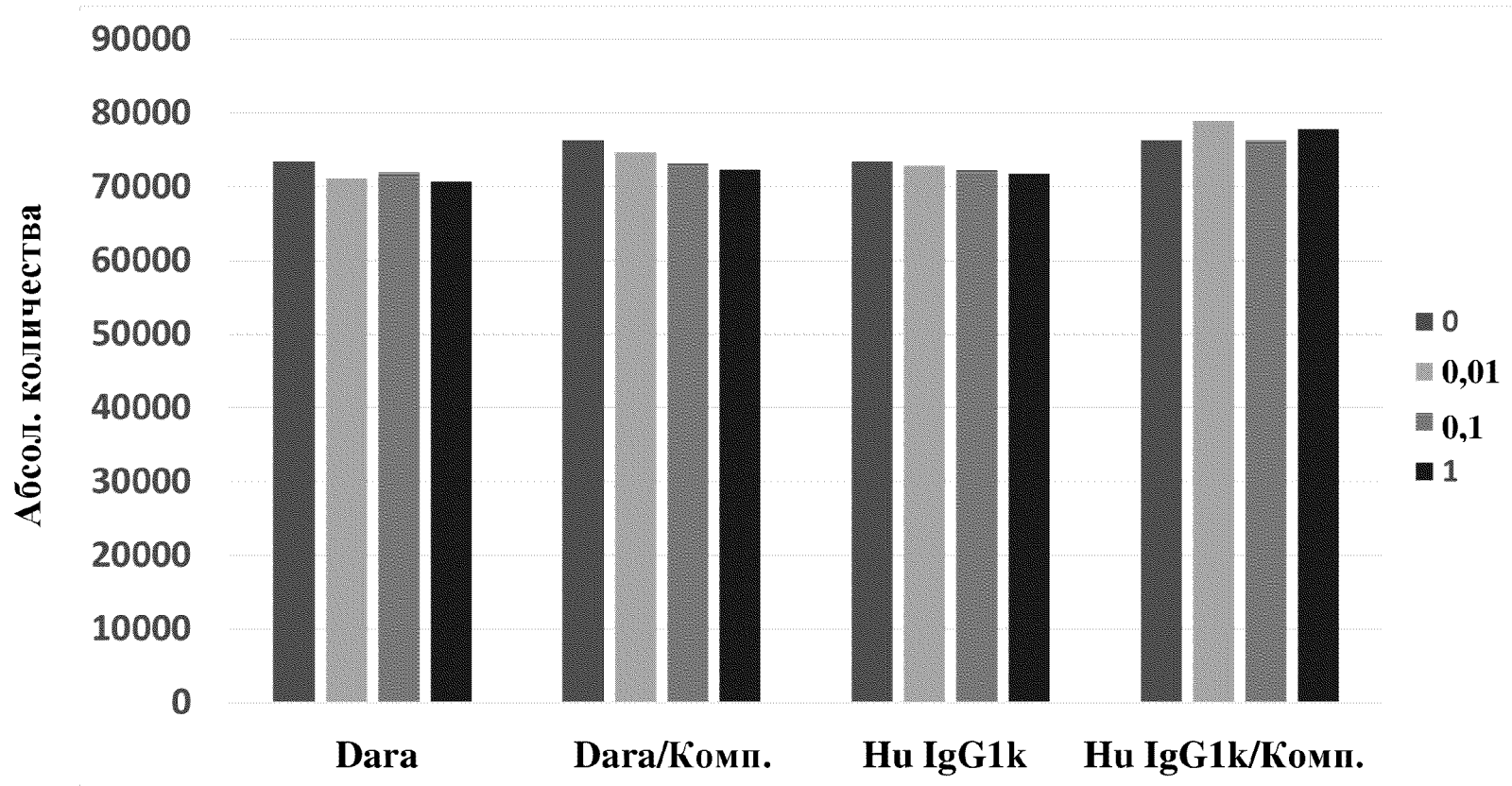
ФИГ. 6D



ФИГ. 7А



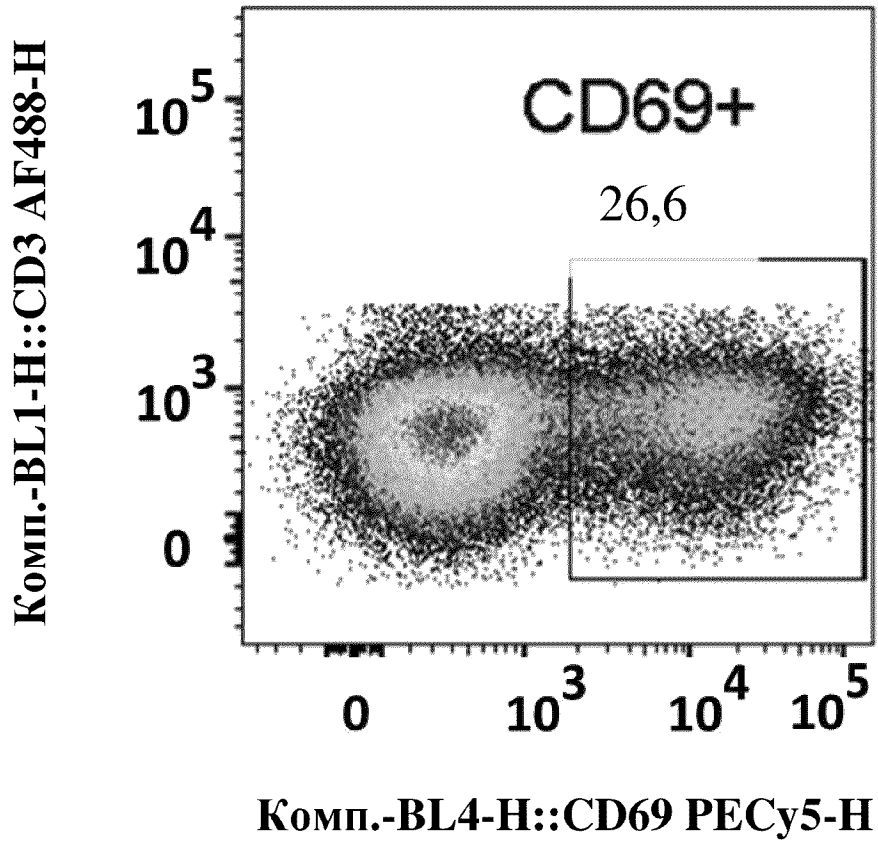
ФИГ. 7В



18/43

ФИГ. 8А

0

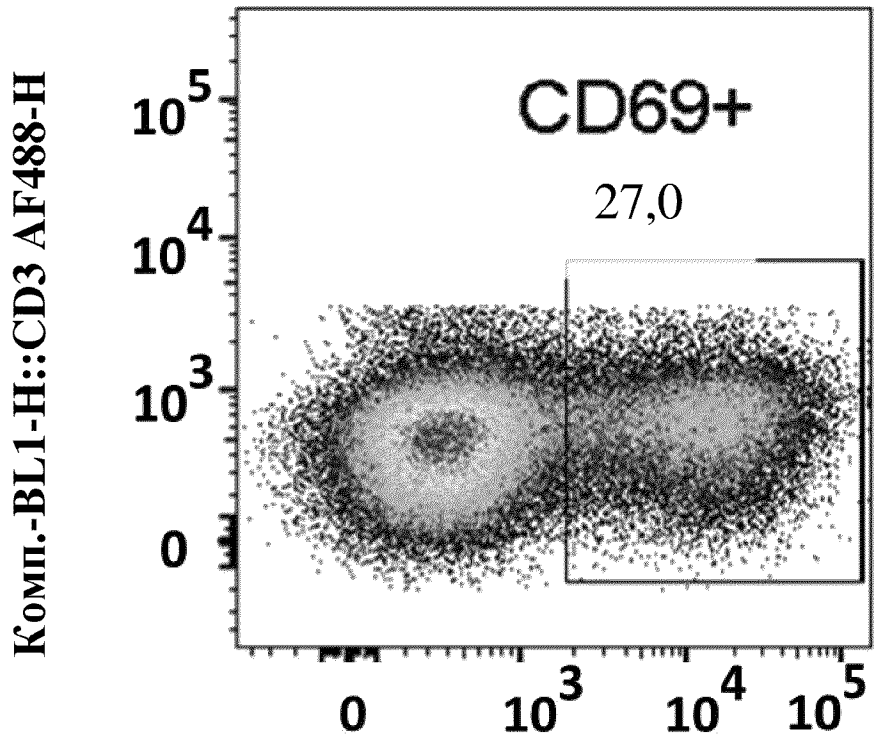


Даратумумаб

19/43

ФИГ. 8В

0,01

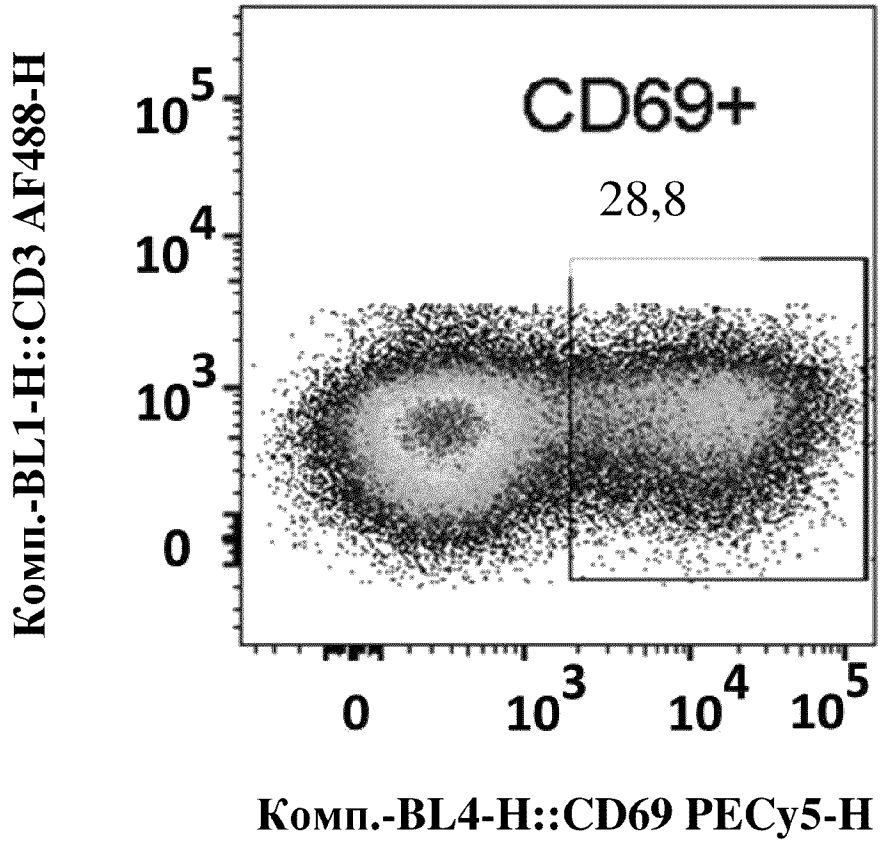


Комп.-BL4-Н::CD69 PE Cy5-Н

