

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291074 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.30

(51) Int. Cl. A61K 35/17 (2015.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.10.15

(54) ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА В CART-КЛЕТКАХ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/073,651

(32) 2014.10.31

(33) US

(62) 201790953; 2015.10.15

(71) Заявитель:
ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)

(72) Изобретатель:

Чжао Янбин, Жэнь Дзянтао, Лю
Сяоцзюнь, Джун Карл Х. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к композициям и способам получения модифицированной Т-клетки с нуклеиновой кислотой, способной подавлять экспрессию эндогенного гена, выбранного из группы, состоящей из α -цепи TCR, β -цепи TCR, β -2-микроглобулина, молекулы HLA, CTLA-4, PD1 и FAS, и дополнительно содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный Т-клеточный рецептор (TCR), обладающий аффинностью к поверхностному антигену на клетке-мишени, или электропорированную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR). Также включены способы и фармацевтические композиции, содержащие модифицированную Т-клетку для адоптивной терапии и лечения состояния, такого как аутоиммунное заболевание.

A1

202291074

202291074

A1

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА В CART-КЛЕТКАХ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ**

В настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с 35 U.S.C. 119(e) на основании предварительной патентной заявки США № 62/073651, зарегистрированной 31 октября 2014 года, таким образом, полностью включенной посредством ссылки в настоящее описание.

ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО ФЕДЕРАЛЬНО СПОНСИРОВАННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ИЛИ РАЗРАБОТКИ

Это изобретение было выполнено при правительственной поддержке CA120409, предоставляемой Национальным институтам здравоохранения. Правительство обладает определенными правами на изобретение.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ, ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ ИЗОБРЕТЕНИЮ

Показано, что адоптивный перенос клеток (АСТ) с использованием модифицированных химерных антигенным рецептором (CAR) Т-клеток является перспективной стратегией для лечения злокачественных опухолей (Louis et al., 2011, Blood, 118:6050-6056; Kochenderfer et al., 2010, Blood, 116:3875-3886 и Porter et al., 2011, N. Engl. J. Med., 365:725-733).

Проблемы безопасности, связанные с встраиванием лентивирусных или ретровирусных векторов, являются основной причиной беспокойства в отношении модификации клеток, используемых для АСТ. Некоторые успехи были достигнуты для устранения целевых или нецелевых нежелательных побочных эффектов, такие как трансфекция РНК Т-клеток Т-клеточным рецептором (TCR) или электропорация РНК CAR (Zhao, 2006, Mol. Ther., 13:151-159; Mitchell et al., Smits et al., 2004, Leukemia, 18:1898-1902). В результате сведением к минимуму дозирования РНК и Т-клеток такие способы позволяют эффективно вводить многие гены в клетки. Однако основным ограничением транзитной экспрессии CAR является субоптимальная эффекторная активность и функциональность трансфицированных РНК Т-клеток. Многократные инфузии Т-клеток и/или значительное использование химиотерапии в низкой дозе использовали для улучшения функции

CAR (Barrett et al., 2013, Hum. Gene Ther., 24(8):717-27).

Предпринимали различные попытки для улучшения эффекторной активности и функциональности CAR наряду с устранением необходимости в способах комбинированного лечения и дополнительных видов влечения. Увеличение РНК во время процесса трансфекции оказывает негативное воздействие на функцию Т-клеток, особенно виды противоопухолевой активности *in vivo* (Barrett et al., 2011, Hum. Gene Ther., 22:1575-1586). В клинических испытаниях для лечения злокачественных опухолей также тестировали альтернативные конструкции, в которых сливали антигенный фрагмент антитела против CD3 с антигенным фрагментом антитела против опухоли (Bargou et al., 2008, Science, 321:974-977; Klinger et al., 2012, Blood, 119:6226-6233). К сожалению, такие конструкции являлись в значительной степени ограниченными по функциональности вследствие короткого времени полужизни, слабой доступности к участкам клетки-мишени и отсутствия корректной функции длительной передачи сигналов.

Клинические исследования TCR были затруднены вследствие низких уровней экспрессии трансдуцированных TCR, а также ошибочного спаривания α - и β -цепей. Вследствие того, что на клеточной поверхности могут потенциально экспрессироваться четыре TCR, когда Т-клетка транскрибирует цепи двух различных TCR (нативные альфа/бета, экзогенные альфа/бета и нативные/экзогенные "ошибочно спаренные" гетеродимеры), значительные препятствия использования данного подхода являются очевидными. В исследованиях, проводимых до настоящего времени, в доклинических исследованиях было наглядно продемонстрировано, что ошибочное спаривание TCR потенциально может индуцировать опасное распознавание аутоантигенов.

Несмотря на то, что ранние клинические данные по TCR и CAR Т-клеткам, получаемые при лечении злокачественных опухолей демонстрировали перспективные результаты, риск для пациента является высоким, и Т-клетки некоторых пациентов не являются достаточно активными для эффективного лечения даже после перенаправления TCR или CAR, инициируя модификацию аллогенных

получаемых от донора Т-клеток. Однако эндогенный Т-клеточный рецептор $\alpha\beta$ на введенных инфузией аллогенных Т-клетках может распознавать главные и минорные антигены гистосовместимости у реципиента, что приводит к болезни "трансплантат против хозяина" (GVHD). В результате большая часть проводимых в настоящее время клинических испытаний с использованием инфузии аутологичных CAR Т-клеток основана на иммунологической толерантности для предотвращения опосредованного TCR вредного распознавания нормальных тканей после адоптивного переноса клеток. Такой подход позволял достичь ранних клинических успехов, но является ограниченным по времени и стоимости производства продуктов персонализированных Т-клеток. Таким образом, существует необходимость в более безопасных способах модификации Т-клеток, при этом избегая затрат, связанных со временем и стоимостью производства продуктов персонализированных Т-клеток.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Как описано в настоящем описании, настоящее изобретение относится к композициям и способам получения модифицированной Т-клетки с нуклеиновой кислотой, способной изменять генную экспрессию эндогенного гена, выбранного из группы, состоящей из α -цепи TCR, β -цепи TCR, бета-2-микроглобулина, молекулы HLA, CTLA-4, PD1 и FAS, и дополнительно содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR).

Один из аспектов изобретения относится к модифицированной Т-клетке, содержащей нуклеиновую кислоту, способную подавлять генную экспрессию эндогенного гена, выбранного из группы, состоящей из α -цепи TCR, β -цепи TCR, бета-2-микроглобулина, молекулы HLA, CTLA-4, PD1 и FAS; и нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен костимулирующей молекулы.

В другом аспекте изобретение относится к способу получения модифицированной Т-клетки, содержащей введенную нуклеиновую кислоту, способную подавлять генную экспрессию эндогенного гена, выбранного из группы, состоящей из α -цепи TCR, β -цепи TCR, бета-

2-микроглобулина, молекулы HLA, CTLA-4, PD1 и FAS в Т-клетке; и введенную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, связанного с повышенным иммунитетом у индивидуума, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей модифицированную Т-клетку, описываемую в настоящем описании, нуждающемуся в этом индивидууму.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения состояния у индивидуума, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей модифицированную Т-клетку, описываемую в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к способу стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа к клетки-мишени или ткани у индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей модифицированную Т-клетку, описываемую в настоящем описании.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу терапии на основе адоптивного переноса клеток, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей модифицированную Т-клетку, описываемую в настоящем описании, нуждающемуся в этом индивидууму для профилактики или лечения иммунного ответа, который является неблагоприятным у индивидуума.

В другом аспекте изобретение относится к использованию модифицированной Т-клетки, описываемой в настоящем описании, в производстве лекарственного средства для лечения иммунного ответа у нуждающегося в этом индивидуума.

В другом аспекте изобретение относится к композиции, содержащей модифицированную Т-клетку, получаемую способом, описываемым в настоящем описании.

В еще одном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей модифицированную Т-

клетку, получаемую способом, описываемым в настоящем описании.

В различных вариантах осуществления указанных выше аспектов или любого другого аспекта изобретения, описанного в настоящем описании, нуклеиновая кислота, способная подавлять экспрессию гена, выбранного из группы, состоящей из антисмысловой РНК, антагомирной РНК, миРНК, кшРНК и системы CRISPR, такой как вектор pAd5/F35-CRISPR.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен CAR содержит антитело, выбранное из группы, состоящей из моноклонального антитела, поликлонального антитела, синтетического антитела, антитела человека, гуманизированного антитела, однодоменного антитела, одноцепочечного вариабельного фрагмента и их антигенсвязывающих фрагментов. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий домен CAR специфически связывается с антигеном на клетке-мишени. В еще одном варианте осуществления внутриклеточный домен CAR содержит двойные сигнальные домены.

В другом варианте осуществления модифицированная Т-клетка, описываемая в настоящем описании, дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую костимулирующую молекулу, такую как CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BB, 4-1BBL, PD1 и PD1L. В одном из вариантов осуществления способ получения модифицированной Т-клетки, описываемой в настоящем описании, дополнительно включает электропорацию РНК, кодирующую костимулирующую молекулу, в Т-клетку. В определенных вариантах осуществления, где костимулирующая молекула представляет собой CD3, CD3 содержит по меньшей мере две различные цепи CD3, такие как дзета-цепь CD3 и эILON-цепь CD3.

В другом варианте осуществления Т-клетку получают из группы, состоящей из моноклеарных клеток периферической крови, клеток пуповинной крови, очищенной популяции Т-клеток и линии Т-клеток.

В еще одном варианте осуществления способ получения модифицированной Т-клетки как описано в настоящем описании, дополнительно включает размножение Т-клетки. В одном из вариантов осуществления размножение Т-клетки включает

культивирование Т-клетки с фактором, выбранным из группы, состоящей из flt3-L, IL-1, IL-3 и лиганда c-kit.

В еще одном другом варианте осуществления способ получения модифицированной Т-клетки, как описано в настоящем описании, дополнительно включает криоконсервацию Т-клетки. В другом варианте осуществления способ, описываемый в настоящем описании, дополнительно включает размораживание криоконсервированной Т-клетки перед введением нуклеиновой кислоты в Т-клетку.

В одном из вариантов осуществления введение нуклеиновой кислоты выбрано из группы, состоящей из трансдукции размноженных Т-клеток, трансфекции размноженных Т-клеток и электропорации размноженных Т-клеток.

В еще одном варианте осуществления способ, описываемый в настоящем описании, дополнительно включает размножение Klf4, Oct3/4 и Sox2 в Т-клетках для индукции плюрипотентности Т-клетки.

В различных вариантах осуществления указанных выше аспектов или любого другого аспекта изобретения, определяемого в настоящем описании, изобретение относится к введению модифицированной Т-клетки индивидууму. В одном из вариантов осуществления индивидуум страдает состоянием, таким как аутоиммунное заболевание. В определенных вариантах осуществления аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД), очаговой алопеции, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, аутоиммунной болезни Аддисона, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного заболевания внутреннего уха (AIED), аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома (ALPS), аутоиммунной тромбоцитопенической пурпуры (АТР), болезни Бехчета, кардиомиопатии, герпетиформной целиакии-дерматита; синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции (CFIDS), хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIPD), рубцующегося пемфигоида, болезни холодových агглютининов, CREST-синдрома, болезни Крона, болезни Дегоса, юношеского дерматомиозита, дискоидной волчанки, эссенциальной смешанной

криоглобулинемии, фибромиалгии-фибромиозита, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, идиопатического легочного фиброза, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), нефропатии IgA, инсулинозависимого сахарного диабета, юношеского хронического артрита (болезни Стилла), юношеского ревматоидного артрита, болезни Меньера, смешанного заболевания соединительной ткани, рассеянного склероза, тяжелой миастении, пернициозной анемии, узелкового периартериита, полихондрии, полигландулярных синдромов, ревматической полимиалгии, полимиозита и дерматомиозита, первичной агаммаглобулинемии, первичного билиарного цирроза, псориаза, псориатического артрита, синдрома Рейно, синдрома Рейтера, ревматической лихорадки, ревматоидного артрита, саркоидоза, склеродермии (прогрессирующего системного склероза (PSS), также известного как системный склероз (SS)), синдрома Шегрена, синдрома скованного человека, системной красной волчанки, артериита Такаясу, височного артериита/гигантоклеточного артериита, язвенного колита, увеита, витилиго, гранулематоза Вегенера и любого их сочетания.

В другом варианте осуществления состояние представляет собой злокачественную опухоль, такую как злокачественная опухоль, выбранная из группы, состоящей из рака молочной железы, рака предстательной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака кожи, рака поджелудочной железы, колоректального рака, злокачественной опухоли почки, рака печени, злокачественной опухоли головного мозга, лимфомы, лейкоза, рака легких и любого их сочетания.

В другом варианте осуществления способ, описываемый в настоящем описании, дополнительно включает индицирование лизиса, такого как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), клетки-мишень или ткани.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Следующее ниже подробное описание предпочтительных вариантов осуществления изобретения будет лучше понятно при прочтении в сочетании с прилагаемыми чертежами. С целью иллюстрации изобретения на чертежах продемонстрированы варианты

осуществления, которые являются в настоящее время предпочтительными. Однако следует понимать, что изобретение не ограничено точными расположениями и средствами вариантов осуществления, продемонстрированных на чертежах.

Фигура 1, содержащая фигуры 1A-1C, представляет собой иллюстрацию конструкции CRISPR и направленного воздействия комплекса $\alpha\beta$ -CD3 TCR в клетках 293T. На фигуре 1A продемонстрированы участки-мишени гРНК CRISPR в геномном локусе константной области TCR- α и - β . Каждый экзон показан блоком. Черные блоки представляют собой кодирующие области. Серые колонки представляют собой некодирующие области. Конструировали тринадцать гРНК для направленного воздействия на экзон 1 константной области TCR α (TRAC), 10 гРНК направленно воздействует на консервативную последовательность в экзоне 1 константных областей 1 (TRBC1) и 2 (TRBC2) TCR β , и 10 гРНК направленно действует на экзон 1 гена микроглобулина бета-2. На фигуре 1B продемонстрирована характерная последовательность каркаса гРНК. Продукты ПЦР гРНК получали перекрывающейся ПЦР и клонировали в вектор MSGV с промотор T7. На фигуре 1C продемонстрированы результаты секвенирования по Сенгеру, демонстрирующие, что множество пиков присутствует в геномных продуктах ПЦР TRAC и TRBC TCR 293T после трансфекции иРНК и гРНК CAS9 в клетки.

На фигуре 2, содержащей фигуры 2A-2E, продемонстрировано разрушение комплекса $\alpha\beta$ -CD3 TCR в первичных Т-клетках. Фигура 2A представляет собой таблицу, в которой представлены параметры, используемые для электропорации иРНК и гРНК CAS9 в первичные Т-клетки с VTХ830. 360 В 1 мс с 2 мм кюветами проводили к наилучшей средней интенсивности флуоресценции (MFI) и эффективности электропорации на сутки 3 гранулы стимулировали первичные Т-клетки. Фигура 2B представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что Т-клетки, инкубируемые при 32°C 5% CO₂, характеризуются значительно большей MFI, чем нормальные условия 37°C 5% CO₂. Фигура 2C представляет собой схематическую иллюстрацию системы CRISPR, трансфицированной в первичные Т-

клетки. иРНК и гРНК CAS9 электропорировали в Т-клетки через трое суток после стимуляции гранулами первичных Т-клеток. Затем Т-клетки культивировали 100 МЕд./мл IL-2 и некоторые клетки инкубировали при 32°C 5% CO₂ в течение 1 суток, а затем в течение еще от 7 до 9 суток. Экспрессию CD3 анализировали проточной цитометрией на сутки 7-9 после электропорации. Фигура 2D представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что целевая эффективность при 37°C являлась приблизительно в 2,5 раза выше, чем при 32°C. Фигура 2E представляет собой панель графиков, демонстрирующих снижение экспрессии CD3 на сутки 6 после электропереноса различных количеств и отношений CAS9 и гРНК, направленной на TCR β . Экспрессию CD3 анализировали посредством окрашивания на CD3. Приведены репрезентативные данные о потоках на сутки 6 после электропорации. Квадрант представляет собой процентное содержание CD3-отрицательных клеток в популяциях Т-клеток.

На фигуре 3, содержащей фигуры 3А-3D, продемонстрировано, что нокаут TCR^{neg} альфа или бета в Т-клетках можно обогащать истощением TCR^{pos} Т-клеток. Фигура 3А представляет собой панель графиков, демонстрирующих экспрессию CD3 до и после истощения микрогранул нокаута TCR^{neg} альфа или бета в Т-клетках. Проточная цитометрия демонстрирует экспрессию CD3. Числа в нижнем правом квадранте представляют процентное содержание CD3-негативных клеток в популяциях Т-клеток. Фигура 3В представляет собой панель графиков секвенирования, демонстрирующих, что наблюдали множество пиков в обогащенных CD3^{neg} Т-клетками геномных продуктах ПЦР. Фигура 3С представляет собой панель графиков, демонстрирующих анализ спектра CD4 и CD8 Т-клеток после обогащения микрогранулами CD3 в Т-клетках с одиночным нокаутом по альфа-цепи, бета-цепи и двойным нокаутом по альфа бета, модифицированных CRISPR. Данные демонстрируют, что отношение популяции CD8 Т-клеток увеличивалось в результате модификации CRISPR, что подтверждает, что CD8 Т-клетка можно легче модифицировать, чем CD4 Т-клетки. На фигуре 3D представлены результаты делецией и вставок, вводимых в локус альфа и бета TCR

после модификации CRISPR.

На фигуре 4, содержащей фигуры 4А-4С, продемонстрировано, что многократные электропереносы гРНК значительно улучшают целевую эффективность системы CRISPR в первичных Т-клетках. Фигура 4А представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что многократные электропорации гРНК значительно улучшали целевую эффективность. Электропорация Т-клеток до трех раз в течение 24 часов приводила к наибольшей целевой эффективности, приблизительно 80%. В начальном эксперименте в Т-клетках получали только 15% процентов целевой эффективности TCR. После электропереноса иРНК CAS9 в Т-клетки наблюдали устойчивую экспрессию CAS9. Вероятная причина низкой эффективности расщепления может быть обусловлена быстрым разрушением гРНК. Получали более высокие CD3-отрицательные популяции. Фигура 4В представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что кэпирование ослабляет функцию гРНК, в то время как раннее введение гРНК во втором круге приводило к более высокой эффективности. Фигура 4С представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что многократные электропереносы гРНК, направленной на TRAC и TRBC в ND221, приводят к коэффициенту расщепления приблизительно 64,5% и 57,5%, соответственно.

На фигуре 5, содержащей фигуры 5А и 5В, продемонстрировано, что TCR^{neg} Т-клетки можно размножать в различных стимулирующих условиях. Фигура 5А представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что TCR^{neg} Т-клетки восстанавливают экспрессию CD3 после повторного введения альфа- и бета-цепей TCR в TCR^{neg} Т-клетки. CD3 и Vb13.1 детектировали после электропорации альфа- и бета-цепей TCR в TCR^{neg} Т-клетки. Уровень экспрессии CD3 являлся сравнимым с TCR^{pos} Т-клетками. Фигура 5В представляет собой панель графиков, демонстрирующих кратность размножения после различных условий, используемых для стимуляции TCR^{neg} Т-клеток. REP PBMC приводили приблизительно к повышению размножения в 500 раз, тогда как гранулы CD3/CD28 или повторная стимуляция K562 aAPC приводили приблизительно к увеличению размножения в 25-58 раз.

На фигуре 6, содержащей фигуры 6А и 6В, представлены

характеристики TCR^{neg} Т-клеток после экспрессии в различных условиях. Фигура 6А представляет собой панель графиков, демонстрирующих характеристики фенотипа TCR^{neg} Т-клеток после экспрессии в различных условиях. Фигура 6В представляет собой панель графиков, демонстрирующих характеристики фенотипа TCR^{neg} Т-клеток после экспрессии в различных условиях.

На фигуре 7, содержащей фигуры 7А-7С, представлены размноженные TCR^{neg} Т-клетки с высокой противоопухолевой активностью после перенаправления *in vitro*. Фигура 7А представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что TCR^{neg} Т-клетки можно перенаправлять посредством введения TCR против NY-ESO 1G4 в клетки. По сравнению с группой имитации CAS9 при перенаправлении посредством TCR1G4 для TCR^{neg} Т-клеток демонстрировали более высокий уровень экспрессии Vb13.1 вследствие меньшего ошибочного спаривания экзогенных и эндогенных альфа- и бета-цепей TCR. Фигура 7В представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что TCR^{neg} Т-клетки, перенаправленные TCR1G4, обладали высокой активностью дегрануляции при культивировании совместно с линией опухолевых (Nalm6-ESO) клеток. Фигура 7С представляет собой график, демонстрирующий, что TCR^{neg} Т-клетки, перенаправленные TCR 1G4, обладали высокой цитотоксичностью в отношении линии опухолевых клеток.

Фигура 8 представляет собой панель иллюстраций, демонстрирующих, что направленные TCR^{neg} Т-клетки подавляют рост опухоли у мышей NSG после перенаправления.

На фигуре 9, содержащей фигуру 9А-9D, продемонстрировано, что получали элиминацию HLA-CLASS I в результате разрушения бета-2 микроглобина. На фигуре 9А представлены данные секвенирования CRISPR, способных разрушать локус бета-2 микроглобина в клетках HEK293. Фигура 9В представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что отрицательную по bHLA-CLASS I популяцию Т-клеток получали путем разрушения бета-2 микроглобина. Фигура 9С представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что cIFN γ улучшал целевую эффективность бета-2 микроглобина в первичных Т-клетках. Фигура 9D представляет собой

панель графиков, демонстрирующих, что HLA-CLASS I^{neg} Т-клетки обогащали в результате истощения микрогранул.

Фигура 10 представляет собой панель графиков, демонстрирующих одновременный нокаут HLA-CLASS I и TCR в первичных Т-клетках. CD4 и CD8 Т-клетки стимулировали гранулами Dynabeads CD3/CD28. Через трое суток после стимуляции размноженные Т-клетки электропорировали иРНК CAS9 совместно с β константной областью TCR (TRBC) и бета-2 микроглобином, направленно воздействующим на гРНК. Оценивали экспрессию TCR и экспрессию бета-2 микроглобина с использованием моноклонального антитела (mAb) против CD3 и mAb против бета-2 микроглобина через шесть суток после электропорации. Цифры отражают процент популяции в каждом квадранте.