Даратумумаб

ФИГ. 8С

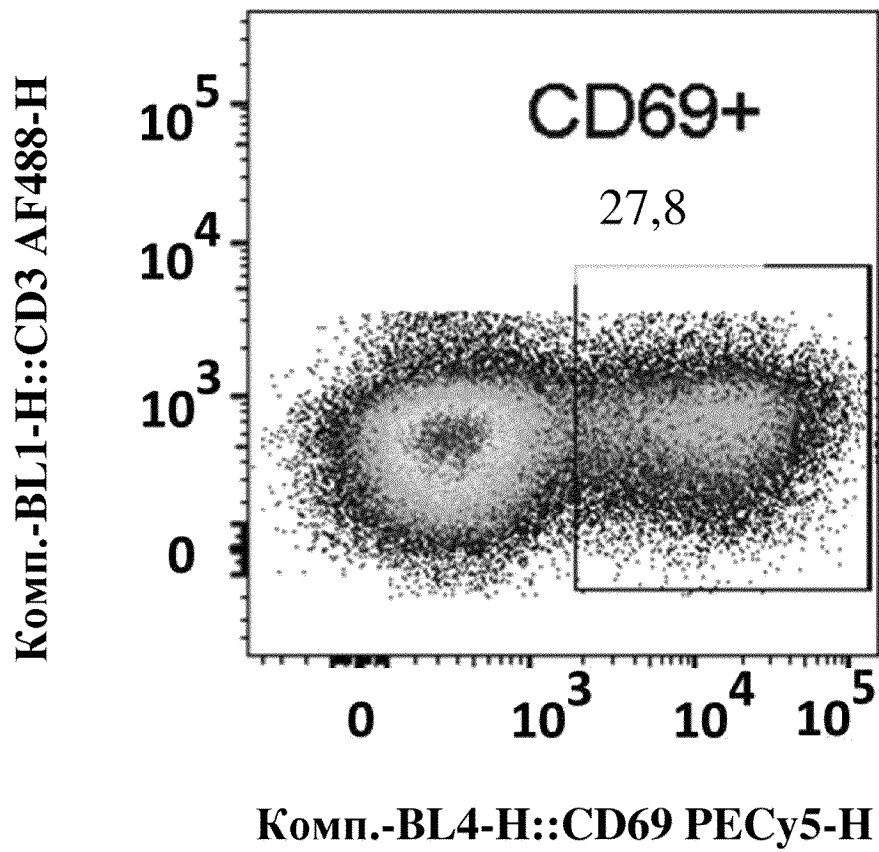
0,1



Даратумумаб

ФИГ. 8D

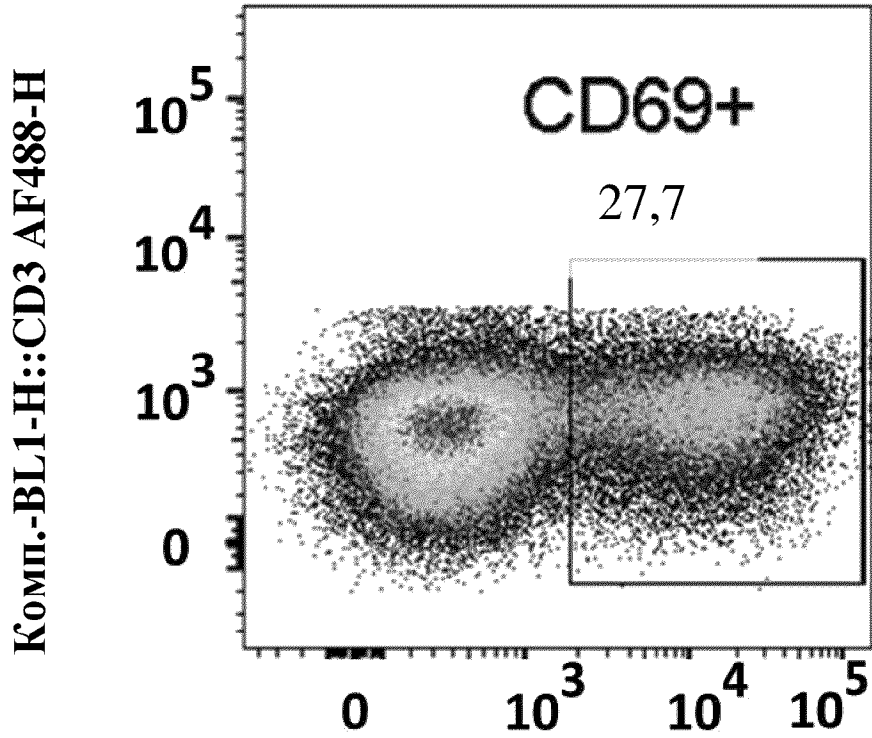
1



Даратумумаб

ФИГ. 8E

0



Комп.-BL4-Н::CD69 PE Cy5-Н

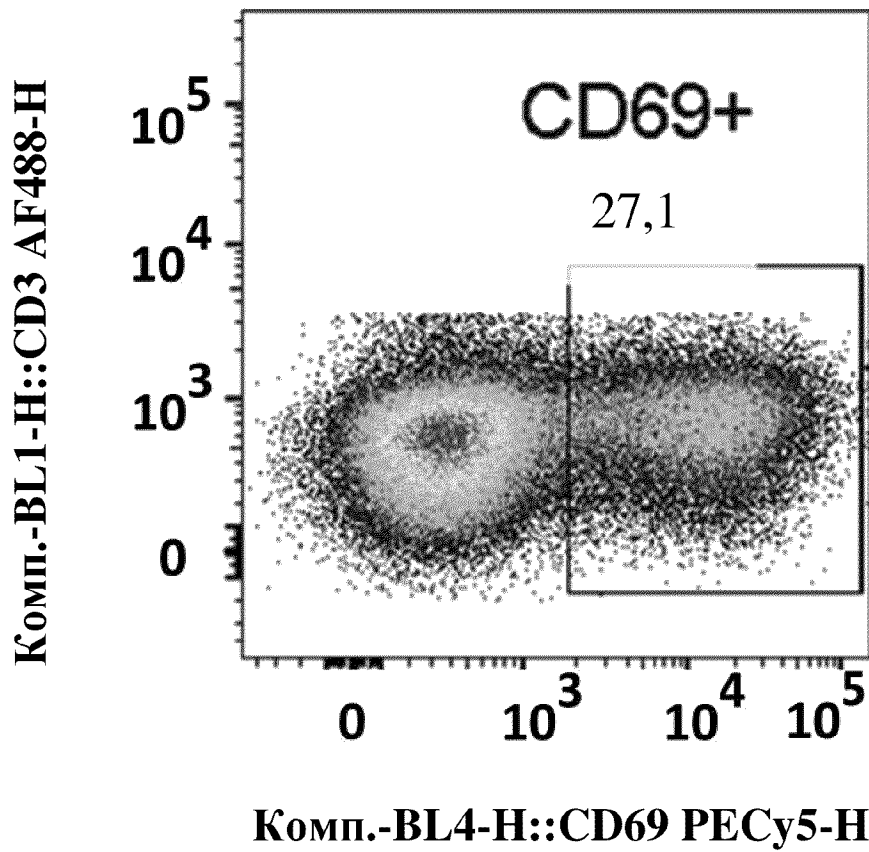
Даратумумаб

+ антитело козы к антителу человека