На фигуре 11, содержащей фигуры 11A-11D, представлен тройной нокаут HLA-CLASS I и альфа- и бета-цепи TCR в первичных Т-клетках. Фигура 11A представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что CD4 и CD8 Т-клетки стимулировали гранулами Dynabeads CD3/CD28. Через трое суток после стимуляции размноженные Т-клетки электропорировали иРНК CAS9 совместно с константной областью альфа-, бета-цепи TCR (TRAC, TRBC) и бета-2 микроглобином, направленно воздействующим на гРНК. Экспрессию TCR и экспрессию HLA-CLASS I оценивали с использованием моноклонального антитела (mAb) против CD3 и mAb против бета-2 микроглобина через шесть суток после электропорации. Числа отражают процент популяции в каждом квадранте. Фигура 11B представляет собой схему, иллюстрирующую выделение Т-клеток с тройным нокаутом по HLA-CLASS I и альфа- и бета-цепям TCR. Фигура 11C представляет собой панель графиков, демонстрирующих эффективность электропорации, тестируемую посредством экспрессии GFP. Фигура 11D представляет собой панель графиков, демонстрирующих повторное введение альфа- и бета-цепей TCR в TCR^{neg} Т-клетки, как измеряют проточной цитометрией. В суммарных TCR^{neg} Т-клетках наблюдали приблизительно 64% альфа-отрицательной и приблизительно 14% бета-отрицательной популяции.

На фигуре 12, содержащей фигуры 12A-12D, представлен нокаут

FAS в клетках 293T. Фигура 12A представляет собой изображение, демонстрирующее результаты секвенирования по Сенгеру множества пиков, когда проводят нокаут FAS в клетках 293T. Фигура 12B представляет собой панель графиков, демонстрирующих данные FACS, выявляющие, что CRISPR нарушал экспрессию FAS белка на поверхности. Фигура 12C представляет собой панель изображений, демонстрирующих, что белок FAS заменялся GFP после гомологичной рекомбинации CRISPR. Фигура 12D представляет собой панель графиков данных FACS, демонстрирующих процент гомологичных рекомбинаций с CRISPR.

На фигуре 13 представлен нокаут FAS в первичных Т-клетках. Данные FACS иллюстрируют, что CRISPR отменяет экспрессию белка FAS на поверхности.

На фигуре 14, содержащей фигуры 14A и 14B, продемонстрирован нокаут PD1 в клетках 293T и первичных Т-клетках. Фигура 14A представляет собой изображение, демонстрирующее результаты секвенирования по Сенгеру множества пиков, когда направленно воздействуют на PD1 в клетках 293T. Фигура 14B представляет собой панель графиков, демонстрирующих данные FACS экспрессия на поверхности белка PD1, нарушенного CRISPR.

На фигуре 15, содержащей фигуры 15A и 15B, представлен нокаут CTLA4 в клетках 293T и первичных клетках, таких как CCD1079-SK. Фигура 15A представляет собой изображение, демонстрирующее результаты секвенирования по Сенгеру множества пиков, когда направленно воздействовали на CTLA4 в клетках 293T. Фигура 15B представляет собой изображение, демонстрирующее данные последовательности после лимитирующего разведения и размножения одной клетки. Результаты секвенирования по Сенгеру указывают на делеции и вставки в геномном локусе CTLA4.

На фигуре 16 представлен нокаут PPP2r2d в 293T. Данные секвенирования по Сенгеру указывали на то, что PPP2r2d подвергался направленному воздействию CRISPR в клетках 293T.

На фигуре 17, содержащей фигуры 17A и 17B, продемонстрировано получение iPSC из Т-клеток с нокаутом по FAS. Фигура 17A представляет собой панель изображений,

демонстрирующих морфологическое изменение во время процесса перепрограммирования FAS^{neg} Т-клеток в iPSC. Образование характерной морфологии эмбриональных стволовых клеток, свидетельствующее о том, что FAS^{neg} Т-клетки можно индуцировать в плюрипотентное состояние. Фигура 17B представляет собой график, демонстрирующий, что FAS^{neg} Т-клетки перепрограммировали в iPSCs с эффективностью приблизительно в 5 раз большей по сравнению с аналогами дикого типа. Сообщалось, что линии клеток с недостаточностью p53 легче перепрограммировать вследствие препятствия пути апоптоза. Нокаут FAS может облегчать процесс перепрограммирования посредством аналогичного механизма.

На Фигуре 18, содержащей фигуру 18A и 18B, продемонстрировано получение iPSC из CD3^{neg} Т-клеток. Фигура 18A представляет собой панель изображений, демонстрирующих ES-подобную морфологию, формируемую Т-клетками с нокаутом альфа- или бета-цепи CD3^{neg} TCR в определенных условиях перепрограммирования. Морфология остается постоянной после нескольких пассажей. Фигура 18B представляет собой серию графиков, демонстрирующих, что перепрограммирование CD3^{neg} Т-клеток являлось приблизительно в 5 раз более эффективным, чем аналогов дикого типа, что свидетельствует о том, что нокаут TCR может играть роль в процессе перепрограммирования Т-клеток или влиять на жизнеспособность клеток после инфицирования вирусом Сендай.

Фигура 19 представляет собой график, демонстрирующий нокдаун эндогенных Т-клеточных рецепторов (TCR) миРНК и добавление второй дисульфидной связи и удаление N-гликозилирования до бета-цепи.

На фигуре 20, содержащей фигуры 20A и 20B, представлен нокаут TCR посредством РНК и гРНК CAS9. Через шесть суток после электропорации клетки анализировали на экспрессию TCR путем оценки CD3.

Фигура 21 представляет собой иллюстрацию, демонстрирующую результаты секвенирования ПЦР после истощения микрогранул CD3.

Фигура 22 представляет собой панель графиков, демонстрирующих повторную экспрессию CD3 через четыре часа после

электропорации РНК NY-ESO-1 TCR.

Фигура 23, содержащая фигуры 23А-23D, представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что нокдаун эндогенного TCR усиливал экспрессию трансгена и функцию электропорированных РНК TCR Т-клеток. На фигуре 23А продемонстрирована экспрессия TCR Т-клетками, электропорированных миРНК TCR (открытая гистограмма со сплошными столбиками), контрольной миРНК (точечная открытая гистограмма), и Т-клетками без какой-либо миРНК (заполненная). На фигуре 23В продемонстрирована экспрессия трансгена (TCR vb13.1) РНК TCR NY-ESO-1 дикого типа (wt) или модифицированного TCR (SD) Т-клетками, электропорированными миРНК TCR, контрольной миРНК или без миРНК. На фигуре 23С продемонстрировано окрашивание тетрамера NY-ESO-1 РНК TCR NY-ESO-1 дикого типа (wt) или модифицированного TCR (SD) Т-клеток, электропорированных миРНК TCR, контрольной миРНК или без миРНК. На фигуре 23D продемонстрирован специфический лизис положительной по HLA-A2/NY-ESO-1 опухолевой линии электропорированными миРНК нокдаун TCR, РНК TCR NY-ESO-1 дикого типа Т-клетками.

Фигура 24 представляет собой график, демонстрирующий флуоресценцию опухолевых клеток после инъекции Т-клеток на модели на мышах. Десять миллионов опухолевых клеток Nalm6-CBG-ESO-GFP (зеленого шелкоуна), которые экспрессировали NY-ESO-1 и GFP, инъектировали внутривенно мышам NOD/SCID. Через пять суток после инокуляции опухоли трансдуцированные CBR и электропорированные РНК Т-клетки инъектировали, как указано в различных группах, и детектировали опухолевые клетки посредством флуоресценции.

Фигура 25 представляет собой панель изображений, демонстрирующих флуоресценцию инъектированных опухолевых клеток и Т-клеток с гибридным TCR на моделях на мышах в течение длительного периода времени.

Фигура 26 представляет собой панель изображений, демонстрирующих получение универсальных CAR19 Т-клеток. Верхняя часть фигуры представляет собой иллюстрацию протокола получения универсальных CAR19 Т-клеток. На графике слева представлено процентное содержание CAR19-положительных Т-клеток после

трансдукции гена CAR19 с использованием лентивируса. На правой панели графиков представлено процентное содержание одних TCR-отрицательных и двойных TCR/HLA-A-отрицательных Т-клеток до и после сортировки.

Фигура 27 представляет собой панель графиков и таблицу, демонстрирующих кратность размножения CD19-положительных клеток после стимуляции облученными CD19 презентующими K562 клетками.

Фигура 28А представляет собой панель графиков, демонстрирующих экспрессию эндогенного и трансгенного гена размноженных K562-CD19 клеток.

Фигура 28В представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что экспрессия эндогенного TCR остается отрицательной в отрицательных по одному TCR клетках, при этом экспрессия TCR и HLA-A остается отрицательной в двойных TCR/HLA-A-отрицательных Т-клетках после стимулированного K562-CD19 размножения.

Фигура 29А представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что большая часть размноженных универсальных CAR19 Т-клеток является CD45RO-положительной и экспрессировала CD28 на средних уровнях экспрессии.

Фигура 29В представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что большая часть размноженных универсальных CAR19 Т-клеток сохраняла высокие уровни экспрессии CD62L и низкие экспрессии CCR7.

Фигура 30А представляет собой график, демонстрирующий, что редактирование гена CRISPR не оказывало влияния на противоопухолевую активность универсальных CAR19 Т-клеток *in vitro*.

Фигура 30В представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что отрицательные по одному TCR CAR19 Т-клетки и двойные TCR/HLA-A-отрицательные CAR19 Т-клетки обладают robust литической емкостью при сенсibilизации опухолевыми клетками Nalm6.

Фигура 30С представляет собой панель графиков, демонстрирующих секрецию цитокинов как часть высокой

противоопухолевой активности таких клеток.

Фигура 30D представляет собой панель графиков, демонстрирующих абляцию одного TCR или двойная абляцию TCR и HLA-A в CAR19 Т-клетках, которые обладали сходными кинетическими параметрами пролиферации после сенсibilизации опухолевыми клетками Nalm6.

Фигура 31 представляет собой панель изображений, демонстрирующих, что редактирование гена CRISPR не оказывало влияния на противоопухолевую активность универсальных CAR19 Т-клеток *in vivo*. Все мыши, получавшие не подвергавшиеся манипуляции Т-клетки, и мыши, вводили инфузией трансдуцированные GFP с использованием лентивируса Т-клетки дикого типа погибали в течение 3 недель после инфузии опухолевых клеток. Объективную регрессию опухоли наблюдали для мышей, получавших CAR19 Т-клетки. Редактируемые CRISPR отрицательные по одному TCR или двойные TCR/HLA-A-отрицательные универсальные CAR19 Т-клетки обладали аналогичной противоопухолевой активностью.

Фигура 32A представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что абляция одного TCR или двойная абляция TCR и HLA-A в Т-клетках резко снижают аллореактивность.

Фигура 32B представляет собой панель графиков, демонстрирующих элиминацию активированных молекулой HLA-A NK-клеток с долгим периодом совместного культивирования (5 суток).

Фигура 32C представляет собой график, демонстрирующий, что не наблюдали побочной активности, когда клетки стимулировали аллогенной PBMC цельной крови в течение 24 часов в анализе IFN γ Eispot.

Фигура 33 представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что абляция FAS повышала противоопухолевую активность Т-клеток CAR19. Получали FAS-отрицательные CAR19 Т-клетки. Абляцию FAS подтверждали анализом проточной цитометрии. Экспрессию гена CAR19 FAS-отрицательных Т-клеток являлась сравнимой с Т-клетками дикого типа. Даже после инкубации с опухолевыми клетками Nalm6 в течение короткого периода времени 4 часов экспрессия CD107a значительно повышалась в FAS-отрицательных CAR19 Т-клетках по сравнению с аналогом дикого

типа.

Фигура 34А представляет собой график, демонстрирующий, что абляция FAS в CAR19 Т-клетках повышала выживаемость и пролиферацию CART-клеток в антигенных условиях *in vitro*. FAS-отрицательные CAR19 Т-клетки размножались быстрее, чем Т-клетки дикого типа CAR19, когда клетки стимулировали высокими уровнями клеток CD19+ K562.

Фигура 34В представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что FAS-отрицательные CAR19 Т-клетки характеризовались пониженными уровнями апоптоза, как измеряют окрашиванием аннексином V.

Фигура 35А представляет собой график, демонстрирующий, что абляция FAS в CAR19 Т-клетках повышала функцию CART-клеток на модели на животных. Как наблюдали *in vitro*, FAS-отрицательные Т-клетки характеризовались повышенной пролиферацией по сравнению с Т-клетками дикого типа.

Фигура 35В представляет собой панель изображений, демонстрирующих, что группа FAS-отрицательных CAR19 обладала лучшей противоопухолевой активностью по сравнению с группой дикого типа.

Фигура 35С представляет собой график, демонстрирующий значимые отличия данных биолюминесценции в группе FAS-отрицательных CAR19 и группе дикого типа.

Фигура 36 представляет собой панель графиков, демонстрирующих получение PD1-отрицательных PSCA-CAR Т-клеток. Абляцию PD1 подтверждали анализом проточной цитометрии. PD1-отрицательные клетки обогащали посредством истощения микрогранул. Т-клетки дикого типа или PD1-отрицательные PSCA-CAR Т-клетки размножали путем стимуляции облученными опухолевыми клетками PC3, презентующими антиген PSCA. PSCA-CAR-положительные клетки обогащали после экспрессии.

Фигура 37 представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что абляция PD1 и экспрессия CD137 в PSCA-CAR Т-клетках повышала активацию CART клеток в антигенных условиях *in vitro*.

Фигура 38А представляет собой панель изображений,

демонстрирующих абляцию PD1 на модели NSG PC3-PSCA-PDL1 *in vivo*. Для PSCA-CAR T-клеток демонстрировали повышенную противоопухолевую активность CART-клеток *in vivo* по сравнению с группой дикого типа.

Фигура 38B представляет собой график, демонстрирующий различие опухолевой нагрузки в PD1-отрицательной группе и группе дикого типа.

Фигура 39 представляет собой панель гистологических изображений, демонстрирующих, что T-клетки с абляцией TCR или TCR/HLA-I не вызывают заболевание "трансплантат против хозяина" (GVHD). У мышей, которых обрабатывали CART-клетками с двойным или тройным нокаутом, не развивались какие-либо признаки GVHD. В отличие от этого у 3 из 4 мышей из группы CD19 CART дикого типа развивалась GVHD на сутки 65, которую подтверждали гистологическим анализом различных органов.

Фигура 40A представляет собой график, демонстрирующий процент выживаемости животных, которым инъецировали T-клетки, в которых проводили абляцию TCR или TCR/HLA-I. Мышей подвергали облучению в сублетальных дозах и инъецировали. Четыре из 5 мышей, получавших T-клетки дикого типа, погибали от GVHD в течение 60 суток исследования. В группах, которых обрабатывали PBS, обрабатывали T-клетками с абляцией одного TCR и двойной абляцией TCR/HLA-I, не выявляли каких-либо признаков GVHD.

Фигура 40B представляет собой панель графиков, демонстрирующих массу тела мышей, получавших T-клетки дикого типа, обрабатываемых PBS, T-клетками с абляцией TCR или двойной абляцией TCR/HLA-I.

Фигура 41A представляет собой панель изображений, демонстрирующих улучшенную противоопухолевую активность универсальных CART-клеток после блокирования путей PD1 и Fas CRISPR/Cas9. Лучшую противоопухолевую активность детектировали в универсальных CD19-CART-клетках с нокаутом по PD1, когда их инъецировали мышам, несущим Nalm6-PDL1.

Фигура 41B представляет собой график, демонстрирующий количественные данные биолуминесценции мышей, получавших различные T-клетки, редактируемые CRISPR/Cas9.

Фигура 42 представляет собой панель иллюстраций, демонстрирующих система одноразового действия для получения универсальных CART-клеток. Вследствие того, что гРНК подвержены деградации, был разработан упрощенный способ одноразового действия конститутивной экспрессии гРНК совместно с CAR в одном лентивирусном векторе.

Фигура 43 представляет собой панель графиков, демонстрирующих эффективную абляцию гена системой одноразового действия. После электропереноса иРНК Cas9 наблюдали различные величины абляции CD3.

Фигура 44A представляет собой панель изображений, демонстрирующих морфологические изменения во время процесса перепрограммирования iPSC из Т-клетки с нокаутом Fas. Образование характерной морфологии эмбриональных стволовых клеток, свидетельствующее о том, что можно индуцировать плюрипотентное состояние в FAS-отрицательных Т-клетках.

Фигура 44B представляет собой график, демонстрирующий FAS-отрицательные Т-клетки, перепрограммируемые в iPSC с эффективностью приблизительно в 5 раз большей по сравнению с аналогами дикого типа. Сообщали, что линии клеток с недостаточностью p53 легче перепрограммировать вследствие препятствия пути апоптоза. Нокаут по FAS может облегчать процесс перепрограммирования в результате использования аналогичного механизма.

Фигура 45A представляет собой панель изображений, демонстрирующих ES-подобную морфологию iPSC из CD3-отрицательных Т-клеток с нокаутом по альфа- или бета-цепи TCR в различных условиях перепрограммирования. Морфология оставалась постоянной после нескольких пассажей.

Фигура 45B представляет собой график, демонстрирующий, что перепрограммирование CD3-отрицательных Т-клеток являлось приблизительно в 5 раз менее эффективным по сравнению с аналогами дикого типа, что подтверждает, что нокаут по TCR может играть роль в процессе перепрограммирования Т-клеток или оказывать влияние на жизнеспособность клеток после инфицирования вирусом Сендай.

Фигура 45С представляет собой панель изображений, демонстрирующих окрашивание фосфатазой CD3-отрицательных клеток iPSC.

Фигура 46 представляет собой панель графиков, демонстрирующих индукцию эндогенных генов плюрипотентных стволовых клеток в различных линиях T-iPSC клеток.

Фигура 47А представляет собой панель изображений, демонстрирующих иммуноокрашивание на экспрессию Tra-1-60 и SSEA4.

Фигура 47В представляет собой изображение, демонстрирующее подтверждение нокаута по Fas T-iPSC секвенированием по Сенгеру.

Фигура 48А представляет собой панель графиков, демонстрирующих абляцию гена в наивных Т-клетках с отличным вариантом Cas9. Нокаут по CD3 проводили с использованием dCas9 и FokI-Cas9.

Фигура 48В представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что для двух гРНК необходимой являлась абляция генов dCas9 и FokI-Cas9.

Фигура 48С представляет собой изображение, демонстрирующее редкие побочные явления в Т-клетках с модифицированными генами с использованием CRISPR/cas9.

Фигура 49 представляет собой панель изображений, демонстрирующих стратегию введения CRISPR/Cas9 в Т-клетки. Слева приведено схематическое представление гРНК под контролем промотора T7. Справа приведено схематическое представление получения антигенспецифических Т-клеток с редактированными генами с использованием системы CRISPR. Т-клетки электропорировали иРНК Cas9 и гРНК, направленно воздействующими на конкретный ген, через 3 суток после стимуляции гранулами CD3/CD28, а затем перед возвращением в нормальные условия культивирования 37°C культивировали в течение 24 часов при 32°C в присутствии IL2. Т-клетки с разрушенным конкретным геном сортировали на сутки 8 и перенаправляли с использованием CAR или TCR посредством переноса генов лентивирусной трансдукцией или иРНК электропорацией.

Фигура 50А представляет собой панель графиков, демонстрирующих опосредованное CRISPR/Cas9 эффективное разрушение TCR в Т-клетках. Экспрессия CD3 редактируемых CRISPR/Cas9 Т-клеток, культивируемых при 37°C или 32°C.

Фигура 50В представляет собой панель графиков, демонстрирующих экспрессию CD3 редактируемых CRISPR/Cas9 Т-клеток, культивируемых после последовательной электропорации РНК CRISPR.

Фигура 51А представляет собой панель графиков, демонстрирующих эффективное разрушение гена CRISPR, которое происходило в Т-клетках. Экспрессия CD3 Т-клеток, трансфицированных CRISPR с использованием различных соотношений Cas9:гРНК (верхняя и средняя панель) и количества общей РНК CRISPR (нижняя панель).

Фигура 51В представляет собой таблицу, демонстрирующую целевую эффективность, рассчитываемую проточной цитометрией и клональным секвенированием.

Фигура 52 представляет собой изображение, демонстрирующее величину разрушения гена, на который направленно воздействует TCR, как измеряют нуклеазным тестом селективного несоответствия T7 на ДНК, амплифицированной из клеток. Рассчитанная величина разрушения целевого гена в TRAC и TRBC представлена ниже. Стрелки указывают на ожидаемые полосы.

Фигура 53А представляет собой изображение инсерционно-делеционных мутаций (в разрушении гена), наблюдаемых посредством анализа клональной последовательности ампликонов ПЦР после опосредуемой CRISPR рекомбинации α - и β -локусов TCR.

Фигура 53В представляет собой изображение диаграммы принадлежащего человеку локуса, кодирующего гРНК α и β CRISPR TCR, направленно воздействующую на участки в геномном локусе константной области α - и β -цепей TCR. Каждый экзон показан блоком. Стрелка: смысловая цепь гРНК, направленно воздействующая на участок; синяя стрелка: антисмысловая цепь гРНК, направленно воздействующая на участок. Множественные пики в результатах секвенирования по Сенгеру указывают на опосредованные CRISPR

события NHEJ в геномных локусах TRAC и TRBC.

Фигура 54 представляет собой панель графиков, демонстрирующих экспрессию CD3 в очищенных TCR^{neg} клетках.

Фигура 55 представляет собой панель графиков, демонстрирующих перенаправление TCR/CD3^{neg} клеток посредством электропереносов TCR 1G4 (α и β) или иРНК CAR19.

Фигура 56 представляет собой график, демонстрирующий размножение TCR/CD3^{neg} клеток через 10 суток с использованием различных условий стимуляции.

Фигура 57 представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что редактирование CRISPR/Cas9 не нарушает противоопухолевую эффективность первичных Т-клеток. Продемонстрированы фенотипы клеток TCR/CD3^{neg} после четырех различных способов размножения.

Фигура 58 представляет собой панель графиков, демонстрирующих относительную экспрессию CD19-CAR после электропереноса РНК CD19-CAR в клетки Cas9 МОСК и TCR/CD3^{neg} клетки.

Фигура 59А представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что не наблюдали значимого функционального различия между перенаправленными CD19-CAR клетками Cas9 МОСК и TCR/CD3^{neg} клетками, как подтверждают анализом высвобождения CD107 после инкубации с клетками-мишенями Nalm6. Приведены репрезентативные данные из 3 независимых экспериментов. Столбцы, среднеквадратическая ошибка.

Фигура 59В представляет собой график, демонстрирующий, что не наблюдали значимого функционального различия между перенаправленными CD19-CAR клетками Cas9 МОСК и TCR/CD3^{neg} клетками, как подтверждают анализом цитотоксичности после инкубации с клетками-мишенями Nalm6. Приведены репрезентативные данные 3 независимых экспериментов. Столбцы, SE=среднеквадратическая ошибка.

Фигура 59С представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что не наблюдали значимого функционального различия между перенаправленными клетками CD19-CAR Cas9 МОСК и

TCR/CD3^{neg} клетками, как подтверждают секрецией IL2 и IFN γ после инкубации с клетками-мишенями Nalm6. Приведены репрезентативные данные 3 независимых экспериментов. Столбцы, SE=среднеквадратическая ошибка.

Фигура 59D представляет собой панель изображений мышей NOD/scid/ γ c(-/-) (n=12), которым инъецировали 1×10^6 опухолевых клеток Nalm6 (в/в), мышей случайным образом распределяли на три группы. Т-клетки Cas9 МОСК и TCR/CD3^{neg} Т-клетки (10×10^6), экспрессирующие CD19-CAR после электропорации, инъецировали в/в каждые 4 сутки в целом объеме трех инъекций (стрелки). Мыши, которых обрабатывали Т-клетками, электропорированными без РНК, служили в качестве контролей. Получали изображения выживших животных, как указано. Получение изображений начинали на 1 сутки до начала обработки Т-клетками. Столбцы, SE=среднеквадратическая ошибка, EP=электропорация; Е:Т=отношение эффектора к опухоли; стрелка, момент времени инфузии Т-клеток; нз - нет значимого отличия. **** $P < 0,0001$, нз по двухфакторному дисперсионному анализу ANOVA плюс апостериорный критерий Бонферрони.

Фигура 59Е представляет собой график, демонстрирующий светимость флуоресцентных клеток.

Фигура 60 представляет собой панель графиков, демонстрирующих двойную и тройную абляцию гена посредством CRISPR/Cas9 с получением универсальных эффекторных клеток. Разрушение HLA-I гРНК, направленно воздействующей на B2М.

Фигура 61 представляет собой блок-схему протокола получения универсальных эффекторных клеток, как описано в настоящем описании.

Фигура 62 представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что абляция TCR подавляла неспецифическую цитолитическую активность. Линии опухолевых клеток 624mel-CBG и PC3-CBG инкубировали с Т-клетками, предварительно обрабатываемыми РНА или не обрабатываемыми РНА, при отношении эффектор к мишени 20:1 в течение 24 часов и рассчитывали цитотоксичность на основании анализа люциферазы. Данные представляют собой среднее значение $\pm$ SD; n=3.

Фигура 63 представляет собой панель графиков, демонстрирующих анализ Elispot IFN γ для измерения аллореактивности разрушения TCR и TCR/HLA стимуляцией Т-клетками, в которых проводили абляцию гена, с облученными аллогенными РВМС (левая панель) или культивированием совместно с аллогенными РВМС с облученными Т-клетками, в которых проводили абляцию гена. Специфические пятна показаны на оси у, как пятна, образованные в присутствии стимуляторов минус пятна, образованные только эффектором. **P<0,01 по критерию Манна-Уитни.

Фигура 64 представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что разрушение эндогенного TCR CRISPR/Cas9 улучшало перенаправленную TCR функцию Т-клеток. Экспрессия Vb13.1 и CD3 представлена в Т-клетках, трансфицированных одной иРНК Cas9 (Cas9 Mock), или в CD3^{neg} Т-клетках с разрушенным эндогенным TCR только α (α KO), только β (β KO), двойного α и β ($\alpha+\beta$ KO), которые электропорировали РНК α (1G4 α , 2 мкг), β (1G4 β , 2 мкг) или РНК $\alpha+\beta$ (1G4 $\alpha+\beta$, 2+2 мкг) NY-ESO-1 TCR.

Фигура 65А представляет собой панель графиков, демонстрирующих усиление экспрессии CD107a Т-клетками, электропорированными РНК TCR (1G4) α/β , с одним нокаутом TCR α или β или двойным нокаутом TCR $\alpha+\beta$, стимулированных HLA-A2/NY-ESO-1-положительной линией клеток (Nalm6-ESO) или контрольной линией клеток Nalm6.

Фигура 65В представляет собой графики, демонстрирующие литическую способность по отношению к Nalm6-ESO электропорированных РНК TCR $\alpha+\beta$ (1G4 TCR) Т-клеток с одним нокаутом TCR α или β или двойным нокаутом $\alpha+\beta$, продемонстрированных на (а) в анализе CTL на основе люциферазы.

Фигура 66 представляет собой панель графиков, демонстрирующих экспрессия Vbeta и CD3 в Т-клетках с разрушенным двойным TCR $\alpha+\beta$ (TCR^{neg} Т-клетки), электропорированных двумя различными РНК TCR NY-ESO-1 (1G4 TCR, 10 мкг или 8F TCR, 10 мкг) по сравнению с контрольными Т-клетками Cas9 Mock.

Фигура 67А представляет собой панель графиков, демонстрирующих усиление экспрессии CD107a в CD8⁺ Т-клетках, электропорированных РНК TCR NY-ESO-1 (1G4 TCR или 8F TCR), с двойным нокаутом TCR, стимулированных HLA-A2/NY-ESO-1-положительными линиями клеток Nalm6-ESO, 624-mel или U266. В качестве отрицательного контроля использовали Nalm6.

Фигура 67В представляет собой панель графиков, демонстрирующих продукцию цитокинов (IL-2 и TNF- α) электропорированных РНК TCR NY-ESO-1 (1G4 TCR или 8F TCR) Т-клеток с двойным нокаутом TCR после стимуляции HLA-A2/NY-ESO-1-положительными линиями клеток Nalm6-ESO или U266; в качестве отрицательного контроля использовали клетки меланомы 888mel. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ **** $P < 0,0001$, двухфакторным дисперсионным анализом плюс апостериорный критерий Бонферрони.

Фигура 68 представляет собой панель изображений, демонстрирующих получение универсальных CART-клеток с сочетанием переноса лентивирусом генов и электропорации CRISPR/Cas9. Приведена блок-схема получения универсальных CD19-CART клеток. Т-клетки трансдуцировали лентивирусным CD19-CAR на сутки 1 после стимуляции и электропорировали иРНК Cas9 и гРНК, направленно воздействующие на α -цепи TCR и β -цепи TCR и B2M в Т-клетках через 2 суток. Перед повторной стимуляцией для размножения двойную отрицательную по TCR и HLA-I популяцию клеток обогащали.

Фигура 69 представляет собой панель графиков, демонстрирующих экспрессию CD19-CAR в Т-клетках lenti-CD19-CAR с модифицированным геном, размножаемых путем стимуляции гранулами CD3/CD28 после электропорации TCR 1G4.

Фигура 70 представляет собой панель графиков, демонстрирующих фенотип CD19-CAR Т-клеток.

Фигура 71 представляет собой график, демонстрирующий высвобождение CD107a в TCR-отрицательных и двойных отрицательных по TCR/HLA-I CD19-CAR Т-клетках. Приведены репрезентативные данные 3 независимых экспериментов. Столбцы, SE=среднеквадратическая ошибка.

Фигура 72 представляет собой панель графиков,

демонстрирующих секрецию цитокинов TCR-отрицательных и двойных отрицательных по TCR/HLA-I CD19-CAR T-клеток. Приведены репрезентативные данные 3 независимых экспериментов. Столбцы, SE=среднеквадратическая ошибка.

Фигура 73 представляет собой график, демонстрирующий литическую способность по отношению к опухоли TCR-отрицательный и двойных отрицательных по TCR/HLA-I CD19-CAR T-клеток. Приведены репрезентативные данные 3 независимых экспериментов. Столбцы, SE=среднеквадратическая ошибка.

Фигура 74 панель графиков, демонстрирующих меченные CFSE CD19-CAR и нетрансдуцированные T-клетки, инкубированные с K562 и опухолевыми клетками-мишенями K562-CD19 в отношении от 1 до 10 в течение 72 часов.

Фигура 75A представляет собой график, демонстрирующий BLI от мышей, которых обрабатывали однократной инъекцией на сутки 7, экспрессирующим CD19-CAR и GFP с использованием лентивирусного вектора; нз, нет значимого отличия по двухфакторному дисперсионному анализу плюс апостериорный критерий Бонферрони. Опухоли устанавливали у мышей NSG (n=4 в группе) посредством в/в инъекции 1×10^6 клеток Nalm6. Начиная на сутки 7, T-клетки (1×10^7), экспрессирующие трансдуцированный с использованием лентивируса (LV) CD19-CAR, вводили инфузией однократной инъекцией. В качестве контролей инъецировали T-клетки, экспрессирующие белок GFP LV.

Фигура 75B представляет собой график, демонстрирующий the общая выживаемость мышей, получавших T-клетки LV-GFP, LV-CD19-CAR, LV-CD19-CAR-TCR/CD3^{neg} и LV-CD19-CAR-TCR/HLA-I^{neg}. нз, нет значимого отличия по лонгранговому критерию Кокса-Мантеля.

Фигура 76 представляет собой панель изображений, демонстрирующих, что CAR T-клетки с модифицированным геном сохраняли противоопухолевую эффективность и не индуцировали GVHD. Опухоли устанавливали у мышей NSG (n=4 в группе) посредством в/в инъекции 1×10^6 клеток Nalm6. Начиная на сутки 7, T-клетки (2×10^7), экспрессирующие LV-CD19-CAR, вводили инфузией однократной инъекцией. В качестве контролей инъецировали T-

клетки, экспрессирующие белок GFP LV. Визуализацию начинали за 1 сутки до обработки Т-клетками. На сутки 65 собирали органы от выбираемых случайным образом мышей из различных групп обработки и использовали для иммуногистохимического окрашивания на CD3. Фигура 77 представляет собой серию схематических изображений векторов, демонстрирующих конструкцию pAd5F35-CRISPR, направленно воздействующего на PD1, Fas и альфа-цепь TCR.

Фигура 78 представляет собой иллюстрацию, демонстрирующую конструкцию модифицированной пентоном pAd5F35-CRISPR с ScFv антитела против CD3 и схематическую доставку pAd5F35-CRISPR для нокина/нокаута химерного антигенного рецептора в Т-клетках *in vitro* и *in vivo*.

Фигура 79А представляет собой график, демонстрирующий секвенирование по Сенгеру продуктов ПЦР, фланкирующих PD1-гРНК, направленную на участок. Аденовирусный-pAd5F35-CRISPR-PD1 вирус трансдуцировали в клетки MD231. Через 3 суток геномную ДНК экстрагировали и проводили ПЦР.

На фигуре 79В продемонстрированы последовательности целевых событий в клетках MDA231 после манипуляции аденовирус-CRISPR. Продукты ПЦР PD1 клонировали в вектор ТОРО и секвенировали.

Фигура 80 представляет собой таблицу, демонстрирующую, что уменьшение использования гРНК улучшало кратность размножения Т-клеток и только незначительно снижало эффективность нокаута.

Фигура 81 представляет собой таблицу, демонстрирующую параметры, используемые для оптимизации условий электропорация для получения высокой эффективности нокаута CD3/B2M с улучшенной кратностью размножения Т-клеток. По сравнению со стандартными условиями электропорации (ЕР) в 2 мм кювете (ЕР №10-13) или 4 мм кювете. Наблюдали высокую эффективность нокаута CD3/B2M с улучшенной кратностью размножения Т-клеток (ЕР №1 и 5).

Фигура 82 представляет собой таблицу, демонстрирующую оптимизацию условий ЕР для получения максимальной кратности размножения с приемлемой эффективностью нокаута.

Фигура 83 представляет собой таблицу, демонстрирующую дополнительную оптимизацию условий ЕР для получения максимальной кратности размножения с приемлемой эффективностью нокаута.

На фигуре 84 схематически представлена процедура стимуляции Т-клеток, трансдукции лентивирусом и электропорации CRISPR.

Фигура 85 представляет собой таблицу, демонстрирующую число Т-клеток (верхняя таблица) и кратность размножения (нижняя таблица) после процедуры электропорации и культивирования.

Фигура 86 представляет собой панель графиков, демонстрирующих среднее размножение Т-клеток. Кратность размножения Т-клеток, трансдуцированных только CD19 CAR (только TD) или трансдуцированных CD19 CAR и редактируемых CRISPR (TD/KO) (левый график). Кратность размножения Т-клеток на сутки 10 представлена на правом графике.

Фигура 87 представляет собой панель графиков данных проточной цитометрии, демонстрирующих экспрессию CD3/B2M/CAR на сутки 8 размноженных Т-клеток.

Фигура 88 представляет собой панель графиков, демонстрирующих экспрессию CD3/B2M после истощения CD3+ Т-клеток.

Фигура 89 представляет собой панель графиков, демонстрирующих экспрессию CD3/B2M на сутки 11 в CD19 CAR TD (трансдуцированных)/электропорированных CRISPR, истощенных по CD3 Т-клетках; CD19 CAR TD/электропорированных CRISPR Т-клетках; и CD19 CAR TD Т-клетках. В качестве отрицательного контроля использовали нетрансдуцированные ND463 (NOTD). Фигура 90 представляет собой панель графиков, демонстрирующих экспрессию CD19 CAR на сутки 11 в CD19 CAR TD (трансдуцированных)/электропорированных CRISPR, истощенных по CD3 Т-клетках; CD19 CAR TD/электропорированных CRISPR Т-клетках и CD19 CAR TD Т-клетках. В качестве отрицательного контроля использовали трансдуцированные ND463 (NOTD).

Фигура 91 представляет собой панель графиков, демонстрирующих экспрессию CD3/B2M/CAR на сутки 11 в CD19 CAR TD (трансдуцированных)/электропорированных CRISPR, истощенных по CD3 Т-клетках; CD19 CAR TD/электропорированных CRISPR Т-клетках и CD19 CAR TD Т-клетках. В качестве отрицательного контроля использовали нетрансдуцированные ND463 (NOTD).

Фигура 92 представляет собой таблицу, в которой обобщают

экспрессию CD3/B2M/CAR в CD19 CAR TD (трансдуцированных)/электропорированных CRISPR, истощенных по CD3 T-клетках; CD19 CAR TD/электропорированных CRISPR T-клетках и CD19 CAR TD T-клетках.

Фигура 93 представляет собой панель графиков, демонстрирующих усиление экспрессии CD107a в CD19 CAR TD (трансдуцированных)/электропорированных CRISPR, истощенных по CD3 T-клетках; CD19 CAR TD/электропорированных CRISPR T-клетках и CD19 CAR TD T-клетках.

Фигура 94 представляет собой панель графиков, демонстрирующих литическую активность T-клеток на сутки 11.

Фигура 95 представляет собой панель графиков, демонстрирующих продукцию цитокинов T-клеток на сутки 11.

Фигура 96 представляет собой панель графиков, демонстрирующих размножение T-клеток. Не наблюдали аномальный рост T-клеток.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Определения

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, как общепринято понимает специалист в данной области, к которой принадлежит изобретение. Хотя в практическом осуществлении для тестирования настоящего изобретения можно использовать любые способы и вещества, аналогичные или эквивалентные тем, которые описывают в настоящем описании, предпочтительные вещества и способы описаны в настоящем описании. При описании и заявлении настоящего изобретения используют следующую ниже терминологию.

Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем описании, предназначена только описывать конкретные варианты осуществления и не является ограничивающей.

Формы единственного числа применяют в настоящем описании для обозначения одного или более чем одного (например, по меньшей мере одного) грамматической конструкции в форме единственного числа. В качестве примера, "элемент" означает один элемент или более одного элемента.

Как используют в настоящем описании "приблизительно", когда

относится к измеряемой величине, такой как количество, продолжительность времени и т.п., предназначено включать изменения $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, даже более предпочтительно $\pm 1\%$ и еще более предпочтительно $\pm 0,1\%$ от указанной величины, т.к. такие изменения являются подходящими для проведения описываемых способов.

Как используют в настоящем описании, "активация" относится к состоянию Т-клетки, которую в достаточной степени стимулировали для индукции детектируемой пролиферации клеток. Активация также может быть связана с индуцируемой продукцией цитокинов и детектируемыми эффекторными функциями. Термин "активированные Т-клетки", в частности, относится к Т-клетками, которые претерпевают клеточное деление.

Как используют в настоящем описании, термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины, получаемые из природных источников или из рекомбинантных источников, и могут представлять собой иммунореактивные части интактных иммуноглобулинов. Как правило, антитела представляют собой тетрамеры молекул иммуноглобулина. Антитела в настоящем изобретении могут существовать в различных формах, включая, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, Fv, Fab и F(ab)₂, а также одноцепочечные антитела (scFv) и гуманизированные антитела (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, в Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

Термин "фрагмент антитела" относится к участку интактного антитела и относится к переменным областям интактного антитела, определяющим связывание с антигеном. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, линейные антитела, антитела на основе scFv и полиспецифические антитела, образуемые из фрагментов

антител.

Как используют в настоящем описании, "тяжелая цепь антитела" относится к большей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих во всех молекулах антител в их природных конформациях.

Как используют в настоящем описании, "легкая цепь антитела" относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих во всех молекулах антител в их природных конформациях. Легкие α - и β -цепи относятся к двум основным изотипам легкой цепи антитела.

Как используют в настоящем описании, под термином "синтетическое антитело" подразумевают антитело, которое получают с использованием технологии рекомбинантных ДНК, такое как, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом, как описано в настоящем описании. Термин следует также истолковывать как означающий антитело, которое получали синтезом молекулы ДНК, кодирующей антитело, и где молекула ДНК экспрессирует белок антитела, или аминокислотную последовательность, определяющую антитело, где ДНК или аминокислотную последовательность получали с использованием технологии синтетической ДНК или аминокислотной последовательности, которая является доступной и хорошо известной в данной области.

Как используют в настоящем описании, термин "антиген" или "Ag" определяют как молекулу, которая вызывает иммунный ответ. Такой иммунный ответ может включать образование антител или активацию специфических иммунокомпетентных клеток, или то и то и другое. Специалисту в данной области будет понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Кроме того, антигены можно получать из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области будет понятно, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидные последовательности или неполную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, таким образом, кодирует "антиген", как этот термин используют в настоящем описании. Кроме того, специалисту в данной области

будет понятно, что такой антиген не обязательно кодируется только полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Легко понять, что настоящее изобретение относится, но не ограничивается этим, к использованию неполных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена, и что эти нуклеотидные последовательности располагают в различных комбинациях, чтобы вызывать желаемый иммунный ответ. Кроме того, специалисту в данной области будет понятно, что антиген необязательно кодируется "геном" полностью. Легко понять, что антиген можно получать синтезом или можно выделять биологического образца. Такой биологический образец может включать, но не ограничиваться ими, образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость.

Как используют в настоящем описании, термин "противоопухолевый эффект" относится к биологическому действию, которое может проявляться как уменьшение объема опухоли, уменьшение числа опухолевых клеток, уменьшение числа метастазов, увеличение продолжительности жизни или улучшение состояния различных физиологических симптомов, связанных с раковым состоянием. "Противоопухолевый эффект" также может проявляться в способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител по изобретению предотвращать возникновение опухоли в первом месте.

Термин "аутоантиген" в соответствии с настоящим изобретением означает любой аутоантиген, который распознается иммунной системой как чужеродный. Аутоантигены включают, но не ограничиваются ими, клеточные белки, фосфопротеины, белки клеточной поверхности, клеточные липиды, нуклеиновые кислоты, гликопротеины, включая рецепторы клеточной поверхности.

Как используют в настоящем описании, термин "аутоиммунное заболевание" определяют как нарушение, которое является результатом аутоиммунного ответа. Аутоиммунное заболевание является результатом неадекватного и избыточного ответа на аутоантиген. Примеры аутоиммунных заболеваний включают наряду с другими, но не ограничиваются ими, болезнь Аддисона, очаговую алопецию, анкилозирующий спондилит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный паротит, болезнь Крона, диабет (I типа),

дистрофический буллезный эпидермолиз, эпидидимит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, Синдром Гийена-Барре, болезнь Хасимото, гемолитическую анемию, системную красную волчанку, рассеянный склероз, тяжелую миастению, обыкновенную пузырчатку, псориаз, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, спондилоартропатии, тиреоидит, васкулит, витилиго, микседему, пернициозную анемию, язвенный колит.

Как используют в настоящем описании, термин "аутологичный" предназначен для обозначения любого вещества, получаемого от того же индивидуума, которое в дальнейшем повторно вводят индивидууму.

"Аллогенный" относится к трансплантату, получаемому от другого животного того же вида.

"Ксеногенный" относится к трансплантату, получаемому от животного другого вида.

Как используют в настоящем описании, термин "злокачественная опухоль" определяют как заболевание, характеризующееся быстрым и неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Злокачественные клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в других части организма. Примеры различных злокачественных опухолей включают, но не ограничиваются ими, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, злокачественную опухоль почки, рак печени, злокачественную опухоль головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легких и т.п. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой медуллярную карциному щитовидной железы.

Как используют в настоящем описании, термин "химерный антигенный рецептор" или "CAR" относится к искусственному Т-клеточному рецептору, который конструируют так, чтобы он экспрессировался на эффекторной клетке иммунной системы и специфически связывался с антигеном. CAR можно использовать в качестве терапии с адоптивным переносом клеток. Т-клетки извлекают у пациента и модифицировали так, чтобы они

экспрессировали рецепторы, специфические к конкретной форме антигена. В определенных вариантах осуществления CAR экспрессировали, например, со специфичностью к опухолеассоциированному антигену. CAR также могут содержать внутриклеточный активирующий домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен, содержащий опухолеспецифическую антигенсвязывающую область. В определенных аспектах CAR содержат слияния одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv), получаемых из моноклональных антител, слитых с трансмембранным и внутриклеточным доменом CD3-дзета. Специфичность конструкций CAR можно получать на основании лигандов рецепторов (например, пептидов). В определенных вариантах осуществления CAR может направленно воздействовать на злокачественные опухоли, перенаправляя специфичность Т-клетки, экспрессирующей CAR, специфический к опухолеассоциированным антигенам.