23/43

ФИГ. 8F

0,01

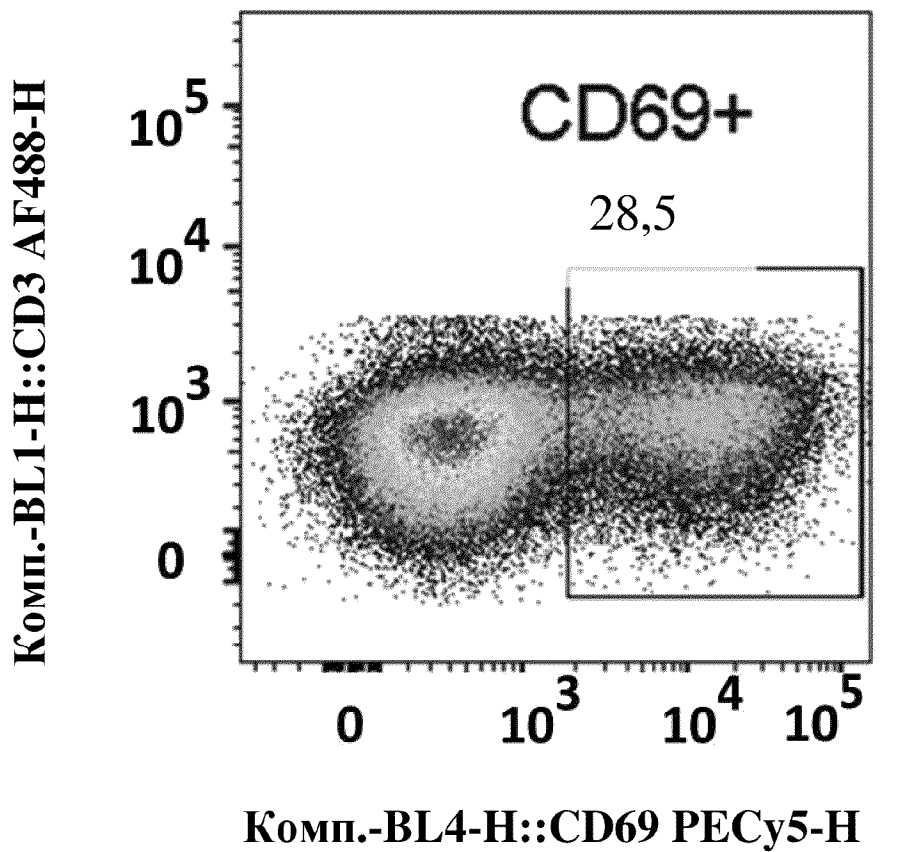


Даратумумаб

+ антитело козы к антителу человека

ФИГ. 8G

0,1



Даратумумаб

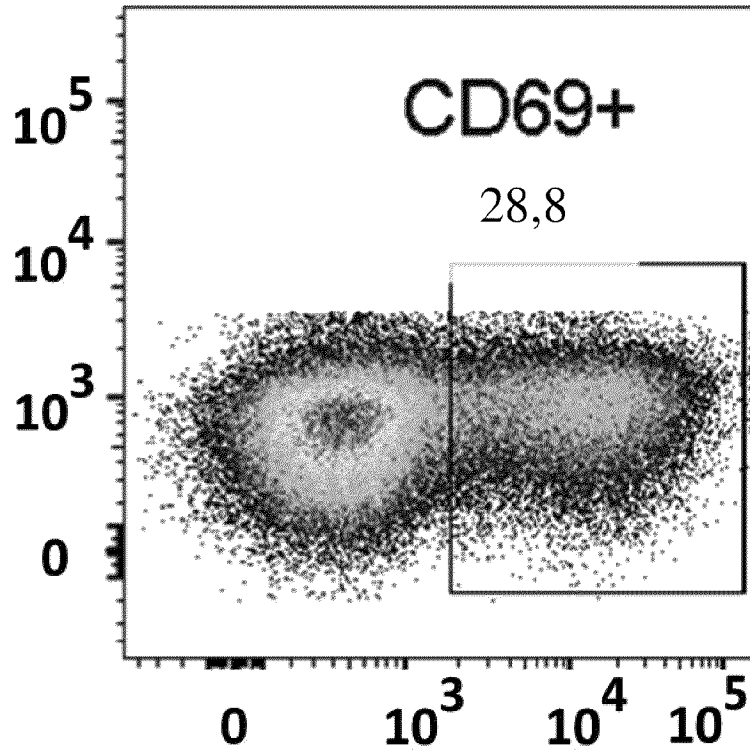
+ антитело козы к антителу человека

25/43

ФИГ. 8Н

1

Комп.-BL1-Н::CD3 AF488-Н