Термин "расщепление" относится к разрыву ковалентных связей, таких как в остоле молекулы нуклеиновой кислоты. Расщепление можно инициировать различными способами, включая, но, не ограничиваясь ими, ферментативный или химический гидролиз фосфодиэфирной связи. Возможными являются одноцепочечное расщепление и двухцепочечное расщепление. Двухцепочечное расщепление может происходить в результате двух различных события одноцепочечного расщепления. Расщепление ДНК может приводить к образованию тупых концов или липких концов. В определенных вариантах осуществления слитые полипептиды можно использовать для направленного воздействия на расщепленную двухцепочечную ДНК.

Как используют в настоящем описании, термин "консервативные модификации последовательности" предназначен для обозначения модификации аминокислот, которые не оказывают значительного влияния или не изменяют характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают замены аминокислот, добавления и делеции. Модификации в антителе по изобретению можно проводить стандартными способами, известными в данной области, такими как сайт-специфический мутагенез и

опосредованный ПЦР мутагенез. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, в которых аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, содержащим такую же боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, содержащих аналогичные боковые цепи, которые были определены в данной области. Такие семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или более аминокислотных остатков в областях CDR антитела можно заменять другими аминокислотными остатками из того же семейства боковых цепей и измененное антитело можно тестировать на способность связывать антигены с использованием функциональных анализов, описываемых в настоящем описании.

"Костимулирующий лиганд", как термин используют в настоящем описании, включает молекулу на антигенпрезентирующей клетке (например, аАРС, дендритной клетке, В-клетке и т.п.), которая специфически связывается с когнатной костимулирующей молекулой на Т-клетке, таким образом, обеспечивая сигнал, который в дополнение к первичному сигналу, обеспечиваемому, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, нагруженной пептидом, опосредует Т-клеточный ответ, включая, но, не ограничиваясь ими, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. Костимулирующий лиганд может включать, но не ограничивается ими, CD7, В7-1 (CD80), В7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, индуцибельный костимулирующий лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, рецептор лимфотоксина-бета, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, агонист или антитело, которое связывается с Toll-подобным рецептором, и лиганд, который специфически связывается с В7-Н3.

Костимулирующий лиганд также включает, в числе прочего, антитело, которое специфически связывается с костимулирующей молекулой, присутствующей на Т-клетке, такой как, но, не ограничиваясь ими, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, функционально-связанный антиген лимфоцитов-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, и лиганд, который специфически связывается с CD83.

"Костимулирующая молекула" относится к когнатному партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, таким образом опосредуя костимулирующий ответ посредством Т-клетки, такой как, но, не ограничиваясь им, пролиферация. Костимулирующие молекулы включают, но не ограничиваются ими, молекулу МНС I класса, BTLA и Toll-подобный рецептор.

Как используют в настоящем описании, "костимулирующий сигнал" относится к сигналу, который в сочетании с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к пролиферации Т-клеток и/или к повышению экспрессии или снижению экспрессии ключевых молекул.

Термин "CRISPR/CAS", "сгруппированные регулярно разделенные промежутками короткие палиндромные повторы и ассоциированная с ними система" или "CRISPR" относится к локусам ДНК, содержащим короткие повторы основных последовательностей. За каждым повтором следуют короткие сегменты спейсерной ДНК из ранее воздействовавшего вируса. Бактерии и археи развили адаптивную иммунную защиту, называемую ассоциированные с CRISPR-CRISPR (Cas) системы, в которых короткая РНК используется для прямого разрушения чужеродных нуклеиновых кислот. У бактерий CRISPR-система обеспечивает приобретенный иммунитет против инвазивной чужеродной ДНК через направляемое РНК расщепление ДНК.

В системе CRISPR/Cas II типа короткие сегменты чужеродной ДНК, называемые "спейсерами", являются интегрированными в геномные локусы CRISPR и транскрибируются и процессируются в короткие РНК CRISPR (crРНК). Эти crРНК соединяются с комплементарными транс-активирующими crРНК (tracrРНК) и направляют специфическое к последовательности расщепление и

сайленсинг патогенной ДНК белками Cas. В недавней работе было показано, что для распознавания мишени белком Cas9 необходимой является "затравочная" последовательность в crРНК и содержащий последовательность прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), состоящего из консервативного динуклеотида, выше связывающей области crРНК.

Для направления Cas9 для расщепления представляющих интерес последовательностей можно конструировать слитые транскрипты crРНК-tracrРНК, ниже в настоящем описании обозначаемые как "гидовая РНК" или "гРНК", из промотора полимераза III U6 человека. Опосредованное CRISPR/CAS редактирование и регуляция генома привлекли внимание к ее трансформационному потенциалу для фундаментальной науки, клеточной инженерии и терапевтических средств.

Термин "CRISPRi" относится к CRISPR-системе для подавления конкретных последовательностей гена или ингибирования экспрессии гена, такой как на уровне транскрипции.

"Заболевание" представляет собой состояние здоровья животного, при котором животное не может поддерживать гомеостаз, и при котором, если состояние заболевания не улучшается, то здоровье животного продолжает ухудшаться. В противоположность этому, "нарушение" у животного представляет собой состояние здоровья, при котором животное способно поддерживать гомеостаз, но при котором состояние здоровья животного является менее благоприятным, чем оно было бы при отсутствии нарушения. В случае отсутствия лечения нарушение необязательно вызывает дальнейшее ухудшение состояния здоровья животного.

Как используют в настоящем описании термин "снижение экспрессии" относится к понижению или устранению экспрессии одного или более генов.

"Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" в настоящем описании используют взаимозаменяемо, и оно относится к количеству соединения, состава, вещества или композиции, как описано в настоящем описании, эффективному для получения конкретного биологического результата или обеспечивает терапевтическую или профилактическую пользу. Такие результаты

могут включать, но не ограничиваются ими, противоопухолевую активность, как определяют любыми способами, подходящими в данной области.

"Кодирование" относится к характерному свойству конкретных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или иРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, содержащем определенную последовательность нуклеотидов (например, гРНК, тРНК и иРНК) или определенную последовательность аминокислот и обладающем биологическими свойствами, вытекающими из этого. Таким образом, ген кодирует белок, если транскрипция и трансляция иРНК, соответствующей такому гену, приводит к образованию белка в клетке или другой биологической системе. Кодированная цепь, нуклеотидная последовательность которой является идентичной последовательности иРНК, и которая, как правило, приведена в списках последовательностей, и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут обозначаться как кодирующие белок или другой продукт такого гена или кДНК.

Как используют в настоящем описании "эндогенный" относится к любому веществу из организма, клетки, ткани или системы или продуцируемому в организме, клетке, ткани или системе.

Как используют в настоящем описании, термин "экзогенный" относится к любому веществу, вводимому из организма, клетки, ткани или системы или продуцируемому вне организма, клетки, ткани или системы.

Как используют в настоящем описании термин "размножать" относится к увеличению числа, как при увеличении числа Т-клеток. В одном из вариантов осуществления число Т-клеток, которые размножают *ex vivo*, увеличивается по сравнению с числом исходно присутствующих в культуре. В другом варианте осуществления число Т-клеток, которые размножают *ex vivo*, увеличивается по сравнению с другими типами клеток в культуре. Как используют в настоящем описании, термин "*ex vivo*" относится к клеткам, которые *that have been removed from жив организм*, (например, человек) и выращиваемым вне организма (например, в чашке для

культивирования, тестовой пробирке или биореакторе).

Как используют в настоящем описании, термин "экспрессия" определяют как транскрипцию и/или трансляцию конкретной нуклеотидной последовательности под контролем ее промотора.

"Экспрессирующий вектор" относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий регулирующие экспрессию последовательности, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, которая должна экспрессироваться. Экспрессирующий вектор содержит подходящие действующие в *цис*-положении элементы для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть доставлены клеткой-хозяином или в экспрессирующей системе *in vitro*. Экспрессирующие векторы включают все известные в данной области экспрессирующие векторы, такие как космиды, плазмиды (например, "голые" или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, вирусы Сендай, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые вводят рекомбинантный полинуклеотид.

Как используют в настоящем описании, "гомологичный" относится к идентичности последовательности субъединицы двух полимерных молекул, например, двух молекул нуклеиновой кислоты, таких как, две молекулы ДНК или две молекулы РНК, или двух полипептидных молекул. Когда положение субъединицы в двух молекулах занято одной и той же мономерной субъединицей; например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то они являются гомологичными в этом положении. Гомология двух последовательностей прямо зависит от числа совпадений или гомологичных положений; например, если половина (например, пять положений в полимере длиной десять субъединиц) положений в двух последовательностях является гомологичной, две последовательности являются на 50% гомологичными; если 90% положений (например, 9 из 10) совпадают или являются гомологичными, то две последовательности являются на 90% гомологичными.

"Гуманизированные" формы не принадлежащих человеку антител (например, мыши) представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab',

F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, получаемую из не принадлежащего человеку иммуноглобулина. Преимущественно гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в котором остатки из определяющей комплементарность области (CDR) реципиента заменяют остатками из CDR от не являющихся человеком видов (донорного антитела), таких как мышь, крыса или кролик, обладающих желаемой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях остатки Fv каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменяют соответствующими не принадлежащими человеку остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не встречаются ни в реципиентном антителе ни в импортируемых CDR или каркасных последовательностях. Такие модификации проводят для дополнительного улучшения и оптимизации характеристики антитела. В основном, гуманизированное антитело содержит по существу все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все области CDR соответствуют областям не принадлежащего человеку иммуноглобулина и все или по существу все области FR являются областями последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело оптимально также содержит по меньшей мере участок константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, участок константной области иммуноглобулина человека. Для более подробного описания см. Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.

"Полностью принадлежащий человеку" относится к иммуноглобулину, такому как антитело, где целая молекула принадлежит человеку или состоит из аминокислотной последовательности идентичной форме антитела человека.

Как используют в настоящем описании, "идентичность" относится к идентичности последовательности субъединицы двух полимерных молекул в частности двух молекул аминокислоты, такой как, идентичности двух полипептидных молекул. Когда две

аминокислотные последовательности содержат одинаковые остатки в тех же положениях; например, если положение в каждой из двух полипептидных молекул занято аргинином, тогда они являются идентичными в этом положении. Идентичность или степень, с которой две аминокислотные последовательности содержат одинаковые остатки в одних и тех же положениях при выравнивании, часто выражают как процентное содержание. Идентичность двух аминокислотных последовательностей непосредственно зависит от числа совпадений или идентичных положений; например, если половина (например, пять положений в полимере длиной десять аминокислот) положений в двух последовательностях является идентичной, две последовательности являются на 50% идентичными; если 90% положений (например, 9 из 10) совпадают или являются идентичными, две аминокислотные последовательности являются на 90% идентичными.

Как используют в настоящем описании, термин "иммуноглобулин" или "Ig" определяют как класс белков, которые функционируют как антитела. Антитела, экспрессируемые В-клетками, в некоторых случаях обозначают как BCR (В-клеточный рецептор) или антигенный рецептор. Пять представителей, входящих в этот класс белков, представляют собой IgA, IgG, IgM, IgD и IgE. IgA представляет собой первичное антитело, которое содержится в выделениях организма, таких как слюна, слезы, грудное молоко, желудочно-кишечные выделения и слизистые выделения дыхательных и моче-половых путей. IgG является наиболее распространенным циркулирующим антителом. IgM является основным иммуноглобулином, продуцируемым при первичном иммунном ответе у большинства индивидуумов. Он является самым эффективным иммуноглобулином при агглютинации, фиксации комплемента и других ответах антитела, и является важным в защите от бактерий и вирусов. IgD представляет собой иммуноглобулин, который не обладает известной функцией антитела, но может служить в качестве антигенного рецептора. IgE представляет собой иммуноглобулин, который опосредует гиперчувствительность немедленного типа, вызывая высвобождение медиаторов из тучных клеток и базофилов при воздействии аллергена.

Как используют в настоящем описании, термин "иммунный ответ" определяют как клеточный ответ на антиген, который возникает, когда лимфоциты идентифицируют антигенные молекулы как чужеродные и индуцируют образование антител и/или активированных лимфоцитов для удаления антигена.

Как используют в настоящем описании, "индуцированная плюрипотентная стволовая клетка" или "iPS-клетка" относится к плюрипотентной стволовой клетке, которую получают из взрослых клеток, таких как Т-клетки. Экспрессия факторов перепрограммирования, таких как Klf4, Oct3/4 и Sox2, во взрослых клетках преобразуют клетки в плюрипотентные клетки, способные размножаться и дифференцироваться во многие типы клеток.

Как используют в настоящем описании, "учебный материал" включает публикацию, запись, диаграмму или любую другую среду для выражения, которую можно использовать для сообщения о применимости композиций и способов по изобретению. Учебный материал набора по изобретению можно, например, прикреплять к контейнеру, в котором содержится нуклеиновая кислота, пептид и/или композиция по изобретению, или поставлять совместно с контейнером, в котором содержится нуклеиновая кислота, пептид и/или композиция. Альтернативно, учебный материал можно поставлять отдельно от контейнера с тем, чтобы реципиент использовал учебный материал и соединение совместно.

"Выделенный" означает измененный или удаленный из природного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественным образом содержащийся у живого животного, не является "выделенным", но та же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенный от сопутствующих веществ своего природного состояния, является "выделенным". Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в значительной степени очищенной форме или могут существовать в неприродном окружении, таком как, например, клетка-хозяин.

Как используют в настоящем описании, термин "нокдаун" относится к понижению экспрессии одного или более генов.

Как используют в настоящем описании, термин "нокаут" относится к устранению экспрессии одного или более генов.

Как используют в настоящем описании, "лентивирус" относится к роду семейства *Retroviridae*. Лентивирусы являются уникальными среди ретровирусов, что заключается в том, что они способны инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, таким образом, они представляют собой один из наиболее эффективных способов вектора для доставки генов. ВИЧ, SIV и FIV являются примерами лентивирусов. Векторы, получаемые из лентивирусов, обеспечивают средства для получения значительных уровней переноса генов *in vivo*.

Как используют в настоящем описании, под термином "модифицированный" подразумевают измененное состояние или структуру молекулы или клетки по изобретению. Молекулы можно модифицировать любым способом, включая химически, структурно и функционально. Клетки можно модифицировать введением нуклеиновых кислот.

Как используют в настоящем описании, под термином "модулирующий" подразумевают опосредование детектируемого повышения или понижения уровня ответа у индивидуума по сравнению с уровнем ответа у индивидуума при отсутствии лечения или соединения, и/или по сравнению с уровнем ответа у иным образом идентичного, но не получавшего лечения индивидуума. Термин включает отклонение и/или влияние на нативный сигнал или ответ, таким образом, опосредуя благоприятный терапевтический ответ у индивидуума, предпочтительно человека.

В контексте настоящего изобретения используют следующие ниже сокращенные обозначения для наиболее часто встречающихся оснований нуклеиновых кислот. "А" относится к аденозину, "С" относится к цитозину, "G" относится к гуанозину, "Т" относится к тимидину, и "U" относится к уридину.

Если не указано иное, "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность," включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными вариантами друг друга, и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза нуклеотидная последовательность, кодирующая белок или РНК, также может

включать интроны в тех случаях, когда такая нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторых вариантах содержать интрон(ы).

Термин "функционально связанный" относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, что приводит к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты является функционально связанной со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты находится в функциональной взаимосвязи со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Как правило, функционально связанные последовательности ДНК являются смежными и при необходимости соединяют две кодирующие области белка, в одной и той же рамке считывания.

Термин "сверхэкспрессированный" опухолевый антиген или "сверхэкспрессия" опухолевого антигена предназначен обозначать аномальный уровень экспрессии опухолевого антигена в клетке из области заболевания, такой как солидная опухоль, в конкретной ткани или органе пациента относительно уровня экспрессии в нормальной клетке из такой ткани или органа. Пациентов, страдающих солидными опухолями или гемобластозом, характеризующимся сверхэкспрессией опухолевого антигена можно определять посредством известных в данной области стандартных анализов.

"Парентеральное" введение иммуногенной композиции включает, например, подкожные (п/к), внутривенные (в/в), внутримышечные (в/м) или внутригрудные способы инъекции или инфузии.

Как используют в настоящем описании, термин "полинуклеотид" определяют как цепь нуклеотидов. Кроме того, нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры нуклеотидов. Таким образом, как используют в настоящем описании, нуклеиновые кислоты и полинуклеотиды являются взаимозаменяемыми. Специалист в данной

области обладает общими знаниями, что нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды, которые могут гидролизироваться до мономерных "нуклеотидов". Мономерные нуклеотиды могут гидролизироваться до нуклеотидов. Как используют в настоящем описании, полинуклеотиды включают, но не ограничиваются ими, все последовательности нуклеиновой кислоты, которые получают любыми способами, доступными в данной области, включая без ограничения, рекомбинантные способы, т.е. клонирование последовательностей нуклеиновой кислоты из рекомбинантной библиотеки или генома клетки с использованием общепринятой технологии клонирования и ПЦР™, и т.п., и способами синтеза.

Как используют в настоящем описании, термины "пептид", "полипептид" и "белок" используют взаимозаменяемо, и он относится к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не существует какого-либо ограничения максимального числа аминокислот, которое может содержать белковая или пептидная последовательность. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Как используют в настоящем описании, термин относится к коротким цепям, которые также общепринято в данной области обозначают, например как пептиды, олигопептиды и олигомеры, и к длинным цепям, которые, как правило, в данной области обозначают как белки, которые представлены многими типами. "Полипептиды" включают, например, наряду с другими биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитые белки. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их сочетание.

Как используют в настоящем описании, термин "промотор" определяют как последовательность ДНК, распознаваемую аппаратом синтеза клетки или вводимым аппаратом синтеза, необходимую для

инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности.

Как используют в настоящем описании, термин "промоторная/регуляторная последовательность" означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая является необходимой для экспрессии продукта гена, функционально связанный с промоторной/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях такая последовательность может представлять собой коровую промоторную последовательность, и в других случаях такая последовательность также может содержать энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, которые являются необходимыми для экспрессии продукта гена. Промоторная/регуляторная последовательность может, например, представлять собой последовательность, которая экспрессирует продукт гена тканеспецифическим образом.

"Конститутивный" промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая, когда является функционально связанной с полинуклеотидом, который кодирует или определяет продукт гена, вызывает продукцию продукта гена в клетке при большей части или при всех физиологических условиях клетки.

"Индукцибельный" промотор представляет собой нуклеотидную последовательность которая, когда является функционально связанной с полинуклеотидом, который кодирует или определяет продукт гена, вызывает продукцию продукта гена в клетке по существу только, когда в клетке присутствует индуцирующий фактор, который соответствует промотору.

"Тканеспецифический" промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая, когда является функционально связанной с полинуклеотидом, который кодирует или определяет ген, вызывает продукцию продукта гена в клетке, по существу только если клетка представляет собой клетку типа ткани, соответствующего промотору.

"Вирус Сендай" относится к роду семейства *Paramyxoviridae*. Вирусы Сендай представляют собой отрицательные одноцепочечные РНК-вирусы, которые не интегрируются в геном хозяина или не изменяют генетическую информацию клетки-хозяина. Вирусы Сендай

имеют очень широкий диапазон хозяев и не являются патогенными для людей. Используемые как рекомбинантный вирусный вектор, вирусы Сендай способны к транзиторной, но сильной экспрессии гена.

"Путь передачи сигнала" относится к биохимическому отношению различных молекул передачи сигнала, которые играют роль в передаче сигнала из одной части клетки в другую часть клетки. Фраза "рецептор клеточной поверхности" включает молекулы и комплексы молекул, способные получать сигнал и передавать сигнал через плазматическую мембрану клетки.

"Одноцепочечные антитела" относятся к антителам, получаемым посредством технологий рекомбинантной ДНК, в которых фрагменты тяжелых и легких цепей иммуноглобулина являются связанными с областью Fv через конструируемую последовательность аминокислот. Известны различные способы получения одноцепочечных антител, включая способы, описанные в патенте США № 4694778; Bird, (1988) *Science*, 242:423-442; Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883; Ward et al., (1989) *Nature*, 334:54454; Skerra et al., (1988) *Science*, 242:1038-1041.

Как используют в настоящем описании, под термином "специфически связывается" в отношении антитела подразумевают антитело, которое распознает специфический антиген, но по существу не распознает или связывает другие молекулы в образце. Например, антитело, которое специфически связывается с антигеном от одного вида, также может связываться с антигеном от одного или более видов. Однако такая межвидовая реактивность сама по себе не изменяет классификацию антитела как специфического. В другом примере антитело, которое специфически связывается с антигеном, также может связываться с другими аллельными формами антигена. Однако такая перекрестная реактивность сама по себе не изменяет классификацию антитела как специфического. В некоторых случаях термины "специфическое связывание" или "специфически связывающее" можно использовать по отношению к взаимодействию антитела, белка или пептида со вторым химическим соединением, что означает, что взаимодействие зависит от присутствия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или

эпитопа) на химическом соединении; например, антитело распознает и связывается с конкретной белковой структурой, а не с белками вообще. Если антитело является специфическим к эпитопу "А", присутствие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободный немеченый А) в реакционной смеси, содержащей меченный "А" и антитело, будет снижать количество меченого А, связанного с антителом.

Под термином "стимуляция" подразумевают первичный ответ, индуцируемый связыванием стимулирующей молекулы (например, комплекса TCR/CD3) со своим когнатным лигандом, таким образом, опосредуя событие передачи сигнала, такое как, но, не ограничиваясь им, передача сигнала через комплекс TCR/CD3. Стимуляция может опосредовать измененную экспрессию определенных молекул, такую как снижение экспрессии TGF-бета и/или реорганизация структур цитоскелета и т.п.

"Стимулирующая молекула", как термин используют в настоящем описании, означает молекулу на Т-клетке, которая специфически связывается с когнатным стимулирующим лигандом, присутствующим на антигенпрезентирующей клетке.

Как используют в настоящем описании, "стимулирующий лиганд" означает лиганд, который, когда присутствует на антигенпрезентирующей клетке (например, аАРС, дендритной клетке, В-клетка и т.п.), может специфически связываться с когнатным партнером по связыванию (обозначаемым в настоящем описании как "стимулирующая молекула") на Т-клетке, таким образом, опосредуя первичный ответ Т-клеткой, включая, но, не ограничиваясь ими, активацию, инициацию иммунного ответа, пролиферацию и т.п. Стимулирующие лиганды хорошо известны в данной области и в числе прочего включают молекулу МНС I класса, нагруженную пептидом, антителом против CD3, антителом-суперагонистом против CD28 и антителом суперагониста против CD2.

Термин "индивидуум" предназначен включать живые организмы, у которых можно вызывать иммунный ответ (например, млекопитающих). Как используют в настоящем описании, "индивидуум" или "пациент" может являться человеком или не принадлежащим человеку млекопитающим. Не принадлежащее человеку

млекопитающие включает, например, домашний скот и домашних животных, таких как млекопитающие, являющиеся овцами, крупным рогатым скотом, свиньями, собаками, кошками и мышами. Предпочтительно индивидуум является человеком.

Как используют в настоящем описании, "в значительной степени очищенная" клетка представляет собой клетку, которая по существу не содержит другие типы клеток. В значительной степени очищенная клетка также относится к клетке, которую отделили от других типов клеток, с которыми она является обычно связанной в своем природном состоянии. В некоторых случаях популяция в значительной степени очищенных клеток относится к гомогенной популяции клеток. В других случаях этот термин относится просто к клетке, которую отделили от клеток, с которыми она естественным образом связана в своем природном состоянии. В определенных вариантах осуществления клетки культивируют *in vitro*. В других вариантах осуществления клетки не культивируют *in vitro*.

"Участок-мишень" или "последовательность-мишень" относится к геномной последовательности нуклеиновой кислоты, которая определяет положение нуклеиновой кислоты, с которым связывающая молекула может специфически связываться в условиях, достаточных для того, чтобы происходило связывание.

Как используют в настоящем описании, термин "Т-клеточный рецептор" или "TCR" относится к комплексу мембранных белков, которые участвуют в активации Т-клеток в ответ на презентацию антигена. TCR отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости. TCR состоит из гетеродимера альфа- (α) и бета- (β) цепи, хотя в некоторых клетках TCR состоит из гамма- и дельта- (γ/δ) цепей. TCR могут существовать в альфа/бета и гамма/дельта формах, которые являются структурно аналогичными, но характеризуются отличными анатомическими локализациями и функциями. Каждая цепь состоит из двух внеклеточных доменов, варибельного и константного домена. В определенных вариантах осуществления TCR можно модифицировать на любой клетке, содержащей TCR, включая, например, хелперную Т-

клетку, цитотоксическую Т-клетку, Т-клетку памяти, регуляторную Т-клетку, естественную киллерную Т-клетку и Т-клетку гамма-дельта.

Как используют в настоящем описании, термин "терапевтический" означает лечение и/или профилактику. Терапевтический эффект получают в результате подавления, ремиссии или устранения состояния болезни.

Как используют в настоящем описании, термин "трансфицированный" или "трансформированный", или "трансдуцированный" относится к процессу, посредством которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. "Трансфицированная" или "трансформированная", или "трансдуцированная" клетка представляет собой клетку, которую трансфицировали, трансформировали или трансдуцировали экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную исследуемую клетку и ее потомство.

"Лечить" заболевание, как термин используют в настоящем описании, означает снижать частоту появления или тяжесть по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения, которым страдает индивидуум.

Как используют в настоящем описании, фраза "под транскрипционным контролем" или "функционально связанный" означает, что промотор находится в конкретной локализации и ориентации по отношению к полинуклеотиду, чтобы контролировать инициацию транскрипции РНК-полимеразой и экспрессию полинуклеотида.

"Вектор" представляет собой композицию вещества, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту, и которую можно использовать для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Различные векторы известны в данной области, включая, но, не ограничиваясь ими, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин "вектор" включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Также следует интерпретировать, что термин включает не являющиеся плазмидой и не являющиеся вирусом соединения, которые облегчают

перенос нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, соединения полилизина, липосомы и т.п. Примеры вирусных векторов включают, но не ограничиваются ими, векторы на основе вируса Сендай, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т.п.

Диапазоны: на всем протяжении этого описания различные аспекты изобретения могут быть представлены в формате диапазонов. Следует понимать, что описание в формате диапазона предназначено только для удобства и краткости, и его не следует рассматривать как жесткое ограничение объема изобретения. Таким образом, следует интерпретировать, что в описании диапазона конкретно описаны все возможные поддиапазоны, а также индивидуальные численные величины в таком диапазоне. Например, следует интерпретировать, что в описании диапазона, таком как от 1 до 6, конкретно описывают поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также отдельные числа в этом диапазоне, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. Это применимо независимо от ширины диапазона.

Описание

Универсальные Т-клетки, которые устраняют болезнь трансплантат против хозяина (GVHD), являются очень желательными в клинических условиях. Однако использование аллогенных Т-клеток несет риск вследствие отторжения иммунной системой хозяина через распознавание молекул HLA-A. Стратегии направленного воздействия для манипуляции многих генов являются сложными, и попытки привести к низкой эффективности в Т-клетках без предотвращения GVHD и реакций "трансплантат против хозяина" одновременно.

Сигнальный путь апоптоза рецептор FAS/лиганд FAS (FAS/FASL) отрицательно регулирует функцию Т-клеток. PD1 и CTLA4 представляют собой два основных ингибирующих пути передачи сигнала в Т-клетках. Повышенный противоопухолевый иммунитет, который является результатом опосредованной антителами блокады CTLA-4, PD-1 или PD-L1, подтверждает возможность улучшать эффективность видов иммунотерапии путем ингибирования этих путей. Изобретение относится к получению модифицированных Т-

клеток, где α - и β -цепь TCR, бета-2-микроглобулин, молекулу HLA, CTLA-4, PD-1 и/или FAS истощают с тем, чтобы получать модифицированные Т-клетки с пониженной иммуногенностью.

Настоящее изобретение относится к способам и композициям для получения модифицированной Т-клетки путем нокдауна экспрессии эндогенного гена и экспрессии модифицированной Т-клеточного рецептора или химерного антигенного рецептора. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к способу получения модифицированной Т-клетки. Такую модифицированную Т-клетку можно включать в терапевтическую композицию и вводить нуждающемуся в этом пациенту.

Нокдаун экспрессии эндогенного гена

Настоящее изобретение относится к снижению экспрессии эндогенного гена в Т-клетке, такому как снижение экспрессии альфа- и/или бета-цепи Т-клеточного рецептора (TCR), бета-2-микроглобулина, CTLA-4, FAS, PD1 или белок главного комплекса гистосовместимости, такой как молекула HLA. В одном из вариантов осуществления Т-клетка с пониженной экспрессией гена обладает пониженной иммуногенностью в аллогенной среде. В другом варианте осуществления Т-клетка со сниженной иммуногенностью экспрессирует модифицированный TCR или CAR для направленной эффекторной активности.

В одном из аспектов изобретение относится к способу получения модифицированной Т-клетки, содержащей вводимую нуклеиновую кислоту в Т-клетку, способную подавлять экспрессию эндогенного гена, где ген выбран из группы, состоящей из α -цепи TCR, β -цепи TCR, бета-2-микроглобулина, молекулы HLA, CTLA-4, PD1 и FAS. Подавление экспрессии эндогенного гена, который участвует в образовании иммунного ответа к клетке, такого как α -цепь TCR, β -цепь TCR, бета-2-микроглобулин или молекула HLA, снижает иммуноопосредованное отторжение модифицированной Т-клетки. Например, подавление экспрессии эндогенных генов TCR, MHC или бета-2-микроглобулина приводит к устранению презентации аллоантигенов на поверхности Т-клетке, которое может вызывать отторжение иммунной системой хозяина. Также подавление

эндогенного гена, который регулирует ингибирующие пути передачи сигнала в Т-клетках, таких как CTLA-4, PD1 и/или FAS, повышает противоопухолевую эффективность модифицированной Т-клетки при воздействии иммуносупрессивной микросреды.

В одном из аспектов нуклеиновую кислоту, способную подавлять экспрессию эндогенного гена, вводят, таким образом, как электропорацией, трансфекцией или трансдукцией лентивирусом или другими вирусами в Т-клетку. В другом аспекте изобретение относится к модифицированной Т-клетке, содержащей вводимую электропорацией нуклеиновую кислоту, способную подавлять экспрессию эндогенного гена. В еще одном аспекте модифицированная Т-клетка содержит вводимую электропорацией нуклеиновую кислоту, способную подавлять экспрессию эндогенного гена TCR. В другом аспекте композицию, содержащую модифицированную Т-клетку, получают способом, описываемым в настоящем описании. В еще одном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей модифицированную Т-клетку или модифицированную Т-клетку, получаемую способом, описываемым в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель.

Нуклеиновая кислота, способная регулировать экспрессию эндогенного гена, может подавлять экспрессию эндогенного гена. В одном из вариантов осуществления нуклеиновая кислота, способная подавлять экспрессию эндогенного гена, выбрана из группы, состоящей из антисмысловой РНК, антагомирной РНК, миРНК, кшРНК и CRISPR-системы. Экспрессию эндогенного гена можно подавлять, проводить нокдаун, снижать и/или ингибировать, например, антисмысловой РНК, антагомирной РНК, миРНК, кшРНК, CRISPR-системой и т.д.

CRISPR/Cas

CRISPR/Cas-система представляет собой простую и эффективную систему для индукции целевых генетических изменений. Для распознавания мишени белком Cas9 необходимой является "затравочная" последовательность в гидовой РНК (гРНК) и последовательность прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), состоящего из консервативного динуклеотида, выше гРНК-

связывающей области. Таким образом, можно конструировать CRISPR/CAS-систему для расщепления практически любой последовательности ДНК путем реконструкции гРНК в линиях клеток (таких как клетки 293T), первичных клетках и CAR T-клетках. CRISPR/CAS-система может одновременно направленно воздействовать на многие геномные локусы посредством коэкспрессии одного белка CAS9 с двумя или более гРНК, что делает эту систему единственной подходящей для редактирования многих генов или синергической активации генов-мишеней.

Один из примеров CRISPR/CAS-системы, используемой для ингибирования экспрессии гена, CRISPRi, описан в публикации U.S. № 2014/0068797. CRISPRi индуцирует постоянное разрушение гена, в которой используют направляемую РНК эндонуклеазу Cas9 для введения двухцепочечных разрывов ДНК, которые запускают допускающие ошибки пути репарации, что приводит к мутациям сдвига рамки считывания. Каталитически мертвый Cas9 не обладает эндонуклеазной активностью. В случае коэкспрессии с гидовой РНК получают распознающий ДНК комплекс, который специфически препятствует транскрипционной элонгации, связыванию РНК-полимеразы или связыванию факторов транскрипции. Такая CRISPRi-система эффективно подавляет экспрессию целевых генов.

Разрушение гена CRISPR/Cas происходит, когда в клетку вводят гидовую последовательность нуклеиновой кислоты, специфическую к гену-мишени, и вводят в клетку эндонуклеазу Cas, и образуется комплекс, который позволяет эндонуклеазе Cas вводить разрыв двойной цепи в гене-мишени. В одном из вариантов осуществления CRISPR-система содержит экспрессирующий вектор, такой как, но, не ограничиваясь им, вектор pAd5F35-CRISPR. В одном из вариантов осуществления модифицированную Т-клетку получают введением экспрессирующего вектора Cas и гидовой последовательности нуклеиновой кислоты, специфической к гену в Т-клетке. В другом варианте осуществления экспрессирующий Cas вектор индуцирует экспрессию эндонуклеазы Cas9. Также можно использовать другие эндонуклеазы, включая, но, не ограничиваясь ими, T7, Cas3, Cas8a, Cas8b, Cas10d, Cse1, Csy1, Csn2, Cas4, Cas10, Csm2, Cmr5, Fok1, другие известные в данной области

нуклеазы и любое их сочетание.

В одном из вариантов осуществления индукция экспрессирующего Cas вектора включает подвергание Т-клетки воздействию средства, которое активирует индуцибельный промотор в экспрессирующем Cas векторе. В таком варианте осуществления экспрессирующий Cas вектор содержит индуцибельный промотор, такой как промотор, который индуцируется воздействием антибиотика (например, тетрациклином или производным тетрациклина, например, доксициклином). Однако следует понимать, что можно использовать другие индуцибельные промоторы. Индуцирующее средство может представлять собой избирательные условия (например, воздействие средством, например, антибиотиком), которые приводят к индукции индуцибельного промотора. Это приводит к экспрессии экспрессирующего Cas вектора.

Гидовая последовательность нуклеиновой кислоты является специфическим для гена и направленно воздействует на такой ген для индуцированных эндонуклеазой Cas разрывов двойной цепи. Последовательность гидовой последовательности нуклеиновой кислоты может находиться в локусе гена. В одном из вариантов осуществления длина гидовой последовательности нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 или более нуклеотидов.

Гидовая последовательность нуклеиновой кислоты может являться специфической к любому гену, такому как ген, который снижает иммуногенность или снижает чувствительность к иммуносупрессивной микросреде. В одном из вариантов осуществления ген может включать последовательность, специфическую к цепи Т-клеточного рецептора (TCR) (такой альфа-, бета-, гамма- и/или дельта-цепь), бета-2-микроглобулину, FAS, PD1, белку главного комплекса гистосовместимости (такому как молекула HL I класса и/или молекула HL II класса), CTLA-4 или любому их сочетанию.

Гидовая последовательность нуклеиновой кислоты включает РНК последовательность, ДНК последовательность, их сочетание

(комбинированную последовательность РНК-ДНК) или последовательность с синтетическими нуклеотидами. Гидовая последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой одну молекулу или двойную молекулу. В одном из вариантов осуществления гидовая последовательность нуклеиновой кислоты содержит одну гидовую РНК.

Т-клеточный рецептор

Адоптивная иммунотерапия Т-клетками, несущими антигенспецифические TCR, обладает возможностью применения в терапии для лечения злокачественной опухоли и определенных хронических вирусных инфекций. Генная инженерия Т-клеток с определенным TCR обладает преимуществом, которое заключается в перенаправлении Т-клетки к внутриклеточному антигену. Принимая во внимание, что большая часть онкогенных белков является внутриклеточной, разработка панели TCR, специфических к онкогенному белку, является очень привлекательной.

Настоящее изобретение также относится к модифицированной Т-клетке с пониженной экспрессией гена, как описано в настоящем описании, и экзогенным Т-клеточным рецептором (TCR). В одном из аспектов изобретение относится к способу получения модифицированной Т-клетки, содержащей вводимую нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный Т-клеточный рецептор (TCR), обладающий аффинностью к поверхностному антигену на клетке-мишени в Т-клетке, и нуклеиновую кислоту, способную регулировать экспрессию эндогенного гена, выбранного из группы, состоящей из α -цепи TCR, β -цепи TCR, бета-2-микроглобулина, PD1 и FAS, где Т-клетки способны экспрессировать модифицированный TCR.

В другом аспекте изобретение относится к модифицированной Т-клетке, содержащей экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный Т-клеточный рецептор (TCR), обладающий аффинностью к поверхностному антигену на клетке-мишени, и нуклеиновую кислоту, способную подавлять экспрессию эндогенного гена, выбранного из группы, состоящей из α -цепи TCR, β -цепи TCR, бета-2-микроглобулина, PD1 и FAS, где Т-клетки экспрессирует модифицированный TCR, и где экспрессия эндогенного гена в Т-

клетке является пониженной. Изобретение также относится к популяции клеток, содержащей модифицированную Т-клетку, описываемую в настоящем описании.

Т-клеточный рецептор представляет собой комплекс мембранных белков, которые участвуют в активации Т-клеток в ответ на презентацию антигена. Стимуляция TCR запускается молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) на антигенпрезентирующих клетках, которые презентуют антигенные пептиды Т-клеткам и связываются с комплексами TCR, индуцируя серию внутриклеточных сигнальных каскадов.

TCR, как правило, состоит из шести различных связанных с мембраной цепей, которые образуют гетеродимер TCR, ответственный за распознавание лиганда. TCR существует в формах альфа/бета и гамма/дельта, которые являются структурно схожими, но характеризуются различными анатомическими локализациями и функциями. В одном из вариантов осуществления TCR содержит альфа-цепь TCR и бета-цепь TCR, так как нуклеиновая кислота, кодирующая TCR, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую альфа-цепь TCR и бета-цепь TCR. В другом варианте осуществления альфа-цепь TCR или бета-цепь TCR, или обе цепи характеризуются по меньшей мере одним N-дегликозилированием.

Каждая цепь состоит из двух внеклеточных доменов, переменного и константного домена. В одном из вариантов осуществления TCR содержит по меньшей мере одну константную область мыши. Константный домен является проксимальным к клеточной мембране, за которым следует трансмембранный домен и короткий цитоплазматический хвост. В одном из вариантов осуществления модифицированный TCR содержит цитоплазматический домен, содержащий костимулирующий сигнальный домен, такой как костимулирующий сигнальный домен 4-1BB. Переменный домен способствует определению конкретного антигена и молекулы МНС, к которой TCR обладает специфичностью связывания. В свою очередь, специфичность Т-клетки к уникальному комплексу антиген-МНС заключается в конкретном TCR, экспрессируемом Т-клеткой.

Каждый из константного и переменного доменов может содержать внутрицепочечную дисульфидную связь. В одном из

вариантов осуществления TCR содержит по меньшей мере одну дисульфидную связь. Вариабельные домены содержат высоко полиморфные петли, аналогичные определяющим комплементарность областям (CDR) антител. Разнообразие последовательностей TCR получают путем соматической перестановки связанных вариабельных (V), разнообразных (D), соединяющих (J) и константных генов.

Функциональные полипептиды с альфа- и гамма-цепями образованы перегруппированными областями V-J-C, тогда как бета- и дельта-цепи состоят из областей V-D-J-C. Внеклеточный константный домен содержит мембранную проксимальную область и область иммуноглобулина.

В одном из вариантов осуществления TCR включает TCR дикого типа, высокоаффинный TCR и химерный TCR. Когда TCR модифицируют, он может обладать более высокой аффинностью к антигену-мишени клеточной поверхности по сравнению с TCR дикого типа. В вариантах осуществления, где TCR представляет собой химерный TCR, TCR может содержать химерные домены, так как TCR содержит костимулирующий сигнальный домен на С-конце по меньшей мере одной из цепей. В другом варианте осуществления TCR может содержать модифицированную цепь, такую как модифицированная альфа- или бета-цепь. Такие модификации могут включать, но не ограничиваются ими, N-дегликозилирование, измененный домен (такой как сконструированная вариабельная область для нацеливания на конкретный антиген или повышения аффинности), добавление одной или более дисульфидных связей, полной или фрагмента цепи, получаемой от другого вида и любое их сочетание.

В одном из вариантов осуществления TCR обладает специфичностью к антигену клетка-мишень. Поверхностный антиген клетки-мишени могут включать любой тип лиганда, который определяет поверхность клетки-мишени. Например, поверхностный антиген клетки-мишени можно выбирать для распознавания лиганда, который действует как поверхностный клеточный маркер на клетках-мишенях, связанных с конкретным состоянием болезни. Таким образом, примеры поверхностных клеточных маркеров, которые могут действовать как лиганды для антигенсвязывающего домена TCR, включая TCR, связанные с вирусными, бактериальными и

паразитарными инфекциями, аутоиммунным заболеванием и злокачественными клетками. В одном из вариантов осуществления поверхностный антиген клетки-мишени включает любой опухолеассоциированный антиген (ТАА) и вирусный антиген, связанный с заболеванием клетки антиген или любой его фрагмент.

Антиген клетки-мишень может включать любой белок, который может быть процессирован и презентирован главными комплексами гистосовместимости. Например, антиген-мишень может быть связан с конкретным состоянием болезни. Таким образом, примеры паразитарными инфекциями, которые могут действовать как мишени TCR, включают клеточные маркеры, ассоциированные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, аутоиммунным заболеванием и злокачественными клетками. В одном из вариантов осуществления антиген-мишень включает любой из опухолеассоциированных антигенов (ТАА) и вирусных антигенов или любой его фрагмент.

В одном из аспектов изобретение относится к популяции модифицированных Т-клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный Т-клеточный рецептор (TCR), обладающий аффинностью к поверхностному антигену на клетке-мишени, и нуклеиновую кислоту, способную подавлять экспрессию эндогенного гена, выбранного из группы, состоящей из α -цепи TCR, β -цепи TCR, бета-2-микроглобулина, молекулы HLA, CTLA-4, PD1 и FAS, где Т-клетки способны экспрессировать модифицированный TCR.

Способы конструирования и экспрессии Т-клеточных рецепторов включают, но не ограничиваются ими, получение гетеродимеров TCR, которые содержат нативный дисульфидный мостик, который соединяет соответствующие субъединицы (Garboczi et al., (1996), *Nature*, 384(6605): 134-41; Garboczi et al., (1996), *J. Immunol.*, 157(12): 5403-10; Chang et al., (1994), *PNAS USA*, 91: 11408-11412; Davodeau et al., (1993), *J. Biol. Chem.*, 268(21): 15455-15460; Golden et al., (1997), *J. Imm. Meth.*, 206: 163-169; патент США № 6080840).

Химерный антигенный рецептор (CAR)

Настоящее изобретение также относится к модифицированной Т-

клетке с пониженной экспрессией гена, как описано в настоящем описании, и CAR. Таким образом, настоящее изобретение относится к модифицированной Т-клетке, содержащей CAR или нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен.

В одном из аспектов изобретение относится к способу получения модифицированной Т-клетки, содержащей вводимую нуклеиновую кислоту, способную понижать экспрессию эндогенного гена, выбранного из группы, состоящей из α -цепи TCR, β -цепи TCR, бета-2-микроглобулина, молекулы HLA, CTLA-4, PD1 и FAS в Т-клетке, и нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) в Т-клетке, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен костимулирующей молекулы.

В другом аспекте изобретение относится к модифицированной Т-клетке, содержащей нуклеиновую кислоту, способную понижать экспрессию эндогенного гена, и нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где пониженная экспрессия гена выбрана из группы, состоящей из α -цепи TCR, β -цепи TCR, бета-2-микроглобулина, молекулы HLA, CTLA-4, PD1 и FAS, и где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. В одном из вариантов осуществления модифицированная Т-клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный TCR, обладающий аффинностью к поверхностному антигену на клетке-мишени, как описано в другом месте в настоящем описании. Изобретение также относится к популяции клеток, содержащих модифицированную Т-клетку, описываемую в настоящем описании.

Один или более доменов или фрагмент домена CAR может принадлежать человеку. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к CAR полностью принадлежащему человеку. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие желаемые домены можно получать известными в данной области рекомбинантными способами, такими как, например, скринингом

библиотек из клеток, экспрессирующих ген, получением гена из вектора, для которого известно, что он содержит такой ген, или выделением непосредственно из клеток и тканей, содержащих такой ген стандартными способами. Альтернативно, представляющий интерес ген можно получать синтезом, а не как клонируемую молекулу.