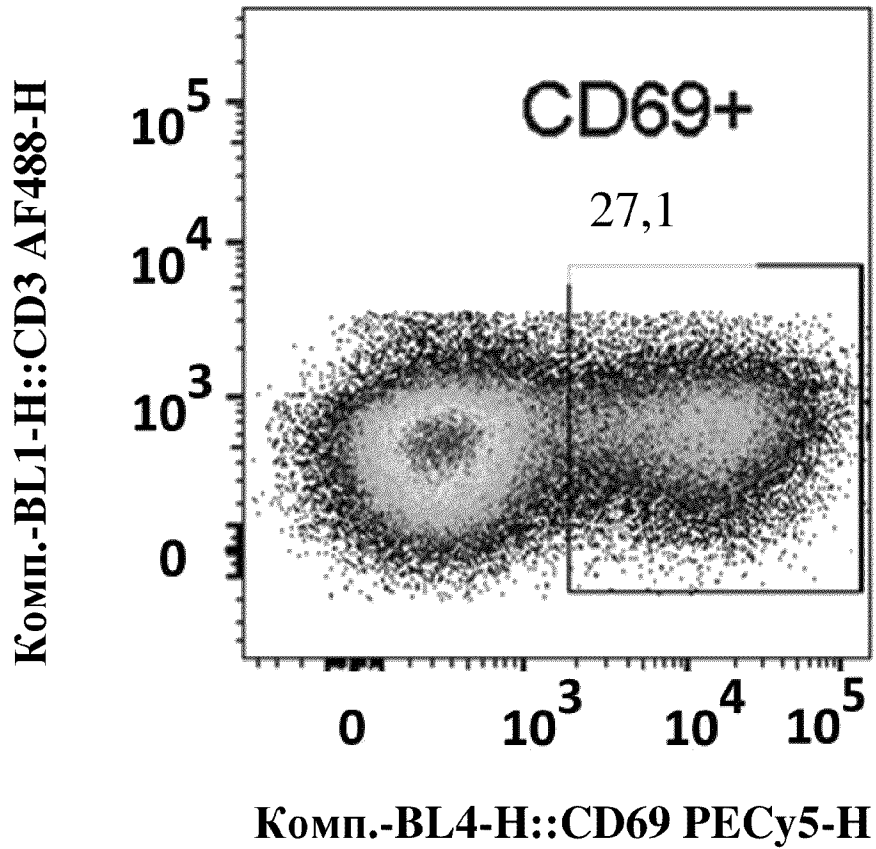
Комп.-BL4-Н::CD69 PE Cy5-Н

Даратумумаб

+ антитело козы к антителу человека

ФИГ. 8I

0,01

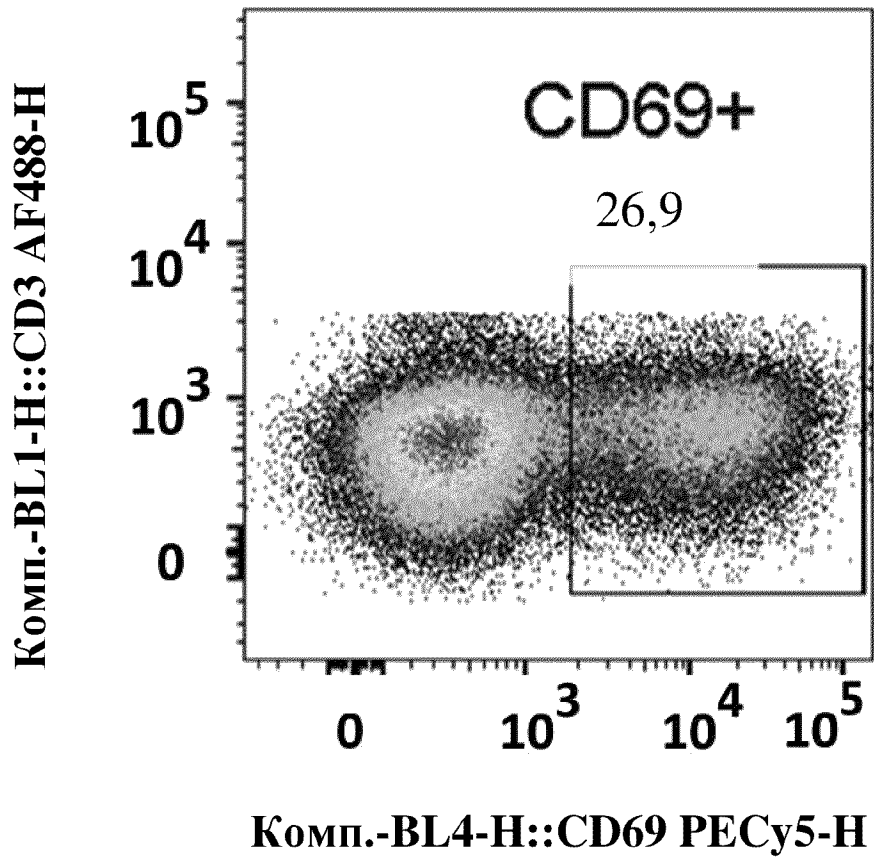


IgG1k

27/43

ФИГ. 8J

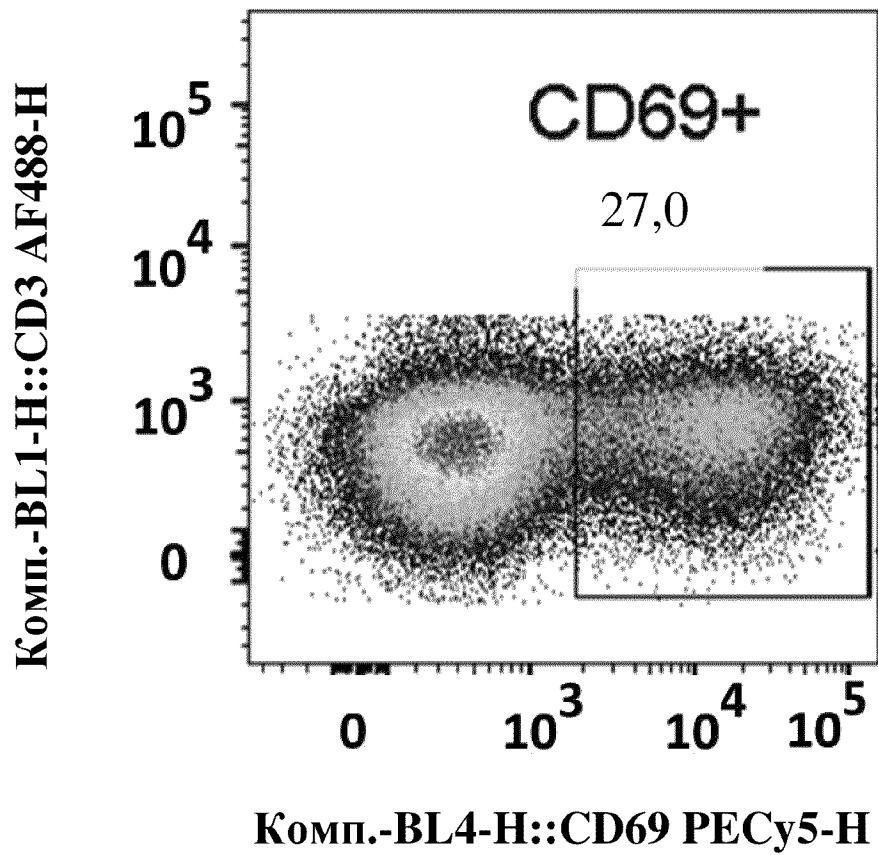
0,1



IgG1k

ФИГ. 8К

1

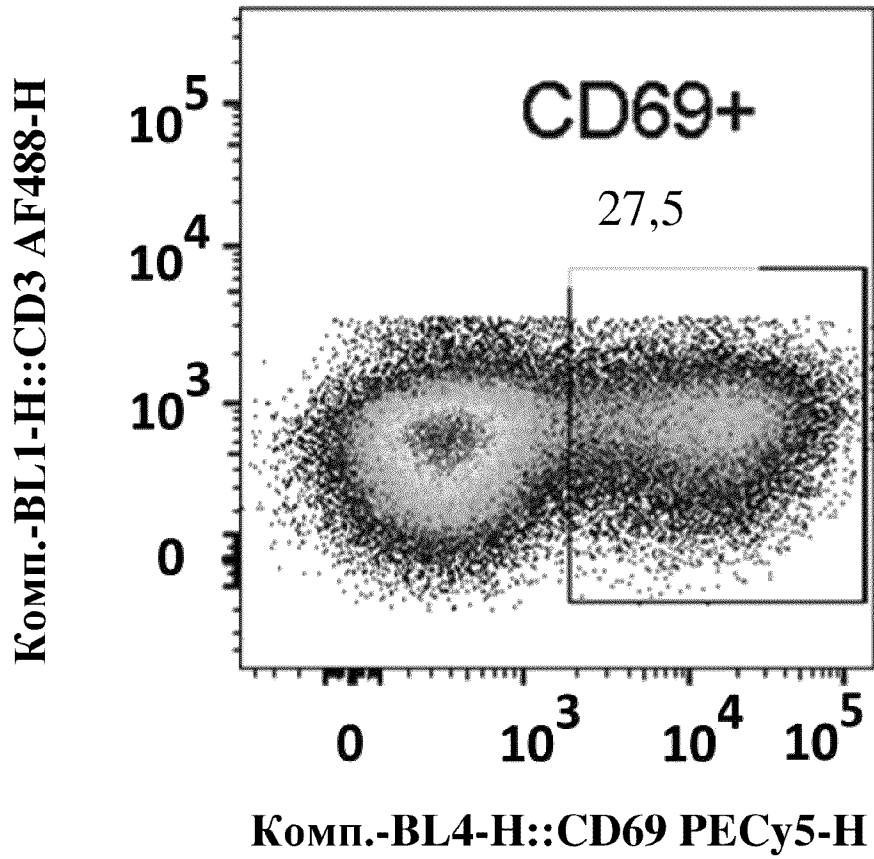