Примеры CAR описаны в патентах США №: 8911993, 8906682, 8975071, 8916381, 9102760, 9101584 и 9102761, которые полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Антигенсвязывающий домен

В одном из вариантов осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном на клетке-мишени. Примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут действовать как антиген, который связывается с антигенсвязывающим доменом CAR, включают маркеры клеточной поверхности, ассоциированные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, аутоиммунным заболеванием и злокачественными клетками.

Выбор антигенсвязывающего домена зависит от типа и числа антигенов, которые презентруются на поверхности клетки-мишени. Например, антигенсвязывающий домен можно выбирать так, чтобы он распознавал антиген, который действует как маркер клеточной поверхности на клетке-мишени, связанной с конкретным состоянием болезни.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен связывается с опухолевым антигеном, таким как антиген, который является специфическим для представляющий интерес опухоли или злокачественной опухоли. В одном из вариантов осуществления опухолевый антиген по настоящему изобретению содержит один или более антигенных эпитопов злокачественной опухоли.

Антигенсвязывающий домен может включать любой домен, который связывается с антигеном и может включать, но не ограничиваться ими, моноклональное антитело, поликлональное антитело, синтетическое антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, не принадлежащее человеку антитело и любой его фрагмент. Таким образом, в одном из вариантов

осуществления участок антигенсвязывающего домена содержит антитело млекопитающего или его фрагмент.

Антигенсвязывающий домен может связываться с одним или более антигенами, такими как, но, не ограничиваясь ими, CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1 (также обозначаемый как CD2 подгруппа 1, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24); лектинподобную молекулу 1 С типа (CLL-1 или CLECL1); CD33; вариант III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII); ганглиозид G2 (GD2); ганглиозид GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer); представитель семейства TNF-рецепторов созревания В-клеток (BCMA); антиген Tn ((Tn Ag) или (GalNAc α -Ser/Thr)); специфический мембранный антиген предстательной железы (PSMA); рецептор-сироту 1 тирозинкиназоподобного рецептора (ROR1); Fms-подобная тирозинкиназа 3 (FLT3); опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG72); CD38; CD44v6; раково-эмбриональный антиген (CEA); эпителиальная молекула клеточной адгезии (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); субъединицу альфа-2 рецептора интерлейкина-13 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелин; рецептор альфа интерлейкина 11 (IL-11Ra); антиген стволовой клетки предстательной железы (PSCA); сериновая протеазу 21 (тестизин или PRSS21); рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2); антиген системы Льюис (Y); CD24; рецептор бета фактора роста тромбоцитов (PDGFR-бета); стадиеспецифический эмбриональный антиген 4 (SSEA-4); CD20; рецептор альфа фолата; рецептор тирозинпротеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); связанный с клеточной поверхностью муцин 1 (MUC1); рецептор эпидермального фактора роста (EGFR); нейрональная молекула клеточной адгезии (NCAM); простаза; кислая фосфатаза предстательной железы (PAP); мутантный фактор элонгации 2 (ELF2M); эфрин B2; белок альфа активации фибробластов (FAP); рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептор IGF-I), карбоангидраза IX (CAIX); субъединица бета типа 9 протеасомы (просома, мультикалалитическая протеаза), (LMP2); гликопротеин 100 (gp100); онкогенный слитый белок, состоящий из кластерной области точечных разрывов (BCR) и гомолог 1 вируса лейкоза мышей

онкогена Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназа; рецептора 2 А типа эфрина (EphA2); фукозил GM1; молекула адгезии сиал-Lewis (sLe); ганглиозид GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer); трансглутаминаза 5 (TGS5); высокомолекулярный ассоциированный с меланомой антиген (HMWMAA); ганглиозид о-ацетил-GD2 (OAcGD2); рецептор бета фолата; эндотелиальный маркер опухоли 1 (TEM1/CD248); антиген родственный эндотелиальному маркеру опухоли 7 (TEM7R); клаудин 6 (CLDN6); рецептор тиреотропного гормона (TSHR); сопряженный с G-белком рецептор класса С группы 5, представитель D (GPRC5D); открытая рамка считывания 61 хромосомы X (CXORF61); CD97; CD179a; киназа анапластической лимфомы (ALK); полисиаловая кислота; плацентоспецифический 1 (PLAC1); гексасахаридный участок гликоцерамида globoH (GloboH); антиген дифференцировки молочной железы (NY-BR-1); уроплакин 2 (UPK2); клеточный рецептор 1 вируса гепатита А (HAVCR1); адренорецептор бета 3 (ADRB3); паннексин 3 (PANX3); сопряженный с G-белком рецептор 20 (GPR20); комплекс лимфоцитарного антигена 6, локус К 9 (LY6K); обонятельный рецептор 51E2 (OR51E2); белок TCR гамма альтернативной рамки считывания (TARP); белок опухоли Вильмса (WT1); антиген 1 злокачественной опухоли/семенников (NY-ESO-1); антиген 2 злокачественной опухоли/семенников (LAGE-1a); ассоциированный с меланомой антиген 1 (MAGE-A1); вариант 6 транслокации гена ETS, локализованного на хромосоме 12p (ETV6-AML); белок 17 спермы (SPA17); представитель 1A семейства антигенов X (XAGE1); связывающий ангиопоэтин рецептор 2 клеточной поверхности (Tie 2); раково-тестикулярный антиген 1 при меланоме (MAD-CT-1); раково-тестикулярный антиген 2 при меланоме (MAD-CT-2); Fos-родственный антиген 1; опухолевый белок p53 (p53); мутантный p53; протеин; теломераза; опухолевый антиген 1 карциномы предстательной железы (PCTA-1 или галектин 8), антиген меланомы, распознаваемый Т-клетками 1 (MelanA или MART1); мутантный антиген саркомы крысы (Ras); обратная транскриптаза теломеразы человека (hTERT); точки разрыва транслокации при саркоме; ингибитор апоптоза меланомы (ML-IAP); ERG (слитый ген ETS трансмембранной протеазы, серин 2 (TMPRSS2)); N-ацетилглюкозаминилтрансфераза V (NA17); белок с

парным доменом Pax-3 (PAX3); андрогенный рецептор; циклин B1; гомолог v-мус, получаемый из вирусного онкогена нейробластомы миелоцитоматоза птиц (MYCN); представитель семейства C гомологов Ras (RhoC); родственный тирозиназе белок 2 (TRP-2); цитохром P450 1B1 (CYP1B1); антиген, подобный связывающему CCCTC фактору (белку с цинковыми пальцами) (BORIS или Brother of the Regulator of Imprinted Sites), антиген плоскоклеточной карциномы, распознаваемый Т-клетками 3 (SART3); белок спаренных доменов Pax-5 (PAX5); связывающий проакрозин белок sp32 (OY-TES1); специфическая к лимфоцитам протеин-тирозинкиназа (LCK); якорный белок 4 киназы (AKAP-4); X точечный разрыв 2 при синовиальной саркомы (SSX2); рецептор конечных продукты гликации (RAGE-1); почечный общераспространенный антиген 1 (RU1); почечный общераспространенный антиген 2 (RU2); легумаин; E6 вируса папилломы человека (HPV E6); E7 вируса папилломы человека (HPV E7); кишечную карбоксилэстеразу; мутантный белок теплового шока 70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; лейкоцит-ассоциированный иммуноглобулиноподобный рецептор 1 (LAIR1); фрагмент Fc рецептора IgA (FCAR или CD89); представитель 2 подсемейства A лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LILRA2); представитель семейства f подобных CD300 молекул (CD300LF); представитель A семейства 12 лектиновых доменов типа C (CLEC12A); антиген 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); EGF-подобный содержащий модуль муциноподобный, подобный гормональному рецептору 2 антиген (EMR2); лимфоцитарный антиген 75 (LY75); глипикан 3 (GPC3); подобный Fc-рецептору антиген 5 (FCRL5) и подобный иммуноглобулину лямбда полипептид 1 (IGLL1).

В некоторых случаях, предпочтительно получать антигенсвязывающий домен от того же вида, для которого будут в конечном итоге использовать CAR. Например, для применения у людей предпочтительным может являться, чтобы антигенсвязывающий домен CAR содержал антитело человека, гуманизированное антитело, как описано в другом месте в настоящем описании, или его фрагмент.

Также предпочтительно чтобы антигенсвязывающий домен являлся функционально связанным с другим доменом CAR, таким как

трансмембранный домен или внутриклеточный домен, которые описаны в другом месте в настоящем описании, для экспрессии в клетке. В одном из вариантов осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающий домен, является функционально связанной с нуклеиновой кислотой, кодирующей трансмембранный домен, и нуклеиновой кислотой, кодирующей внутриклеточный домен.

Трансмембранный домен

В отношении трансмембранного домена CAR можно конструировать так, чтобы он содержал трансмембранный домен, который соединяет антигенсвязывающий домен CAR с внутриклеточным доменом. В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен естественным образом связан с одним или более доменов в CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен можно выбирать или модифицировать заменой аминокислот для устранения связывания таких доменов с трансмембранными доменами одинаковых или различных поверхностных мембранных белков для сведения к минимуму взаимодействия с другими мембранами рецепторного комплекса.

Трансмембранный домен можно получать из природного или синтетического источника. В случае, когда источник является природным, домен можно получать из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области, которые находят конкретное применение в настоящем изобретении, можно получать (т.е. они могут содержать по меньшей мере трансмембранные области) из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. В некоторых случаях можно применять ряд шарнирных областей человека, также включая шарнирную область Ig (иммуноглобулина) человека.

В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен может являться синтетическим, в случае чего он содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. Предпочтительно на каждом конце синтетического трансмембранного домена встречается триплет фенилаланин, триптофан и валин.

Внутриклеточный домен

Внутриклеточный домен или по-другому цитоплазматический

домен CAR ответствен за активацию клетки, в которой экспрессируется CAR. Таким образом, термин "внутриклеточный домен" предназначен включать любой участок внутриклеточного домена, достаточный для трансдукции активирующего сигнала. В одном из вариантов осуществления внутриклеточный домен включает домен, ответственный за эффекторную функцию. Термин "эффекторная функция" относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, включая секрецию цитокинов.

В одном из вариантов осуществления внутриклеточный домен CAR включает домен, ответственный за активацию и/или трансдукцию сигнала. Внутриклеточный домен может передавать активацию сигнала через взаимодействия белок-белок, биохимические изменения или другой ответ для изменения метаболизма, формы, экспрессии гена клетки или другого клеточного ответа на активацию химерной внутриклеточной сигнальной молекулы.

Примеры внутриклеточного домена для применения в изобретение включают, но не ограничиваются ими, цитоплазматический участок Т-клеточного рецептора (TCR) и любую костимулирующую молекулу, которая действует согласованно для инициации передачи сигнала после взаимодействия антигенного рецептора, а также любое производное или вариант этих элементов и любую синтетическую последовательность, которая обладает такой же функциональной способностью. В одном из вариантов осуществления внутриклеточный домен CAR содержит двойные сигнальные домены. Двойные сигнальные домены могут содержать фрагмент или домен из любой из молекул, описываемых в настоящем описании.

Примеры внутриклеточного домена включают фрагмент или домен из одной или более молекул или рецепторов, включая, но, не ограничиваясь ими, TCR, CD3-дзета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD86, общий FcR-гамма, FcR-бета (Fc-эпсилон R1b), CD79a, CD79b, Fc-гамма RIIa, DAP10, DAP12, Т-клеточный рецептор (TCR), CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, функционально-связанный антиген лимфоцитов 1 (LFA-1), CD2, CD7,

LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганд, который специфически связывается с CD83, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD127, CD160, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, другие костимулирующие молекулы, описываемые в настоящем описании, любое их производное, вариант или фрагмент, любую синтетическую последовательность костимулирующей молекулы, которая такой же функциональной способностью и любое их сочетание.

В одном из вариантов осуществления внутриклеточный домен CAR содержит любой участок костимулирующей молекулы, такой как по меньшей мере один сигнальный домен из CD3, CD27, CD28, ICOS, 4-1BB, PD-1, Т-клеточного рецептора (TCR), любого их производного или варианта, любой их синтетической последовательности, которая обладает такой же функциональной способностью, и любого их сочетания.

Между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом CAR или между внутриклеточным доменом и трансмембранным доменом CAR можно вводить спейсерный домен. Как используют в настоящем описании, термин "спейсерный домен", как правило, означает любой олиго- или полипептид, который функционирует, связывая трансмембранный домен с антигенсвязывающим доменом или внутриклеточным доменом в полипептидной цепи. В одном из вариантов осуществления спейсерный домен может содержать до 300 аминокислот, предпочтительно от 10 до 100 аминокислот и наиболее предпочтительно от 25 до 50 аминокислот. В другом варианте осуществления короткий олиго- или полипептидный линкер, предпочтительно длиной от 2 до 10 аминокислот может образовывать связь между трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом

CAR. Пример линкера включает дублет глицин-серин.

Антитела человека

Предпочтительным может являться использование антител человека или их фрагментов при использовании биспецифических антител или антигенсвязывающих доменов CAR. Полностью принадлежащие человеку антитела являются особенно желательными для терапевтического лечения являющихся человеком индивидуумов. Антитела человека можно получать рядом известных в данной области способов, включая способы фагового дисплея с использованием библиотеки антител, получаемых из последовательностей иммуноглобулина человека, включая усовершенствования этих способов. См. также патенты США № 4444887 и 4716111 и публикации РСТ WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741, каждая из которых полностью включена в настоящее описание посредством ссылки. Биспецифическое антитело cap также включает антитело, где тяжелая и легкая цепи кодируются нуклеотидной последовательностью, получаемой из одного или более источников ДНК человека.

Антитела человека также можно получать с использованием трансгенных мышей, которые неспособны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать гены иммуноглобулина человека. Например, в эмбриональные стволовые клетки мыши можно вводить комплексы генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулина человека случайным образом или гомологичной рекомбинацией. Альтернативно, в эмбриональные стволовые клетки мыши можно вводить вариабельную область, константную область и область разнообразия человека в дополнение к генам тяжелых и легких цепей человека. Гены тяжелых и легких цепей иммуноглобулина мыши можно делать нефункциональными отдельно или одновременно с введением локусов иммуноглобулина человека гомологичной рекомбинацией. Например, описано, что гомозиготная делеция гена J-сегмента тяжелой цепи антитела (JH) у химерных мышей и мышей, мутантных по зародышевой линии, приводит к полному ингибированию образования эндогенного антитела. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки

размножают и микроинъецируют в бластоцисты для получения химерных мышей. Затем скрещивают химерных мышей для получения гомозиготного потомства, у которого экспрессируются антитела человека. Трансгенных мышей иммунизируют в обычном порядке выбранным антигеном, например, полным или участком полипептида по изобретению. Антитела, направленные против выбранной мишени, можно получать от иммунизированных трансгенных мышей с использованием общепринятой гибридомной технологии. Трансгены иммуноглобулина человека, которые несут трансгенные мыши, претерпевают перегруппировку во время В-клеточной дифференцировки, а затем претерпевают переключение класса и соматическую мутацию. Таким образом, таким способом можно получать терапевтически пригодные антитела IgG, IgA, IgM и IgE, включая, но, не ограничиваясь ими, IgG1 (гамма 1) и IgG3. Для обзора этой технологии получения антител человека см. Lonberg and Huszar (Int. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)). Для подробного описания этой технологии получения антител человека и моноклональных антител человека, и протоколов получения таких антител см., например, публикации РСТ № WO 98/24893, WO 96/34096 и WO 96/33735 и патенты США № 5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806, 5814318 и 5939598, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Кроме того, компании, такие как Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) и Genpharm (San Jose, Calif.) могут брать на себя обязательства предоставления антител человека, направленных против выбранного антигена, с использованием технологии, аналогичной описанной выше технологии. Для конкретного обсуждения переноса массива генов иммуноглобулина зародышевой линии человека мышам, мутантным по зародышевой линии, который приводит к продукции антител человека при стимуляции антигеном, см., например, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993) и Duchosal et al., Nature, 355:258 (1992).

Антитела человека также можно получать из библиотек фагового дисплея (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381

(1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan et al., Nature Biotech., 14:309 (1996)). Технологию фагового дисплея (McCafferty et al., Nature, 348:552-553 (1990)) можно использовать для получения антител человека и фрагментов антител *in vitro* из репертуаров генов вариабельного (V) домена иммуноглобулина от иммунизированных доноров. В соответствии с этим способом гены V-домена антитела клонируют в рамке считывания в ген основного или минорного белка оболочки нитевидного бактериофага, такого как M13 или fd, и предоставляют как функциональные фрагменты антител на поверхности фаговой частицы. Вследствие того, что нитевидная частица содержит копию одноцепочечной ДНК генома фага, отборы, основанные на функциональных свойствах антитела, также приводит к отбору гена, кодирующего антитело, обладающее такими свойствами. Таким образом, фаг имитирует некоторые из свойств В-клетки. Фаговый дисплей можно выполнять в различных форматах; для его обзора см., например, Johnson Kevin S. and Chiswell David J., Current Opinion in Structural Biology, 3:564-571 (1993). Для фагового дисплея можно использовать несколько источников сегментов V-гена. Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) выделили разнотипный массив антител против оксазолон из небольшой рандомизированной комбинаторной библиотеки V-генов, получаемых из селезенки иммунизированных мышей. Можно конструировать репертуар V-генов от иммунизированных являющихся людьми доноров и можно выделять антитела к разнообразному массиву антигенов (включая аутоантигены) по существу способами, описанными Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) или Griffith et al., EMBO J., 12:725-734 (1993). Также см. патенты США № 5565332 и 5573905, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

Антитела человека также можно получать посредством активированных В-клеток *in vitro* (см. патенты США № 5567610 и 5229275, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки). Антитела человека также можно получать *in vitro* гибридными способами, такими как, но, не ограничиваясь ими, способы, описанные Roder et al. (Methods

Enzymol., 121:140-167 (1986)).

Гуманизированные антитела

Альтернативно, в определенных вариантах осуществления не принадлежащее человеку антитело может являться гуманизированным, где конкретные последовательности или области антитела модифицируют для увеличения сходства с антителом, естественным образом образуемым у человека. Например, в настоящем изобретении антитело или его фрагмент может содержать не принадлежащий человеку scFv млекопитающего. В одном из вариантов осуществления участок антигенсвязывающего домена является гуманизированным.

Гуманизированное антитело можно получать различными известными в данной области способами, включая, но, не ограничиваясь ими, пересадку CDR (см., например, патент Европы № EP 239.400; международную публикацию № WO 91/09967 и патенты США № 5225539, 5530101 и 5585089, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки), винирование или изменение поверхности (см., например, патенты Европы № EP 592.106 и EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814; и Roguska et al., 1994, *PNAS*, 91:969-973, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки), перестановку цепей (см., например, патент США № 5565332, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки) и способы, описанные, например, в публикации патентной заявки США № US2005/0042664, публикации патентной заявки США № US2005/0048617, патент США № 6407213, патент США № 5766886, международной публикации № WO 9317105, Tan et al., *J. Immunol.*, 169:1119-25 (2002), Caldas et al., *Protein Eng.*, 13(5):353-60 (2000), Morea et al., *Methods*, 20(3):267-79 (2000), Baca et al., *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84 (1997), Roguska et al., *Protein Eng.*, 9(10):895-904 (1996), Couto et al., *Cancer Res.*, 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., *Cancer Res.*, 55(8):1717-22 (1995), Sandhu J S, *Gene*, 150(2):409-10 (1994) и Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73 (1994), каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Как правило, каркасные остатки в каркасных

областях заменяют соответствующим остатком из CDR донорного антитела для изменения, предпочтительно улучшения, связывания антигена. Такие замены каркаса идентифицируют хорошо известными в данной области способами, например, моделированием взаимодействий CDR и каркасных остатков для идентификации каркасных остатков, важных для связывания антигена, и сравнением последовательностей для идентификации необычных каркасных остатков в конкретных положениях. (См., например, Queen et al. патент США № 5585089 и Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323, которые полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.)

Гуманизированное антитело содержит один или более аминокислотных остатков, вводимых в него, из источника, который не принадлежит человеку. Такие не принадлежащие человеку аминокислотные остатки, как правило, обозначают как "импортируемые" остатки, которые, как правило, берут из "импортируемого" переменного домена. Таким образом, гуманизированные антитела содержат одну или более CDR из не принадлежащих человеку молекул иммуноглобулина и каркасные области от человека. Гуманизация антител хорошо известна в данной области, и ее можно по существу проводить способом Winter и соавторов (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)) заменой CDR грызунов или последовательностей CDR соответствующими последовательностями антитела человека, т.е. пересадкой CDR (EP 239.400; публикация PCT № WO 91/09967 и патенты США № 4816567, 6331415, 5225539, 5530101, 5585089, 6548640, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки). В таких гуманизированных химерных антителах по существу меньше чем интактный переменный домен человека заменяли соответствующей последовательностью от не являющихся человеком видов. На практике гуманизированные антитела, как правило, представляют собой антитела человека, в которых такие остатки CDR и возможно некоторые остатки каркаса (FR) заменяли остатками из аналогичных участков в антителах грызунов. Гуманизацию антител также можно

проводить винирование или изменением поверхности (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7(6):805-814 (1994) и Roguska et al., *PNAS*, 91:969-973 (1994)) или перестановкой цепей (патент США № 5565332), содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Выбор переменных доменов человека, как легкой так и тяжелой цепи, которые необходимо использовать для получения гуманизированных антител, сводится к снижению антигенности. В соответствии с так называемым способом "максимального соответствия" последовательность переменного домена антитела грызуна подвергают скринингу против полной библиотеки известных последовательностей переменных доменов человека. Затем последовательность человека, которая является наиболее близкой к последовательности грызуна, принимают в качестве каркаса (FR) человека для гуманизированного антитела (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987), содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки). В другом способе используют конкретный каркас, получаемый из консенсусной последовательности всех антител человека конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Такой же каркас можно использовать для нескольких различных гуманизированных антител (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993), содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки).

Антитела можно гуманизировать при сохранении высокой аффинности к антигену-мишени и других благоприятных биологических свойств. В соответствии с одним из аспектов изобретения гуманизированные антитела получают способом анализа родительских последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей родительских последовательностей и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулина являются широко распространенными и хорошо известными специалистами в данной области. Доступны компьютерные программы, которые

иллюстрируют и воспроизводят вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных кандидатных последовательностей иммуноглобулинов. Изучение этих воспроизведений позволяет проводить анализ наиболее вероятной роли остатков в функционировании кандидатной последовательности иммуноглобулина, т.е. анализ остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина-кандидата связывать антиген-мишень. Таким образом, можно выбирать и комбинировать остатки FR от реципиента и импортировать последовательности, таким образом, чтобы получать желаемые характеристики антитела, такие как повышенная аффинность к антигену-мишени. В основном, остатки CDR непосредственно и наиболее значительно влияют на связывание антигена.

Гуманизированное антитело сохраняет такую же антигенную специфичность как и исходное антитело. Однако определенными способами гуманизации можно увеличивать аффинность и/или специфичность связывания антитела с антигеном-мишенью, способами "направленной эволюции", как описано Wu et al., J. Mol. Biol., 294:151 (1999), содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Другие молекулы

Настоящее изобретение также относится к модифицированной Т-клетке, описываемой в настоящем описании, дополнительно содержащей костимулирующую молекулу или нуклеиновую кислоту, кодирующую костимулирующую молекулу. В одном из вариантов осуществления модифицированная Т-клетка по изобретению дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую костимулирующую молекулу, таким образом, что модифицированная Т-клетка экспрессирует костимулирующую молекулу. Нуклеиновую кислоту можно вводить в Т-клетку посредством трансдукции Т-клетки, трансфекции Т-клетки или электропорации Т-клетки. В другом варианте осуществления костимулирующая молекула выбрана из CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BB, 4-1BBL, PD1 и PD1L. В другом варианте осуществления костимулирующая молекула включает CD3 и содержит по меньшей мере две различные цепи CD3, такие как дзета-цепь CD3

и эpsilon-цепь CD3.

В другом варианте осуществления модифицированная Т-клетка дополнительно содержит Klf4, Oct3/4 и/или Sox2 или нуклеиновую кислоту, кодирующую Klf4, Oct3/4 и/или Sox2, для индукции плюрипотентности Т-клетки. Плюрипотентность Т-клетки можно индуцировать экспрессией Klf4, Oct3/4 и Sox2. Klf4, Oct3/4 и Sox2 могут экспрессироваться нуклеиновой кислотой, вирусным вектором(ами) или молекулой(ами) РНК. В одном из вариантов осуществления для индукции плюрипотентности в Т-клетку вводят вирусный вектор, кодирующий Klf4, Oct3/4 и Sox2. В другом варианте осуществления для индукции плюрипотентности в Т-клетку вводят вектор на основе вируса Сендай, где вектор на основе вируса Сендай кодирует Klf4, Oct3/4 и Sox2.

Введение нуклеиновых кислот

Способы введения нуклеиновых кислот в клетку включают физические, биологические и химические способы. Физические способы введения полинуклеотида, такого как РНК, в клетку-хозяина включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т.п. РНК можно вводить в клетки-мишени коммерчески доступными способами, которые включают электропорацию (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) или Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany). РНК также можно вводить в клетки с использованием опосредованной катионной липосомой трансфекции с использованием липофекции, с использованием инкапсуляции полимерами, с использованием опосредованной пептидами трансфекции или с использованием систем доставки на основе биолистических частиц, таких как "генные пушки" (см., например, Nishikawa et al., Hum. Gene Ther., 12(8):861-70 (2001).

Биологические способы введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяина включают использование ДНК- и РНК-векторов. Вирусные векторы и особенно ретровирусные векторы стали наиболее широко используемым способом введения генов в клетки млекопитающих, например, клетки человека. Другие вирусные

векторы можно получать из лентивируса, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т.п. См., например, патенты США № 5350674 и 5585362.

Химические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсные системы, такие как комплексы макромолекул, нанокапсулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии "масло-в-воде", мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Иллюстративная коллоидная система для применения в качестве носителя *in vitro* и *in vivo* представляет собой липосому (например, искусственную мембранную везикулу).

Пригодные для использования липиды можно получать из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидилхолин ("DMPC") можно получать от Sigma, St. Louis, MO; дицетилфосфат ("DCP") можно получать от K and K Laboratories (Plainview, NY); холестерин ("Choi") можно получать от Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин ("DMPG") и другие липиды можно получать от Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить приблизительно при -20°C . Хлороформ используют только в качестве растворителя, т.к. он легче испаряется, чем метанол. "Липосома" является общим термином, включающим различные однослойные и многослойные липидные носители, сформированные в результате образования закрытых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы можно характеризовать как содержащие везикулярные структуры с фосфолипидной бислойной мембраной и внутренней водной средой. Многослойные липосомы содержат несколько липидных слоев, разделенных водной средой. Они формируются спонтанно, когда фосфолипиды суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты претерпевают самостоятельную перегруппировку перед образованием закрытых структур и захвата воды и растворенных веществ между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991 *Glycobiology*, 5: 505-10). Однако также включают композиции, которые обладают другими структурами в растворе по сравнению с нормальной везикулярной структурой. Например, липиды могут

принимать мицеллярную структуру или существовать только в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также предусматривают комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иным образом подвергания клетки действию ингибитора по настоящему изобретению, для подтверждения присутствия нуклеиновых кислот в клетке-хозяине можно проводить ряд анализов. Такие анализы включают, например, "молекулярные биологические" анализы хорошо известные специалистам в данной области, такие как саузерн- и "нозерн"-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; "биохимические" анализы, такие как детекция наличия или отсутствия конкретного пептида, например, иммунологическими способами (ELISA и вестерн-блоттинги) или анализами, описываемыми в настоящем описании для идентификации средств, входящих в объем изобретения.

В одном из вариантов осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую Т-клеточный рецептор (TCR), обладающий аффинностью к поверхностному антигену на клетке-мишени, вводят в размноженные Т-клетки. Нуклеиновая кислота, кодирующая TCR, может являться той же самой или отдельной нуклеиновой кислотой, которая способна подавлять экспрессию эндогенного гена TCR. Нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, можно вводить в Т-клетку одновременно или последовательно с нуклеиновой кислотой, способной подавлять экспрессию эндогенного гена TCR. В одном из вариантов осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, вводят до нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию эндогенного гена TCR.

Кроме того, нуклеиновые кислоты можно вводить любыми способами, такими как трансдукция размноженных Т-клеток, трансфекция размноженных Т-клеток и электропорация размноженных Т-клеток. Одну нуклеиновую кислоту можно вводить одним способом, а другую нуклеиновую кислоту можно вводить в Т-клетки другим способом.

РНК

В одном из вариантов осуществления нуклеиновые кислоты, вводимые в Т-клетку, представляют собой РНК. В другом варианте

осуществления РНК представляет собой иРНК, которая содержит *in vitro* транскрибируемую РНК или синтетическую РНК. РНК образуется в результате транскрипции *in vitro* с использованием матрицы, образуемой полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Представляющую интерес ДНК из любого источника можно непосредственно преобразовывать ПЦР в матрицу для синтеза иРНК *in vitro* с использованием подходящих праймеров и РНК-полимеразы. Источником ДНК может являться, например, последовательность геномной ДНК, плазмидной ДНК, фаговой ДНК, кДНК, синтетической ДНК или любой другой подходящий источник ДНК. Желательной матрицей для транскрипции *in vitro* является химерный мембранный белок. В качестве примера, матрица кодирует антитело, фрагмент антитела или часть антитела. В качестве другого примера, матрица содержит внеклеточный домен, содержащий одноцепочечный вариабельный домен антитела, такого как антитела против CD3, и внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. В одном из вариантов осуществления матрица для РНК химерного мембранного белка кодирует химерный мембранный белок, содержащий внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, получаемый из антитела к костимулирующей молекуле, и внутриклеточный домен, получаемый из участка внутриклеточного домена CD28 и 4-1BB.

Можно использовать ПЦР для получения матрицы для транскрипции *in vitro* иРНК, которую затем вводят в клетки. Способы проведения ПЦР хорошо известны в данной области. Праймеры для применения в ПЦР конструируют таким образом, чтобы они содержали области, которые являются по существу комплементарными областям ДНК, которые необходимо использовать в качестве матрицы для ПЦР. "По существу комплементарные", как используют в настоящем описании, относится к последовательностям нуклеотидов, где большая часть или все основания в последовательности праймера являются комплементарными, или одно или более оснований не являются комплементарными или являются несовпадающими. По существу комплементарные последовательности способны отжигаться или гибридизоваться с предполагаемой ДНК-мишенью в условиях отжига, используемых для ПЦР. Праймеры можно конструировать таким образом, чтобы они являлись по существу

комплементарными любому участку ДНК-матрицы. Например, праймеры можно конструировать для амплификации участка гена, который обычно транскрибируется в клетках (открыт рамка считывания), включая 5'- и 3'-UTR. Праймеры также можно конструировать для амплификации участка гена, кодирующего конкретный представляющий интерес домен. В одном из вариантов осуществления праймеры конструируют для амплификации кодирующей области кДНК человека, включая все или участки 5'- и 3'-UTR. Пригодные для ПЦР праймеры получают способами синтеза, которые хорошо известны в данной области. "Прямые праймеры" представляют собой праймеры, которые содержат область нуклеотидов, которые по существу являются комплементарными нуклеотидам в ДНК-матрице, которые располагаются выше последовательности ДНК, которую необходимо амплифицировать. "Выше" применяют в настоящем описании для обозначения локализации 5' к последовательности ДНК, которую необходимо амплифицировать, относительно кодирующей цепи. "Обратные праймеры" представляют собой праймеры, которые содержат область нуклеотидов, которые являются по существу комплементарными двухцепочечной ДНК-матрице, которые расположены ниже последовательности ДНК, которую необходимо амплифицировать. "Ниже" применяют в настоящем описании для обозначения локализации 3' к последовательности ДНК, которую необходимо амплифицировать, относительно кодирующей цепи.

Также можно использовать химические структуры, которые обладают способностью повышать стабильность и/или эффективность трансляции РНК. РНК предпочтительно содержит 5'- и 3'-UTR. В одном из вариантов осуществления длина 5'-UTR составляет от нуля до 3000 нуклеотидов. Длину последовательностей 5'- и 3'-UTR, которые необходимо добавлять к кодирующей области, можно изменять различными способами, включая, но, не ограничиваясь ими, конструкцию праймеров для ПЦР, которые отжигаются на различных областях UTR. С использованием такого подхода специалист в данной области может модифицировать длину 5'- и 3'-UTR, необходимую для получения оптимальной эффективности трансляции после трансфекции транскрибируемой РНК.

5'- и 3'-UTR могут представлять собой природные, эндогенные

5'- и 3'-UTR по отношению к представляющему интерес гену. Альтернативно, можно добавлять последовательности UTR, которые не являются эндогенными по отношению к представляющему интерес гену, путем введения последовательностей UTR в прямой и обратный праймеры или любыми другими модификациями матрицы. Использование последовательностей UTR, которые не являются эндогенными по отношению к представляющему интерес гену, может являться пригодным для модификации стабильности и/или эффективности трансляции РНК. Например, известно, что богатые AU элементы в последовательностях 3'-UTR могут понижать стабильность иРНК. Таким образом, можно выбирать или конструировать 3'-UTR для повышения стабильности транскрибируемой РНК на основании свойств UTR, которые хорошо известны в данной области.

В одном из вариантов осуществления 5'-UTR могут содержать последовательность Козак эндогенного гена. Альтернативно, когда 5'-UTR, которая не является эндогенной по отношению к представляющему интерес гену, добавляют посредством ПЦР, как описано выше, консенсусную последовательность Козак можно реконструировать добавлением последовательности 5'-UTR. Последовательности Козак могут повышать эффективность трансляции некоторых транскриптов РНК, но, по-видимому, не являются необходимыми для всех РНК для обеспечения эффективной трансляции. Требования к последовательностям Козак для многих иРНК известны в данной области. В других вариантах осуществления 5'-UTR можно получать из РНК-вируса, РНК-геном которого является стабильным в клетках. В других вариантах осуществления для препятствия разрушения экзонуклеазой иРНК в 3'- или 5'-UTR можно использовать различные аналоги нуклеотидов.

Для обеспечения синтеза РНК из ДНК-матрицы без необходимости клонирования гена промотор транскрипции следует прикреплять к ДНК-матрице в 3'-5'-направлении последовательности, которая должна транскрибироваться. Когда к 5'-концу прямого праймера добавляют последовательность, которая функционирует как промотор для РНК-полимеразы, промотор РНК-полимеразы становится включенным в продукт ПЦР выше открытой рамки считывания, которая должна транскрибироваться. В одном из

вариантов осуществления промотор представляет собой промотор полимеразы T7, как описано в другом месте в настоящем описании. Другие пригодные промоторы включают, но не ограничиваются ими, промоторы РНК-полимеразы T3 и SP6. Консенсусные нуклеотидные последовательности для промоторов T7, T3 и SP6 известны в данной области.

В одном из вариантов осуществления иРНК содержит кэп на 5'-конце и хвост 3'-поли(А), которые определяют связывание рибосомы, инициацию трансляции и стабильность иРНК в клетке. На кольцевой ДНК-матрице, например, плазмидной ДНК, РНК-полимераза образует длинный конкатемерный продукт, который не является подходящим для экспрессии в эукариотических клетках. Транскрипция плазмидной ДНК, линейаризованной на конце 3'-UTR, приводит к нормальному размеру иРНК, который не является эффективным при трансфекции эукариот, даже если он является полиаденилированным после транскрипции.

На линейной ДНК-матрице фаговая РНК-полимераза T7 может удлинять 3'-конец транскрипта дальше последнего основания матрицы (Schenborn and Mierendorf, Nuc. Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003)).

Общепринятым способом интеграции фрагментов полиА/Т в ДНК-матрицу является молекулярное клонирование. Однако последовательность полиА/Т, интегрированная в плазмидную ДНК, может вызывать нестабильность плазмиды, и поэтому матрицы на основе плазмидной ДНК, получаемые из бактериальных клеток, часто являются сильно загрязненными делециями и другими абберациями. Это делает способы клонирования не только трудоемкими и времязатратными, но часто и ненадежными. Именно по этому очень желательным является способ, который позволяет конструировать ДНК-матрицы с 3-фрагментами полиА/Т без клонирования.

Сегмент полиА/Т транскрипционной ДНК-матрицы можно получать в ходе ПЦР путем использования обратного праймера, содержащего хвост полиТ, такой как хвост 100Т (размер может составлять 50-5000 Т) или после ПЦР любым другим способом, включая, но, не ограничиваясь ими, лигирование ДНК или рекомбинацию *in vitro*.

Хвосты поли(А) также обеспечивают стабильность РНК и снижают степень ее разрушения. Как правило, длина хвоста поли(А) положительно коррелирует со стабильностью транскрибируемой РНК. В одном из вариантов осуществления хвост поли(А) составляет от 100 до 5000 аденозинов.

Хвосты поли(А) РНК можно дополнительно удлинять после транскрипции *in vitro* с использованием поли(А)-полимеразы, такой как полиА-полимераза *E. coli* (Е-РАР). В одном из вариантов осуществления увеличение длины хвоста поли(А) от 100 нуклеотидов до от 300 до 400 нуклеотидов приводит приблизительно к двукратному увеличению эффективности трансляции РНК. Кроме того, присоединение различных химических групп к 3'-концу может повышать стабильность иРНК. Такое присоединение может содержать модифицированные/искусственные нуклеотиды, аптамеры и другие соединения. Например, аналоги АТФ можно вводить в хвост поли(А) с использованием поли(А)-полимеразы. Аналоги АТФ могут дополнительно повышать стабильность РНК.

5'-кэпы также придают стабильность молекулам РНК. В предпочтительном варианте осуществления РНК, получаемая способами, описываемыми в настоящем описании, содержит 5'-кэп. 5'-кэп обеспечивают с применением способов известных в данной области и описываемых в настоящем описании (Cougot et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

РНК, получаемая способами, описываемыми в настоящем описании, также может содержать последовательность внутреннего участка связывания рибосомы (IRES). Последовательность IRES может представлять собой любую вирусную, хромосомную или искусственно конструируемую последовательность, которая инициирует независимое от кэп связывание рибосомы с иРНК и облегчает инициацию трансляции. Можно вводить любые растворенные вещества, подходящие для электропорации клетки, которые могут содержать факторы, облегчающие клеточную проницаемость и жизнеспособность, такие как сахара, пептиды, липиды, белки, антиоксиданты и поверхностно-активные вещества.

Трансфекция РНК

В определенных вариантах осуществления РНК, кодирующую TCR, электропорируют в клетки. В одном из вариантов осуществления РНК, кодирующая TCR, представляет собой транскрибируемую *in vitro* РНК.

Описываемые способы можно применять для модуляции активности Т-клетки в фундаментальных исследованиях и терапии в области злокачественной опухоли, стволовых клеток, острых и хронических инфекций и аутоиммунных заболеваний, включая оценку способности генетически модифицированной Т-клетки уничтожать злокачественную клетку-мишень.

Способы также обеспечивают возможность регулировать уровень экспрессии в широком диапазоне путем изменения, например, промотора или количества вводимой РНК, что позволяет индивидуально регулировать уровень экспрессии. Кроме того, способ продукции иРНК на основе ПЦР значительно облегчает конструкцию иРНК с различными структурами и комбинацией их доменов.

Одно из преимуществ способов трансфекции РНК по изобретению заключается в том, что трансфекция РНК является по существу временной и не предусматривает вектор. Трансген РНК можно доставлять в лимфоцит и экспрессировать в нем после короткой активации клетки *in vitro*, в виде минимальной экспрессирующей кассеты без необходимости каких-либо дополнительных последовательностей вируса. В этих условиях интеграция трансгена в геном клетки-хозяина является мало вероятной. Клонирование клеток не является обязательным вследствие эффективности трансфекции РНК и ее способности равномерно модифицировать всю популяцию лимфоцитов.

В генетической модификации Т-клеток транскрибируемой *in vitro* РНК (IVT-РНК) используют две различные стратегии, которые последовательно тестировали на различных моделях на животных. Клетки трансфицируют транскрибируемой *in vitro* РНК посредством липофекции или электропорации. Желательной является стабилизация IVT-РНК с использованием различных модификаций для получения длительной экспрессии перенесенной IVT-РНК.

В литературе известны некоторые векторы IVT, которые используют стандартизированным образом в качестве матрицы для транскрипции *in vitro*, и которые генетически модифицировали, таким образом, что продуцируются стабилизированные транскрипты РНК. Существующие в настоящее время протоколы, используемые в данной области, основаны на плазмидном векторе следующей ниже структуры: промотор 5'-РНК-полимеразы, обеспечивающий транскрипцию РНК, за которым следует представляющий интерес ген, который является 3'- и/или 5'-фланкированным нетранслируемыми областями (UTR), и 3'-полиаденильная кассета, содержащая 50-70 нуклеотидов А. Перед транскрипцией *in vitro* кольцевая плазида линеаризуется ниже полиаденильной кассета ферментами рестрикции II типа (распознавание последовательности соответствует участку расщепления). Таким образом, полиаденильная кассета соответствует последней последовательности поли(А) в транскрипте. В результате этой процедуры некоторые нуклеотиды остаются в виде части участка ферментативного расщепления после линеаризации и удлиняются или маскируют последовательность поли(А) на 3'-конце. До сих пор не ясно, влияет ли такой нефизиологический липкий конец на количество белка, продуцируемого внутриклеточно из такой конструкции.

РНК обладает несколькими преимуществами по сравнению с более традиционными подходами на основе плазмид или вирусов. Для экспрессии гена из источника РНК транскрипция не требуется, и белковый продукт быстро продуцируется после трансфекции. Кроме того, вследствие того, что РНК должна получать доступ только к цитоплазме, а не к ядру, и, таким образом, характерные способы трансфекции приводят к очень высокой скорости трансфекции. Кроме того, в подходах на основе плазмиды необходимым является то, что промотор, направляющий экспрессию представляющего интерес гена являлся активным в исследуемых клетках.

В другом аспекте конструкцию РНК доставляют в клетки электропорацией. См., например, составы и методологию электропорации конструкций нуклеиновой кислоты в клетки млекопитающих, как указано в US 2004/0014645, US 2005/0052630A1, US 2005/0070841A1, US 2004/0059285A1, US 2004/0092907A1.

Различные параметры, включая напряженность электрического поля, необходимую для электропорации любого известного типа клеток, как правило, являются известными в соответствующей исследовательской литературе, а также различных патентах и заявках в данной области. См. например, патент США № 6678556, патент США № 7171264 и патент США № 7173116. Устройства для терапевтического применения электропорации являются коммерчески доступными, например, терапевтическая система для электропорации ДНК MedPulser™ (Inovio/Genetronics, San Diego, Calif.), и описаны в патентах, таких как патент США № 6567694, патент США № 6516223, патент США № 5993434, патент США № 6181964, патент США № 6241701 и патент США № 6233482; электропорацию также можно использовать для трансфекции клеток *in vitro*, как описано, например, в US20070128708A1. Электропорацию также можно использовать для доставки нуклеиновых кислот в клетки *in vitro*. Таким образом, опосредованное электропорацией введение в клетки нуклеиновых кислот, включая экспрессирующие конструкции с использованием любого из многих устройств и систем электропорации, известные специалистам в данной области, предоставляет перспективные новые средства доставки представляющий интерес РНК в клетку-мишень.

В одном из вариантов осуществления способ включает электропорацию РНК, кодирующую альфа- и бета-цепь TCR. Альфа- и бета-цепь TCR может кодироваться на одной и то же или отдельной РНК. Когда альфа и бета кодируются отдельной РНК, РНК можно электропорировать совместно.

В другом варианте осуществления способ может дополнительно включать электропорацию нуклеиновой кислоты, кодирующей костимулирующую молекулу. Костимулирующую молекулу нуклеиновой кислоты можно электропорировать совместно с РНК TCR.

Источники Т-клеток

Перед размножением от индивидуума получают источник Т-клеток. Неограничивающие примеры индивидуумов включают людей, собак, кошек, мышей, крыс и их трансгенные виды. Предпочтительно индивидуум является человеком. Т-клетки можно получать из ряда

источников, включая моноклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфоузла, ткань селезенки, пуповину и опухоли. В определенных вариантах осуществления можно использовать любое количество линий Т-клеток, доступных в данной области. В определенных вариантах осуществления Т-клетки можно получать из единицы крови, собираемой у индивидуума с использованием любого числа способов, известных специалисту в данной области, таких как разделение фиколлом. В одном из вариантов осуществления клетки из циркулирующей крови индивидуума получают аферезом или лейкоаферезом. Продукт афереза, как правило, содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядродержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. Клетки, собираемые аферезом, можно промывать для удаления фракции плазмы и помещать клетки в соответствующий буфер или среду, такую как фосфатно-солевой буфер (PBS) или промывной раствор, который не содержит кальций и может не содержать магний или может не содержать многие, если не все двухвалентные катионы для последующих этапов обработки. После промывания клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах, таких как, например, не содержащем Са, не содержащем Mg PBS. Альтернативно, нежелательные компоненты образца афереза можно удалять и непосредственно ресуспендировать клетки в средах для культивирования.