IgG1k

29/43

ФИГ. 8L

0,01



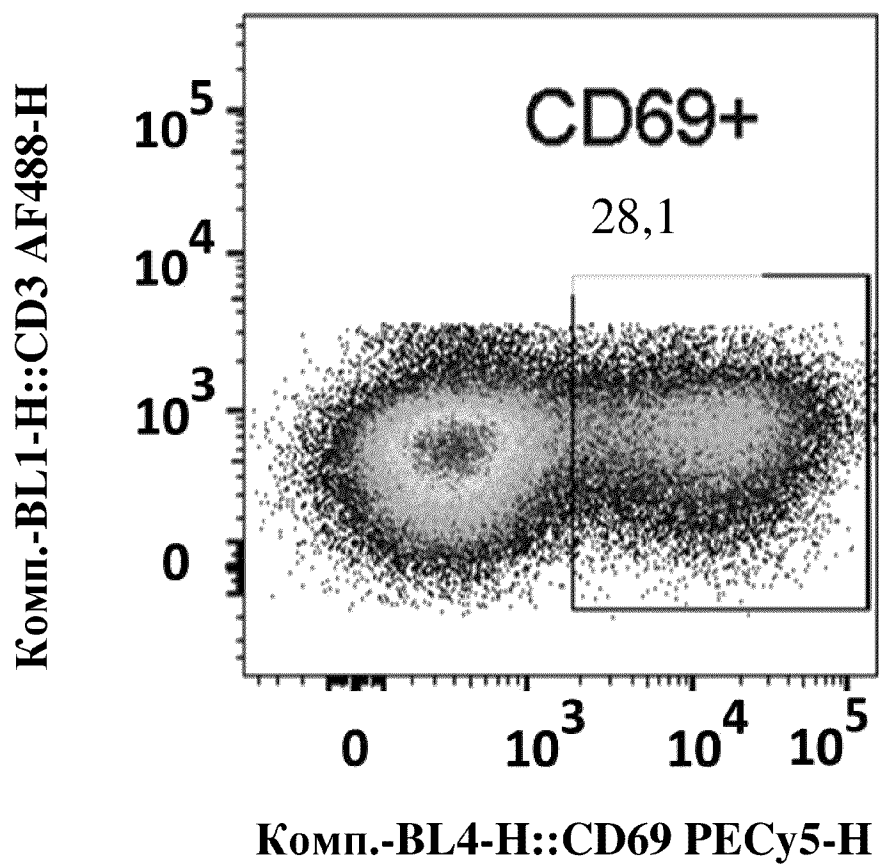
IgG1k

+ антитело козы к антителу человека

30/43

ФИГ. 8М

0,1



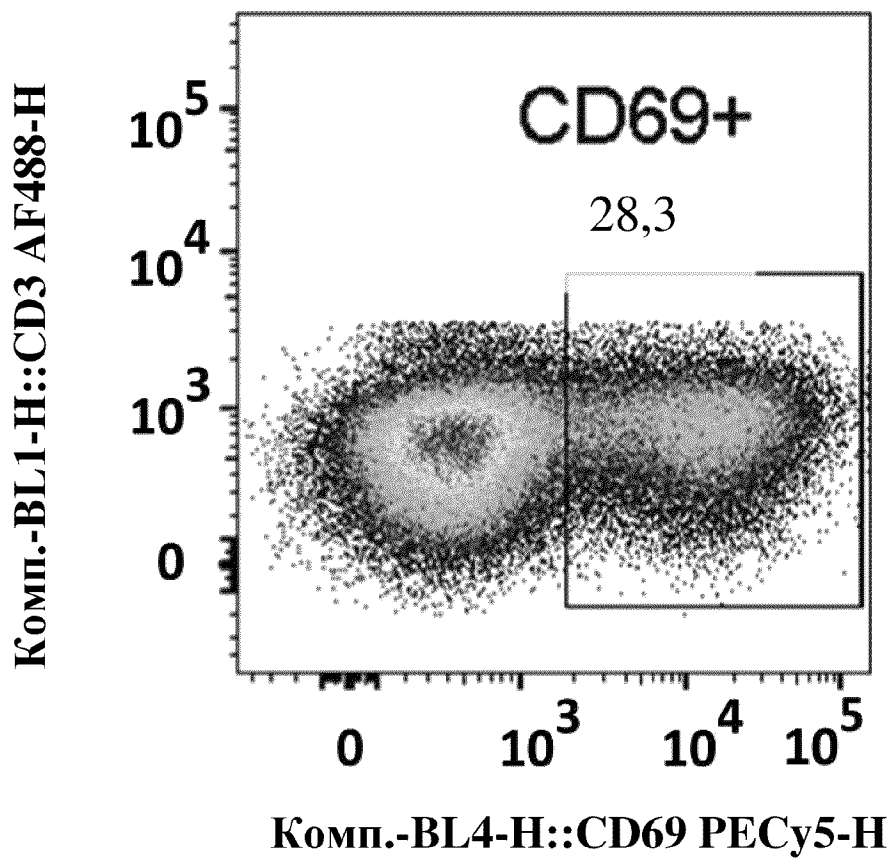
IgG1k

+ антитело козы к антителу человека

31/43

ФИГ. 8N

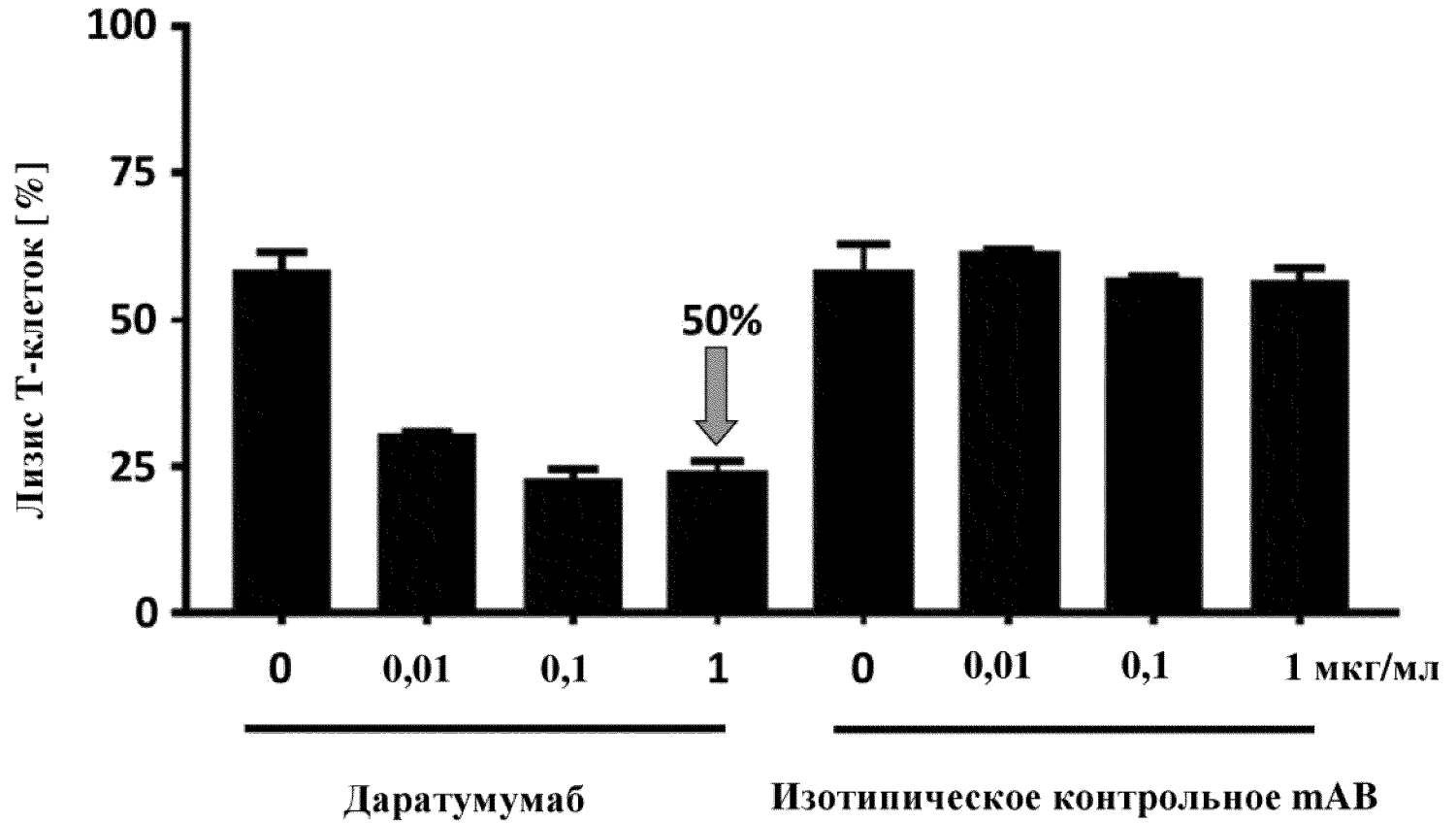
1



IgG1k

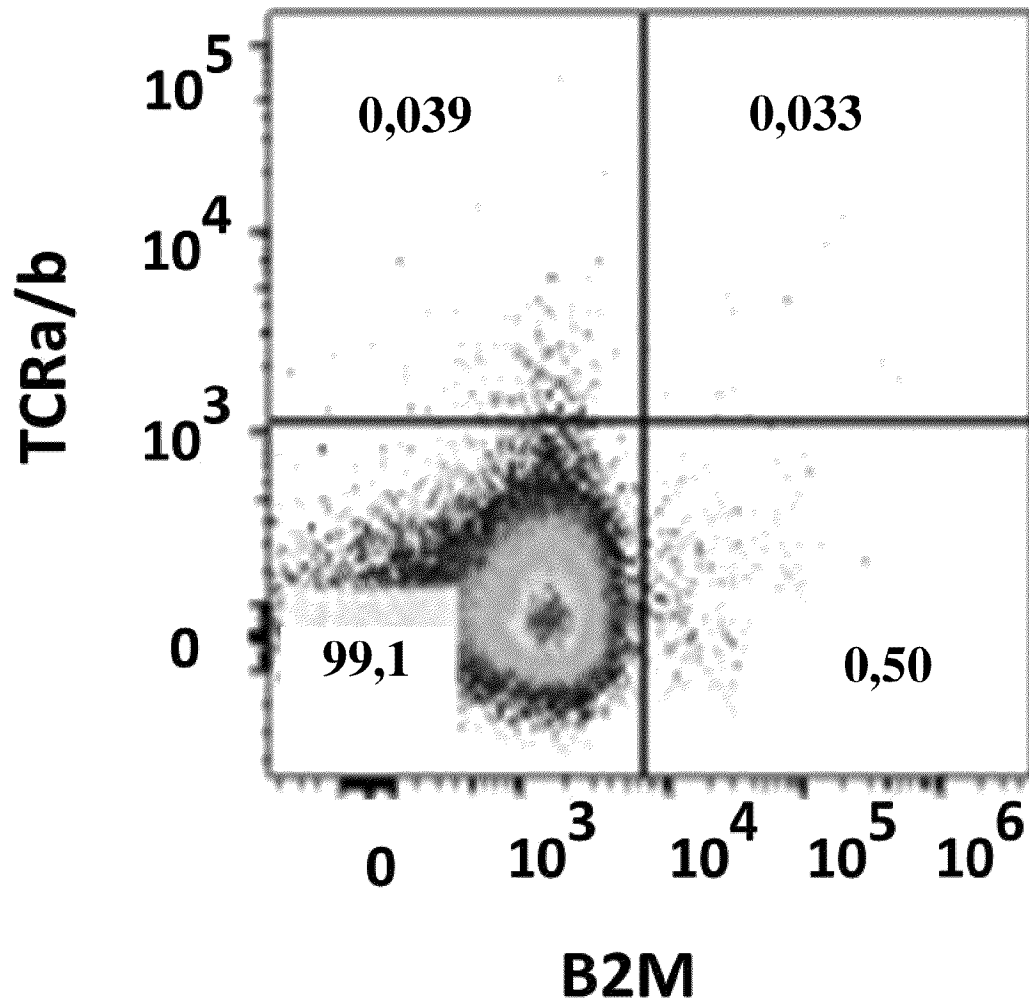
+ антитело козы к антителу человека

ФИГ. 9А

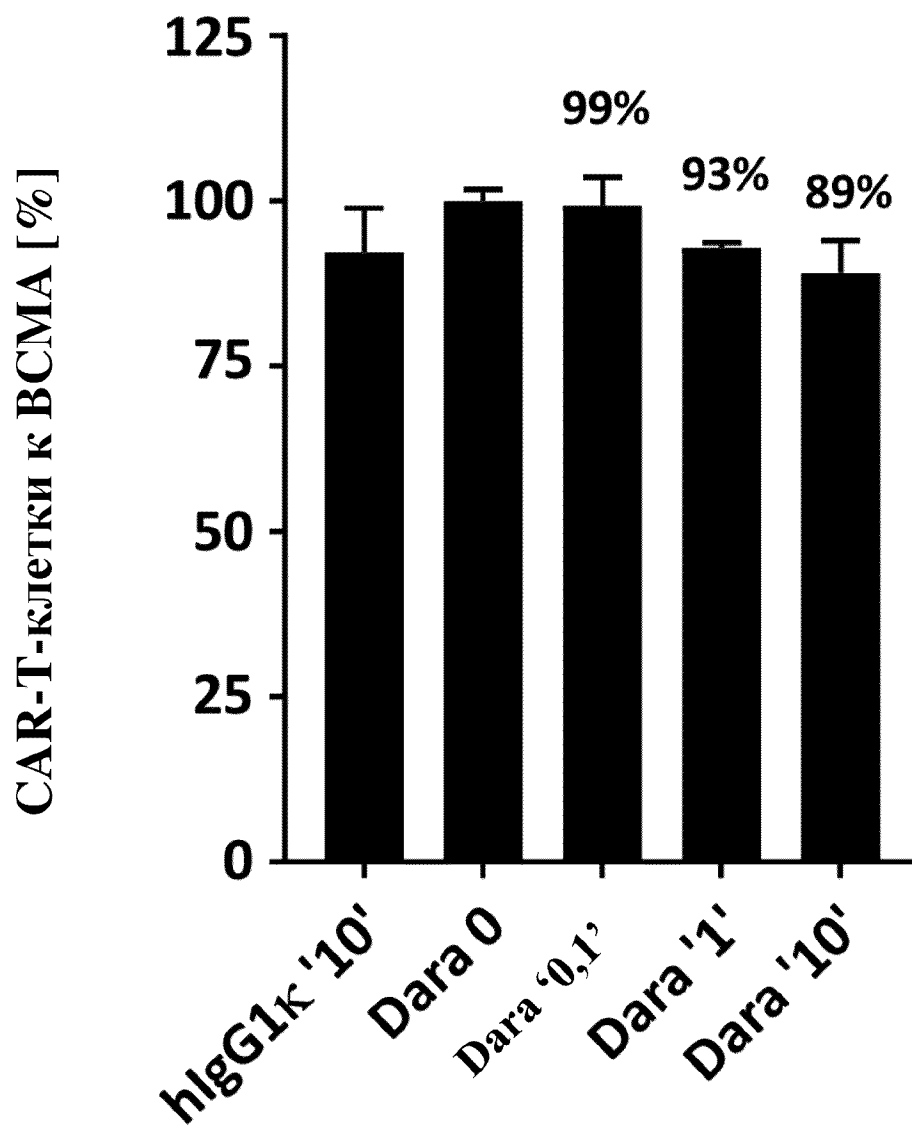


ФИГ. 9В

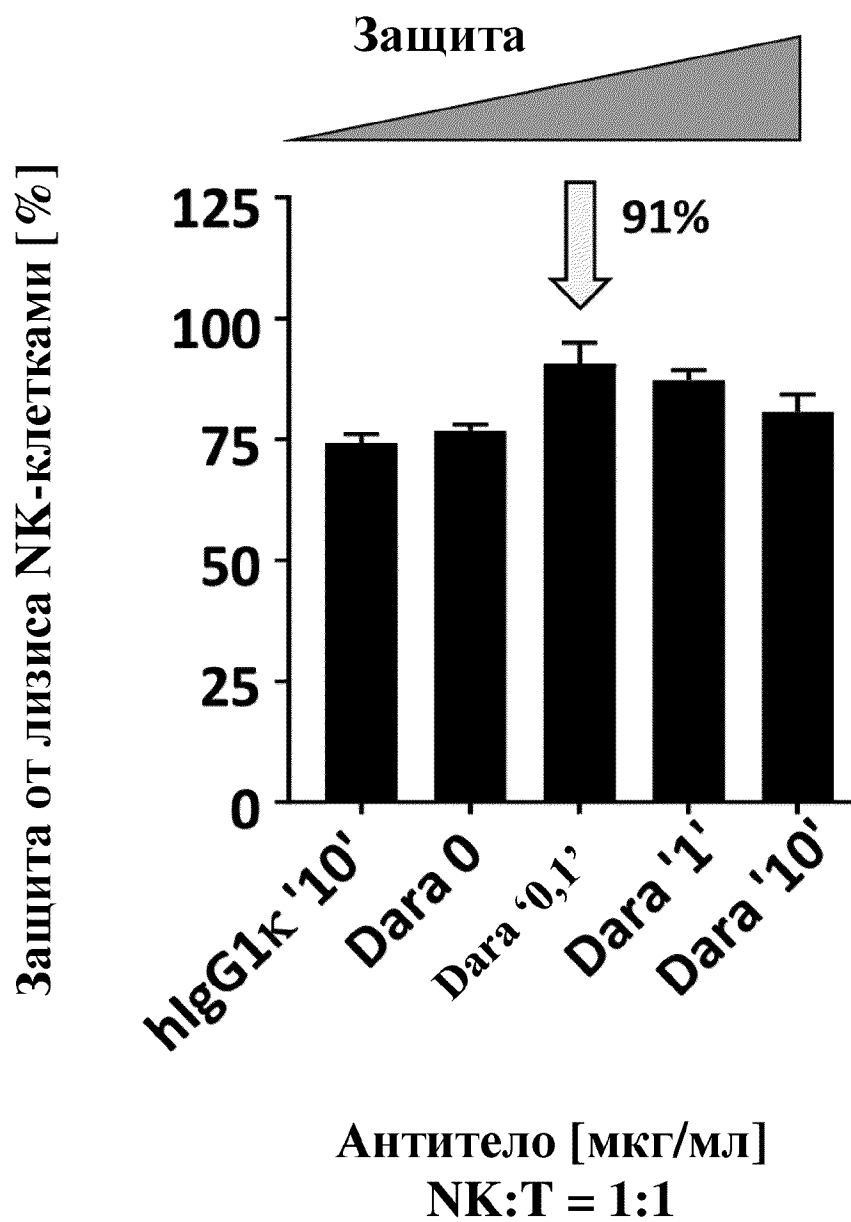
CAR-T-клетки к ВСМА



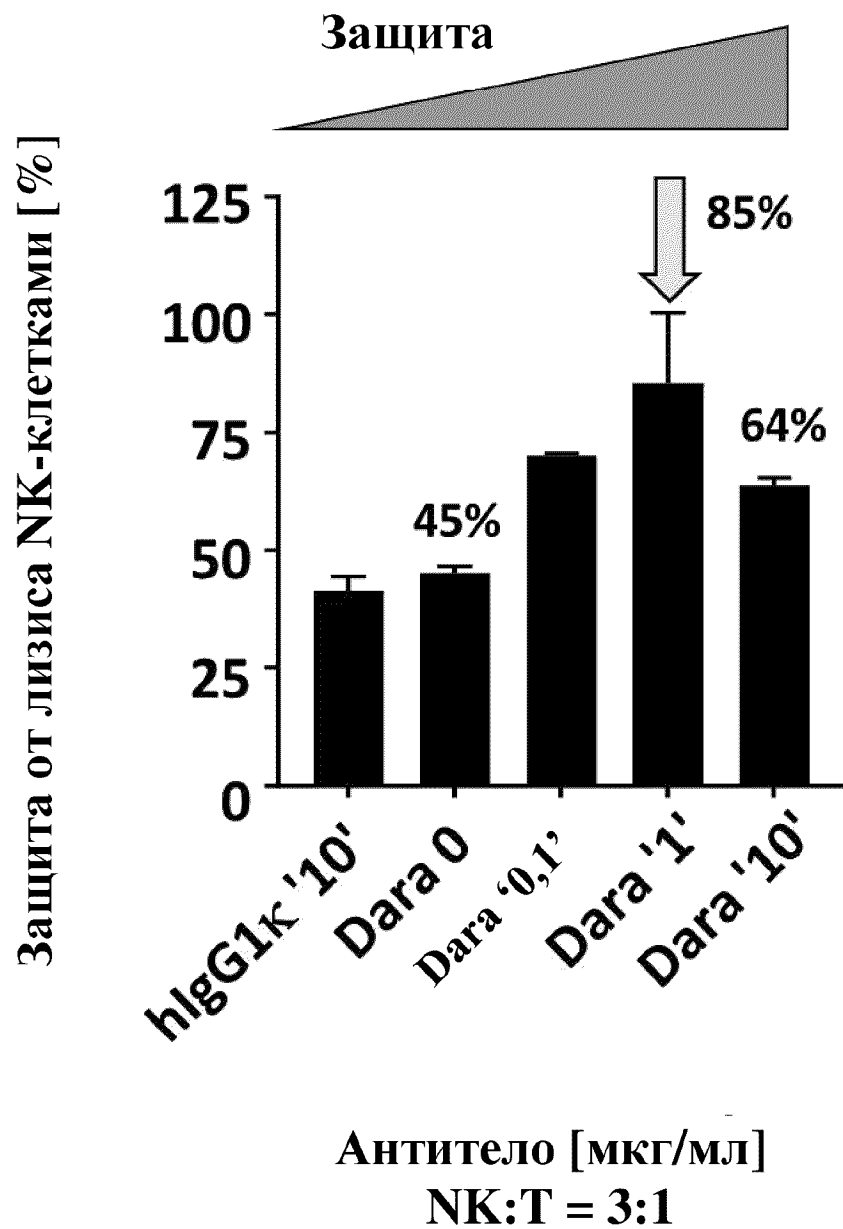
ФИГ. 10А



ФИГ. 10В

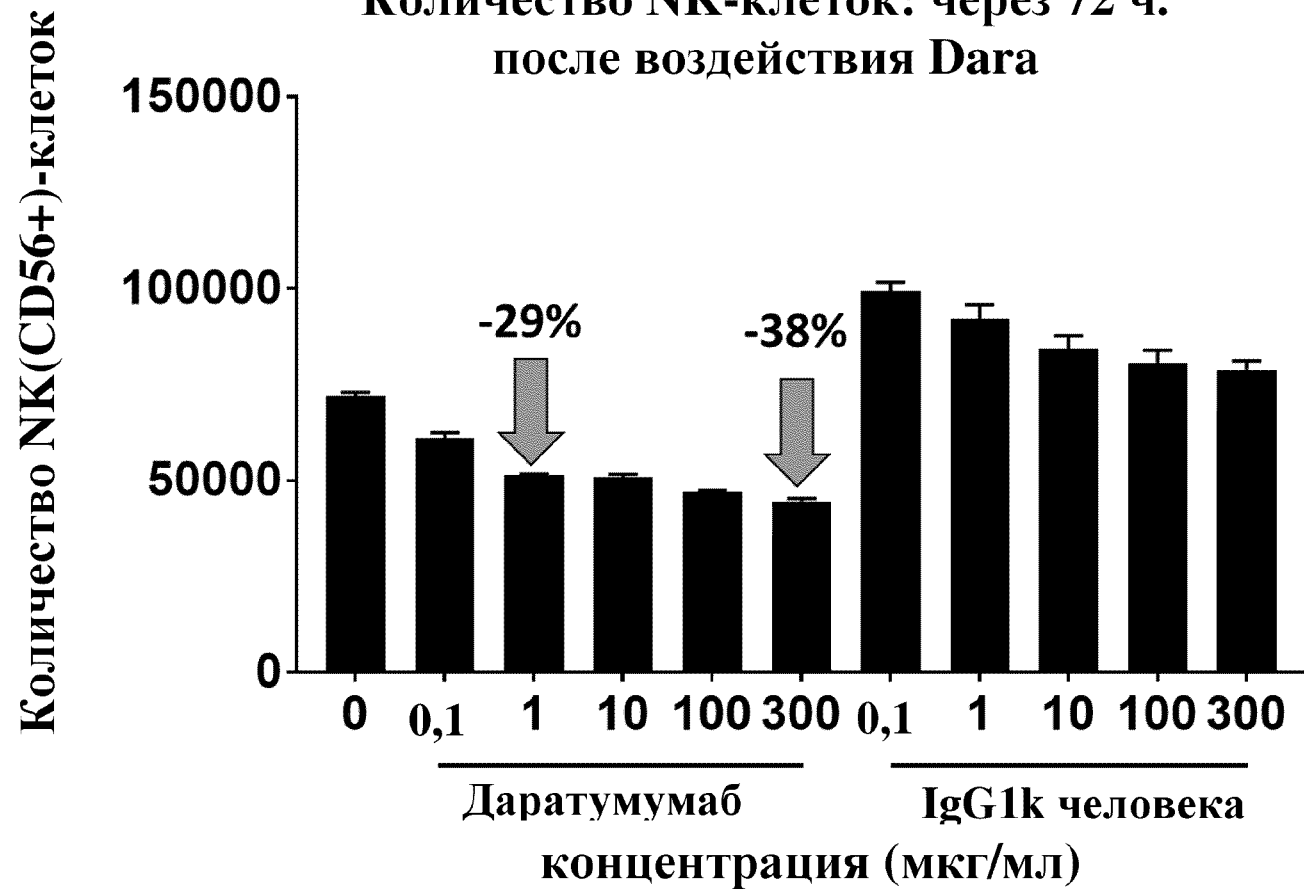


ФИГ. 10С



ФИГ. 11А

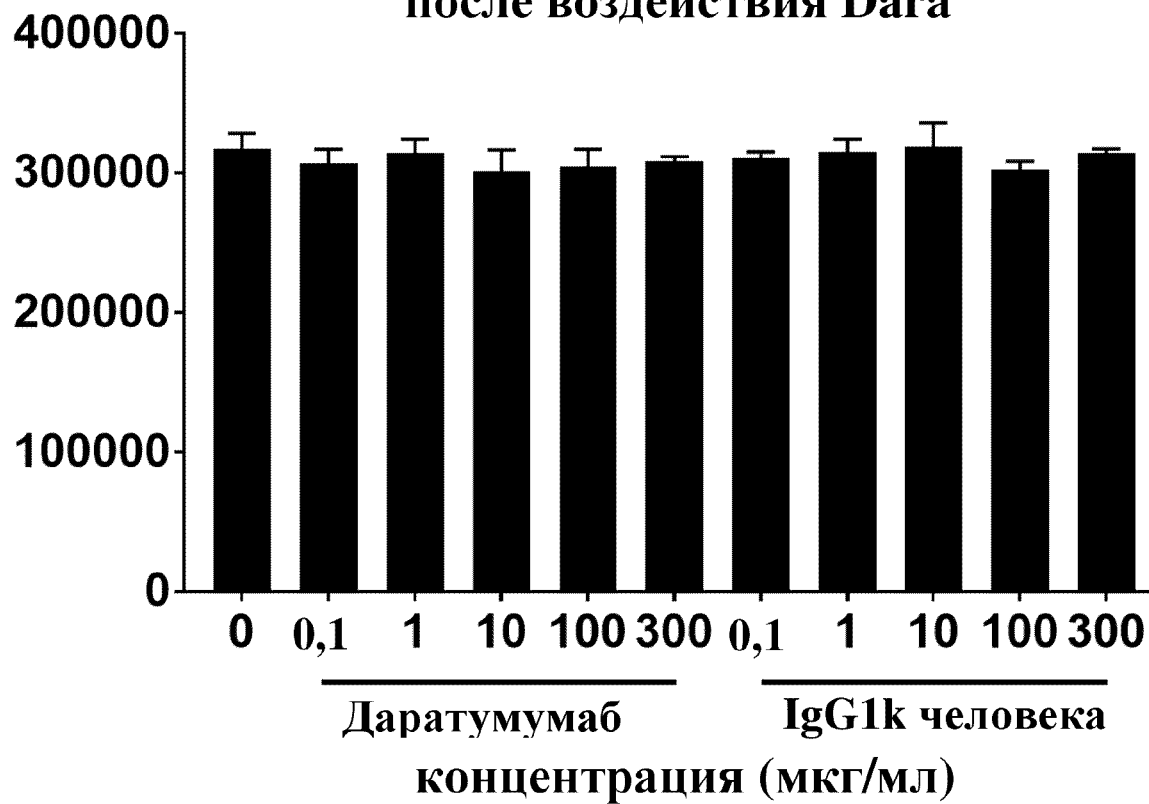
Количество НК-клеток: через 72 ч.
после воздействия Dapa



ФИГ. 11В

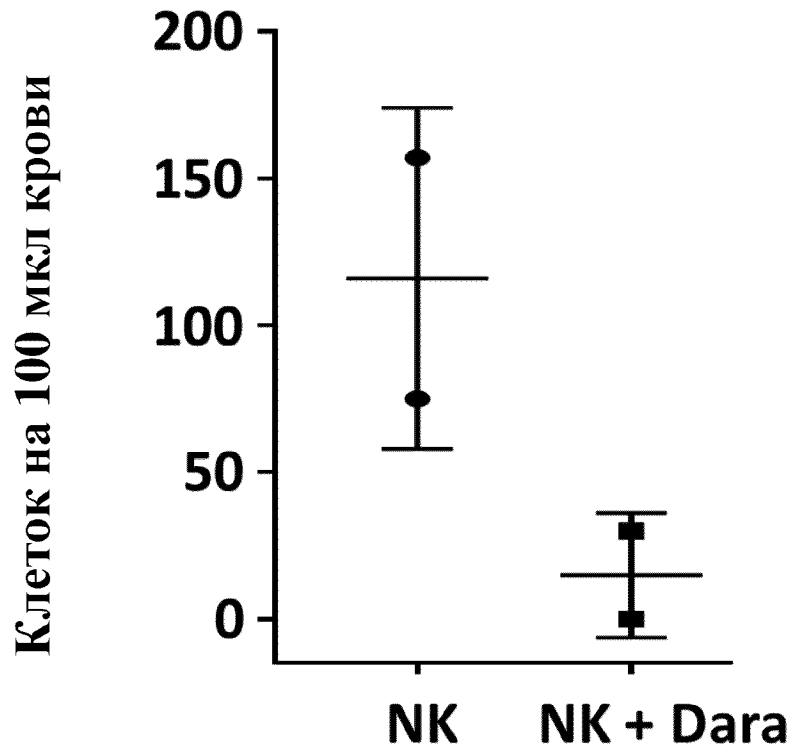
**Количество CAR-T-клеток: через 72 ч.
после воздействия Dapa**

Количество CAR-T-клеток к ВСМА

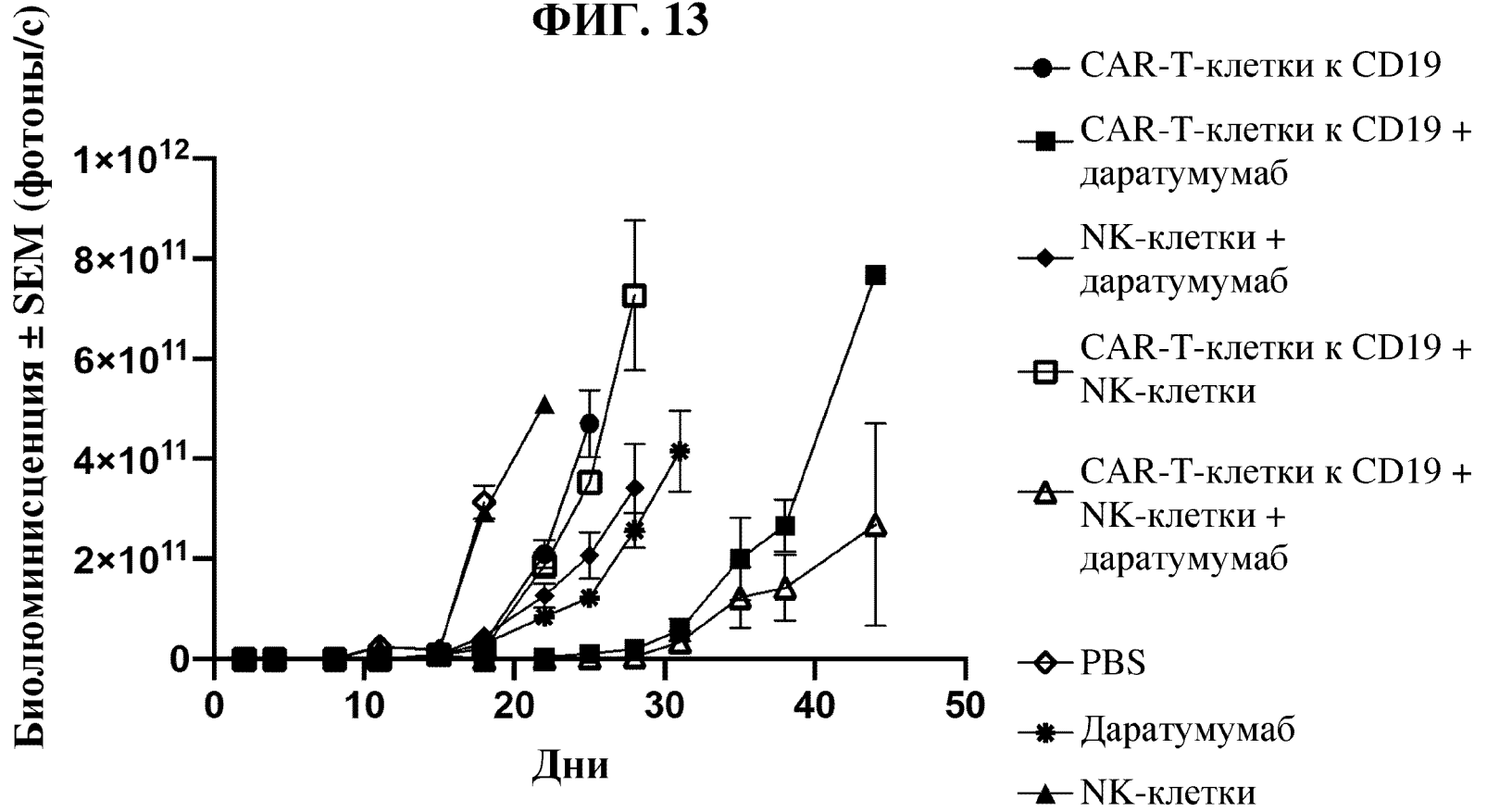


38/43

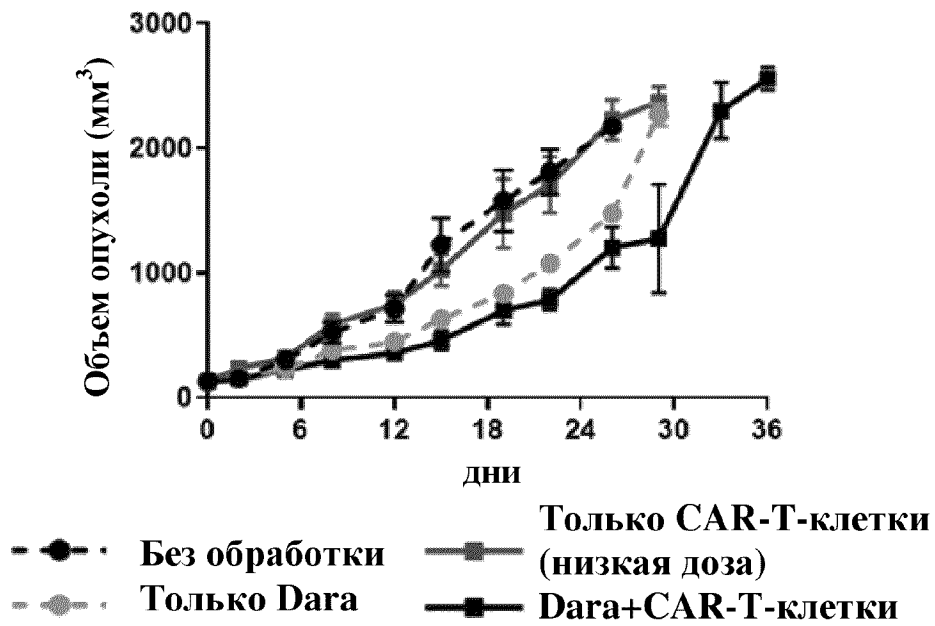
ФИГ. 12



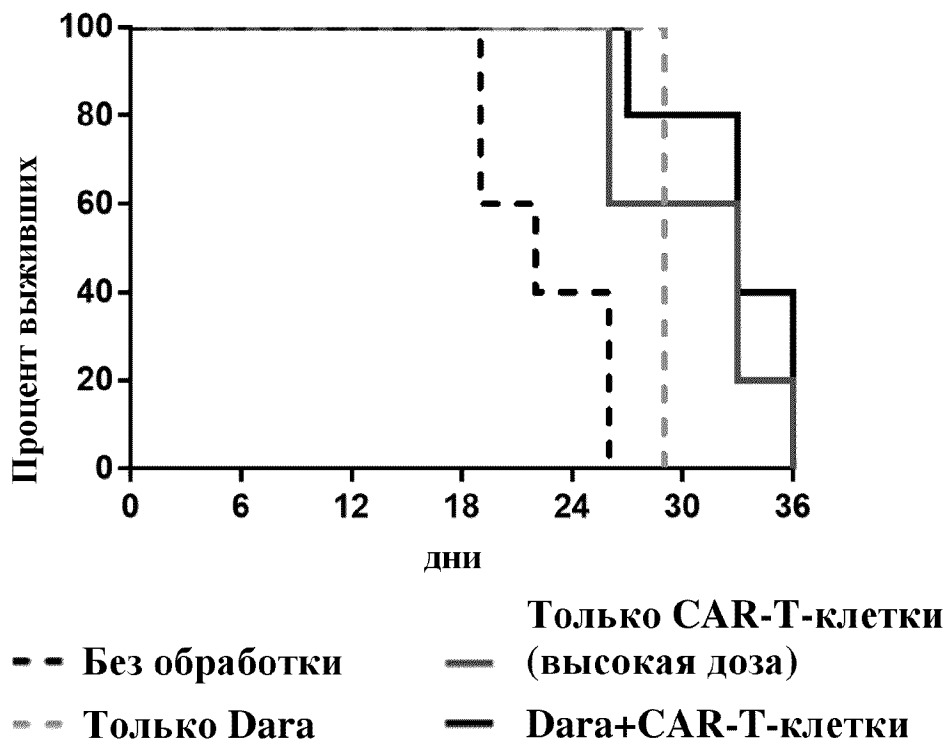
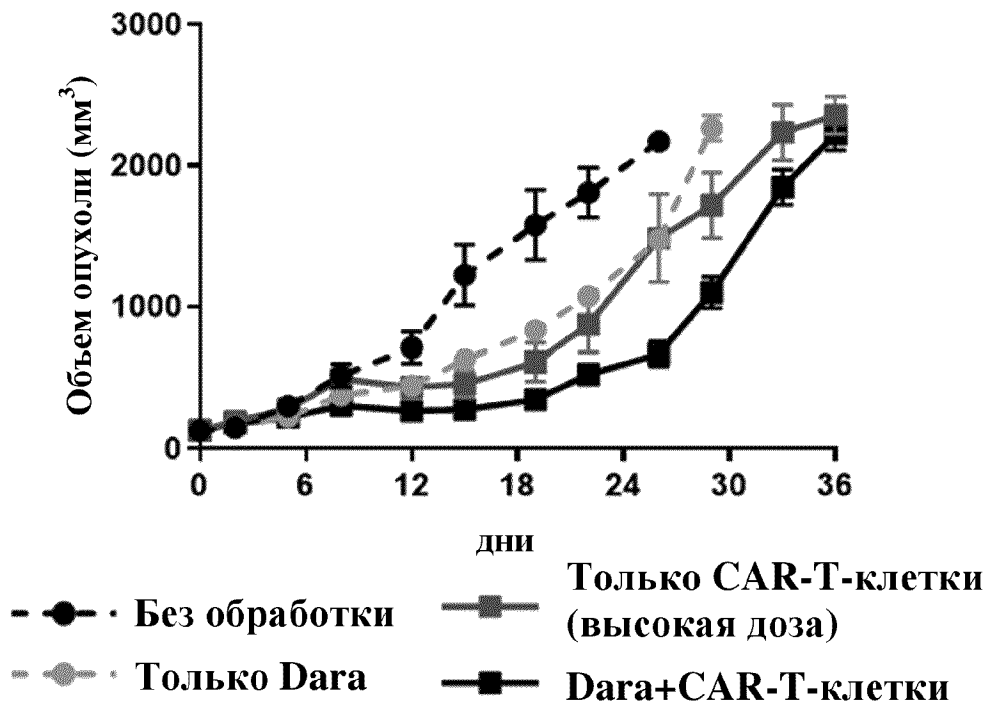
ФИГ. 13



ФИГ. 14А



ФИГ. 14В



ФИГ. 14С