В другом варианте осуществления Т-клетки выделяют из периферической крови лизисом эритроцитов и истощением моноцитов, например, центрифугированием в градиенте PERCOLL™. Альтернативно, Т-клетки можно выделять из пуповины. В любом случае конкретную субпопуляцию Т-клеток можно дополнительно выделять способами положительной или отрицательной селекции.

Выделяемые таким образом моноклеарные клетки пуповинной крови можно обеднять в отношении клеток, экспрессирующих определенные антигены, включая, но, не ограничиваясь ими, CD34, CD8, CD14, CD19 и CD56. Истощение таких клеток можно проводить с использованием выделенного антитела, биологического образца, содержащего антитело, такого как асцит, антитела, связанного с

физической подложкой и связанного с клеткой антитела.

Обогащение популяции Т-клеток путем отрицательной селекции можно проводить с использованием комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные к клеткам, проходящим отрицательную селекцию. Предпочтительный способ представляет собой сортировку клеток и/или селекцию посредством отрицательной магнитной иммунной адгезии или проточной цитометрии, в которой используют смесь моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на клетках, проходящих отрицательную селекцию. Например, для обогащения CD4⁺-клеток посредством отрицательной селекции смесь моноклональных антител, как правило, включает антитела против CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8.

Для выделения желаемой популяции клеток путем положительной или отрицательной селекции концентрацию и поверхность клеток (например, частиц, таких как гранулы) можно изменять. В определенных вариантах осуществления желательным может являться значительно уменьшать объем, в котором гранулы и клетки смешивают друг с другом (т.е. повышать концентрацию клеток), обеспечивать максимальный контакт клеток и гранул. Например, в одном из вариантов осуществления используют концентрацию 2 миллиарда клеток/мл. В одном из вариантов осуществления используют концентрацию 1 миллиард клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления используют более 100 миллионов клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления используют концентрацию клеток of 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном варианте осуществления используют концентрацию клеток 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных вариантах осуществления можно использовать концентрации 125 или 150 миллионов клеток/мл. Использование высоких концентраций может приводить к повышенному выходу клеток, активации клеток и размножению клеток.

Т-клетки также можно замораживать после этапа промывания, для которого не требуется этап удаления моноцитов. Без желания быть связанными теорией, этап замораживание и последующий этап размораживания обеспечивают более однородный продукт в

результате удаления гранулоцитов и до некоторой степени моноцитов в популяции клеток. После этапа промывания, который удаляет плазму и тромбоциты, клетки можно суспендировать в замораживающем растворе. Несмотря на то, что многие замораживающие растворы и параметры известны в данной области и являются пригодными в этом контексте, в неограничивающем примере один из способов включает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% сывороточного альбумина человека, или другую подходящую среду для замораживания клеток. Затем клетки замораживают до -80°C при скорости 1° в минуту и хранят в газовой фазе резервуара для хранения жидкого азота. Можно использовать другие способы контролируемого замораживания, а также неконтролируемого замораживания непосредственно при -20°C или в жидком азоте.

В одном из вариантов осуществления популяция Т-клеток содержится в клетках, таких как моноклеарные клетки периферической крови, клетки пуповинной крови, очищенная популяция Т-клеток и линия Т-клеток. В другом варианте осуществления моноклеарные клетки периферической крови содержат популяцию Т-клеток. В еще одном варианте осуществления очищенные Т-клетки содержат популяцию Т-клеток.

Химерный мембранный белок

Как правило, Т-клетки размножают путем приведения в контакт с поверхностью, содержащей прикрепленное к ней средство, которое стимулирует ассоциированный с комплексом CD3/TCR сигнал, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. Настоящее изобретение относится к новому способу размножения популяции Т-клеток, включающему электропорацию Т-клеток РНК, кодирующей химерный мембранный белок, и культивирование электропорированных Т-клеток, где электропорированные Т-клетки в популяции размножаются по меньшей мере в 10 раз. Химерный мембранный белок по изобретению содержит внеклеточный и внутриклеточный домен. Внеклеточный домен содержит элемент специфического с мишенью связывания, такой как антитело. В одном из вариантов осуществления химерный мембранный

белок содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) против CD3 и внутриклеточный домен, получаемый из участка внутриклеточного домена CD28 и 4-1BB.

Экспрессия химерного мембранного белка обеспечивает взаимодействие с другими клетками в популяции, такими как клетки, которые экспрессируют CD3, для стимуляции и активации размножения электропорированных Т-клеток. Без желания придерживаться какой-либо конкретной теории, клетки, которые экспрессируют CD3, могут вступать в контакт и связываться с химерным мембранным белком, которые экспрессируется на поверхности электропорированных Т-клеток. По меньшей мере одна Т-клетка, экспрессирующая химерный мембранный белок, взаимодействует с другой клеткой, экспрессирующей CD3. Такое взаимодействие стимулирует размножение электропорированных Т-клеток.

В одном из вариантов осуществления Т-клетки размножают перед подавлением эндогенного гена. В другом варианте осуществления размножают модифицированные Т-клетки.

Внеклеточный домен

Настоящее изобретение относится к внеклеточному домену, содержащему антигенсвязывающий домен, получаемый из антитела, направленного против костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула может включать любую молекулу, которая костимулирует Т-клетки, такие как, но, не ограничиваясь ими, CD3, CD28 или их сочетание. В одном из вариантов осуществления внеклеточный домен может содержать антигенсвязывающий домен, получаемый из антитела против CD3, антитела против CD28 или их сочетания. В другом варианте осуществления внеклеточный домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) против CD3.

В другом варианте осуществления внеклеточный домен может содержать любой участок антитела, который связывается с антигеном, включая, но, не ограничиваясь ими, антигенсвязывающий домен синтетического антитела, антитела человека, гуманизированного антитела, однодоменного антитела, одноцепочечных вариабельных фрагментов и их фрагментов. В некоторых случаях предпочтительно, чтобы внеклеточный домен

получали от того же вида, для которого в конечном итоге будет использовать химерный мембранный белок. Например, для применения у людей предпочтительно, чтобы внеклеточный домен химерного мембранного белка содержал антитело человека или его фрагмент. Таким образом, в одном из вариантов осуществления участок внеклеточного домена содержит антитело человека или его фрагмент, как описано в другом месте в настоящем описании. Альтернативно, в определенных вариантах осуществления участок внеклеточного домена содержит не принадлежащее человеку антитело, которое является гуманизированным, как описано в другом месте в настоящем описании.

Внутриклеточный домен

Внутриклеточный домен или цитоплазматический домен содержит костимулирующую сигнальную область. Костимулирующая сигнальная область относится к внутриклеточному домену костимулирующей молекулы. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или их лигандов, которые являются необходимыми для эффективного ответа лимфоцитов на антиген.

Цитоплазматический домен или внутриклеточный сигнальный домен химерного мембранного белка ответственен за активацию по меньшей мере одной из эффекторных функций Т-клетки. Как правило, несмотря на то, что можно применять полный внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях необязательно использовать полную цепь. В тех случаях, когда используют усеченный участок внутриклеточного сигнального домена, такой усеченный участок можно использовать вместо интактной цепи при условии, что он преобразует эффекторный функциональный сигнал. Внутриклеточный сигнальный домен содержит любой усеченный участок внутриклеточного сигнального домена, достаточный для преобразования эффекторного функционального сигнала.

Неограничивающие примеры внутриклеточных сигнальных доменов для применения в химерном мембранном белке включают любой участок внутриклеточного домена CD28, 4-1BB, Т-клеточного рецептора (TCR), костимулирующих молекул, любое производное или вариант таких последовательностей, любую синтетическую

последовательность с такой же функциональной способностью и любое их сочетание. В одном из вариантов осуществления внутриклеточный домен содержит участок внутриклеточного домена CD28 и 4-1BB.

Другие домены химерного мембранного белка

Между внеклеточным доменом и трансмембранным доменом химерного мембранного белка или между цитоплазматическим доменом и трансмембранным доменом химерного мембранного белка можно вводить спейсерный домен, такой как олиго- или полипептид, который функционирует, связывая трансмембранный домен с внеклеточным доменом или с цитоплазматическим доменом в полипептидной цепи. Спейсерный домен может содержать до 300 аминокислот, предпочтительно от 10 до 100 аминокислот и наиболее предпочтительно от 25 до 50 аминокислот.

В определенных вариантах осуществления химерный мембранный белок дополнительно содержит трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления химерный мембранный белок дополнительно содержит шарнирный домен. В одном из вариантов осуществления РНК, кодирующая химерный мембранный белок, дополнительно содержит трансмембранный и шарнирный домен, такой как трансмембранный домен CD28 и шарнирный домен CD8-альфа.

Размножение Т-клеток

Как продемонстрировано данными, описываемыми в настоящем описании, размножение Т-клеток способами, описываемыми в настоящем описании, можно увеличивать приблизительно в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 200 раз, 300 раз, 400 раз, 500 раз, 600 раз, 700 раз, 800 раз, 900 раз, 1000 раз, 2000 раз, 3000 раз, 4000 раз, 5000 раз, 6000 раз, 7000 раз, 8000 раз, 9000 раз, 10,000 раз, 100,000 раз, 1000000 раз, 10000000 раз или более, и любое и все целые или дробные числа в этом диапазоне. В одном из вариантов осуществления Т-клетки размножаются в диапазоне приблизительно от 20 раз приблизительно до 50 раз.

После культивирования Т-клетки можно инкубировать в среде для культивирования клеток в устройстве для культивирования в течение определенного периода времени или до тех пор, пока

клетки не достигнут конfluence или высокой плотности клеток для оптимального пассажа перед переносом клеток в другое устройство для культивирования. Устройство для культивирования может представлять собой любое устройство для культивирования общепринятое для культивирования клеток *in vitro*. Перед переносом клеток в другое устройство для культивирования предпочтительно уровень конfluence составляет 70% или более. Более предпочтительно уровень конfluence составляет 90% или более. Период времени может представлять собой любое время, подходящее для культивирования клеток *in vitro*. Среду для Т-клеток можно заменять во время культивирования Т-клеток в любой момент времени. Предпочтительно среду для Т-клеток заменяют приблизительно каждые от 2 до 3 суток. Затем Т-клетки собирают из средства для культивирования, после чего Т-клетки можно использовать сразу же или криоконсервировать для хранения для использования в любой момент времени позже. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к криоконсервации размноженных Т-клеток. криоконсервированные Т-клетки размораживают перед введением нуклеиновых кислот в Т-клетку.

В другом варианте осуществления способ включает выделение Т-клеток и размножение Т-клеток. В другом варианте осуществления изобретение дополнительно включает криоконсервацию Т-клеток до размножения. В еще одном варианте осуществления криоконсервированные Т-клетки размораживают для электропорации РНК, кодирующей химерный мембранный белок.

Другой способ размножения *ex vivo* клеток описан в патенте США № 5199942 (включенном в настоящее описание посредством ссылки). Размножение, такое как описано в патенте США № 5199942, может представлять собой альтернативный вариант или дополнение к другим способам размножения, описываемым в настоящем описании. В кратком изложении, культивирование и размножение Т-клеток *ex vivo* включает добавление факторов роста клеток, таких как факторы, описанные в патенте США № 5199942, или других факторов, таких как *flt3-L*, *IL-1*, *IL-3* и лиганд *c-kit*. В одном из вариантов осуществления размножение Т-клеток включает культивирование Т-клеток с фактором, выбранным из группы,

состоящей из flt3-L, IL-1, IL-3 и лиганда c-kit.

Этап культивирования, как описано в настоящем описании, (контактирование со средствами, как описано в настоящем описании, или после электропорации) может быть очень коротким, например, менее чем 24 часа, таким как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 часа. Этап культивирования, как дополнительно описано в настоящем описании, (контактирование со средствами, как описано в настоящем описании) может быть более длинным, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более суток.

Для описания клеток в культуре используют различные термины. Культура клеток, как правило, относится к клеткам, собираемым от живого организма и выращиваемым в контролируемых условиях. Первичная культура клеток представляет собой культуру клеток, тканей или органов, получаемых непосредственно из организма и до первого субкультивирования. Клетки размножают в культуре, когда их помещают в среду для выращивания в условиях, которые облегчают рост и/или деление клеток, что приводит к большей популяции клеток. Когда клетки размножают в культуре, скорость клеточной пролиферации, как правило, измеряют по количеству времени, необходимому для удвоения числа клеток, иначе известное как время удвоения.

Каждый цикл субкультивирования обозначают как пассаж. Когда клетки субкультивируют, их обозначают как пересеянные. Конкретную популяцию клеток или линию клеток в некоторых случаях обозначают или характеризуют по количеству времени, в течение которого ее пересевали. Например, популяцию культивированных клеток, которую пересевали десять раз, может обозначаться как культура P10. Первичную культуру, т.е., первую культуру после выделения клеток из ткани, обозначают P0. После первого субкультивирования клетки описывают как вторичную культуру (P1 или пассаж 1). После второго субкультивирования клетки становятся третичной культурой (P2 или пассаж 2) и т.д. Специалистам в данной области следует понимать, что может существовать много удвоений популяции во время периода пересеивания; таким образом число удвоений популяции культуры

является больше, чем число пассажей. Размножение клеток (т.е. число удвоений популяции) во время периода между пересеваниями зависит от многих факторов, включая, но, не ограничиваясь ими, плотность посева, субстрат, среду и время между пересеваниями.

В одном из вариантов осуществления клетки можно культивировать в течение нескольких часов (приблизительно от 3 часов) приблизительно до 14 суток или любое целое число часов в этом диапазоне. Условия, подходящие для культивирования Т-клеток включают подходящую среду (например, минимальную поддерживающую среду или среду RPMI 1640 или, X-vivo 15, (Lonza)), которая может содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, эмбриональную телячью сыворотку или сыворотку человека), интерлейкин 2 (IL-2), инсулин, IFN-гамма, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF-бета и TNF- α , или любые другие добавки для роста клеток, известные специалисту в данной области. Другие добавки для роста клеток включают, но не ограничиваются ими, поверхностно-активное вещество, плазманат и восстановители, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среда может включать RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 и X-Vivo 20, Optimizer с добавляемыми аминокислотами, пируватом натрия и витаминами, без сыворотки или дополненной подходящим количеством сыворотки (или плазмы) или определенным набором гормонов, и/или количеством цитокина(ов), достаточным для роста и размножения Т-клеток. Антибиотики, например, пенициллин и стрептомицин вводят только в экспериментальные культуры, не в культуры клеток, которые необходимо вводить инфузией индивидууму. Клетки-мишени поддерживают в условиях, необходимых для поддержания роста, например, при подходящей температуре (например, 37°C) и атмосфере (например, воздух плюс 5% CO₂).

Среда, используемая для культивирования Т-клеток, может содержать средство, которое может костимулировать Т-клетки. Например, средство, которое может стимулировать CD3, представляет собой антитело против CD3, и средство, которое может стимулировать CD28, представляет собой антитело против

CD28. Это обусловлено тем, что, как продемонстрировано данными, описываемыми в настоящем описании, клетку, выделенную способами, описываемыми в настоящем описании, можно размножать приблизительно в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 200 раз, 300 раз, 400 раз, 500 раз, 600 раз, 700 раз, 800 раз, 900 раз, 1000 раз, 2000 раз, 3000 раз, 4000 раз, 5000 раз, 6000 раз, 7000 раз, 8000 раз, 9000 раз, 10000 раз, 100000 раз, 1000000 раз, 10000000 раз или более. В одном из вариантов осуществления Т-клетки размножают в диапазоне приблизительно от 20 раз приблизительно до 50 раз или более культивированием электропорированной популяции.

В одном из вариантов осуществления способ включает введение нуклеиновой кислоты, кодирующей Т-клеточный рецептор (TCR), обладающий аффинностью к поверхностному антигену на клетке-мишени, в размноженные Т-клетки и электропорацию РНК, кодирующую костимулирующую молекулу, в Т-клетки, где электропорированные Т-клетки способны экспрессировать TCR и костимулирующую молекулу.

В другом варианте осуществления способ дополнительно включает стимуляцию размноженных Т-клеток по меньшей мере с одной костимулирующей молекулой, выбранной из группы, состоящей из CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BB, 4-1BBL, PD1 и PD1L. Стимуляция может включать коэлектропорацию РНК, кодирующей костимулирующую молекулу. В таком варианте осуществления размноженные Т-клетки дополнительно электропорировать или коэлектропорировать РНК, кодирующей CD3. CD3 содержит по меньшей мере две различные цепи CD3, такие как дзета-цепь CD3 и эпсилон-цепь CD3.

В другом варианте осуществления способ размножения Т-клеток может дополнительно включать выделение размноженных Т-клеток для дальнейших применений. В еще одном варианте осуществления способ размножения может дополнительно включать последующую электропорацию размноженных Т-клеток с последующим культивированием. Последующая электропорация может включать введение нуклеиновой кислоты, кодирующей средство, такое как трансдукция размноженных Т-клеток, трансфекция размноженных Т-клеток или электропорация размноженных Т-клеток нуклеиновой

кислотой, кодирующей TCR, в популяцию размноженных Т-клеток, где средство дополнительно стимулирует Т-клетку. Средство может стимулировать Т-клетки, таким образом, как стимуляцией дальнейшего размножения, эффекторной функции или другой функции Т-клеток. В одном из вариантов осуществления средство нуклеиновую кислоту коэлектropорируют РНК химерного мембранного белка. В другом варианте осуществления средство нуклеиновую кислоту, такую как РНК TCR, электropорируют после культивирования электropорированной популяции. В дополнительном варианте осуществления средство нуклеиновую кислоту, такую как РНК TCR, электropорируют в размноженные Т-клетки, которые криоконсервировали.

Терапия

Модифицированные Т-клетки, описываемые в настоящем описании, можно вводить в композиции для терапии. Композиция может содержать фармацевтическую композицию и дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Можно вводить терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей модифицированные Т-клетки.

В одном из аспектов изобретение относится к способу стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа к клетке-мишени или ткани-мишени у индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества модифицированной Т-клетки. В этом варианте осуществления Т-клетку модифицируют, как описано в другом месте в настоящем описании. Модифицированные Т-клетки можно вводить для индукции лизиса клетки-мишени или ткань-мишени, например, где индуцированный лизис представляет собой антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

В другом аспекте изобретение относится к способу терапии на основе адоптивного переноса клеток, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей модифицированную Т-клетку, описываемую в настоящем описании, нуждающемуся в этом индивидууму для профилактики или лечения иммунного ответа, который является неблагоприятным для индивидуума.

В еще одном варианте осуществления способ лечения

заболевания или состояния, связанного с повышенным иммунитетом у индивидуума, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей модифицированную Т-клетку, описываемую в настоящем описании, нуждающемуся в этом индивидууму.

Модифицированные Т-клетки, получаемые как описано в настоящем описании, могут быть однородными и обладать функцией Т-клеток. Кроме того, модифицированные Т-клетки можно вводить животному, предпочтительно млекопитающему, даже более предпочтительно человеку для обеспечения подавления иммунного ответа, такого как иммунный ответ, распространенный при аутоиммунных заболеваниях, таких как диабет, псориаз, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, GVHD, повышение индукции толерантности аллотрансплантата, отторжение трансплантата и т.п. Кроме того, клетки по настоящему изобретению можно использовать для лечения любого состояния, при котором пониженный или иным образом ингибируемый иммунный ответ, особенно клеточно-опосредованный иммунный ответ является желательным для лечения или облегчения заболевания. В одном из аспектов изобретение относится к лечению состояния, такого как аутоиммунное заболевание у индивидуума, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей модифицированную Т-клетку, описываемую в настоящем описании.

Примеры аутоиммунного заболевания включают, но не ограничиваются ими, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД, который представляет собой вызываемое вирусом заболевание с аутоиммунным компонентом), очаговую алопецию, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную болезнь Аддисона, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS), аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру (АТР), болезнь Бехчета, кардиомиопатию, целиакия-герпетиформный дерматит; синдром хронической усталости и иммунной дисфункции (CFIDS), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIPD),

рубцующийся пемфигоид, болезнь холодových агглютининов, CREST-синдром, болезнь Крона, заболевание Дего, юношеский дерматомиозит, дискоидную волчанку, первичную криоглобулинемию смешанного типа, фибромиалгию-фибромиозит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, идиопатический легочный фиброз, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), нефропатию IgA, инсулинозависимый сахарный диабет, юношеский хронический артрит (болезнь Стилла), юношеский ревматоидный артрит, болезнь Меньера, смешанное заболевание соединительной ткани, рассеянный склероз, тяжелую миастению, пернициозную анемию, узелковый периартериит, полихондрию, полигландулярные синдромы, ревматическую полимиалгию, полимиозит и дерматомиозит, первичную агаммаглобулинемию, первичный биллиарный цирроз, псориаз, псориатический артрит, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию (прогрессирующий системный склероз (PSS), также известный как системный склероз (SS)), синдром Шегрена, синдром скованного человека, системную красную волчанку, артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, язвенный колит, увеит, витилиго и гранулематоз Вегенера.

T-клетки, получаемые как описано в настоящем описании, также можно модифицировать и использовать для лечения воспалительных нарушений. Примеры воспалительных нарушений включают, но не ограничиваются ими, хронические и острые воспалительные нарушения. Примеры воспалительных нарушений включают болезнь Альцгеймера, астму, atopическую аллергию, аллергию, атеросклероз, бронхиальную астму, экзему, гломерулонефрит, болезнь "трансплантат против хозяина", гемолитические анемии, остеоартрит, сепсис, инсульт, трансплантацию тканей и органов, васкулит, диабетическую ретинопатию и вентилятор-индуцированное повреждение легких.

В другом варианте осуществления модифицированную T-клетку, описываемую в настоящем описании, можно использовать для получения лекарственного средства для лечения иммунного ответа у нуждающегося в этом индивидуума.

Клетки по изобретению можно вводить в дозах и путями, и в моменты времени, которые следует определять в доклинических и клинических исследованиях и испытаниях. Композиции клеток можно вводить многократно в дозах в этих диапазонах. Введение клеток по изобретению можно комбинировать с другими способами, пригодными для лечения желаемого заболевания или состояния, как определяют специалисты в данной области.

Клетки по изобретению, которые следует вводить, могут являться аутологичными, аллогенными или ксеногенными по отношению к индивидууму, проходящему терапию.

Введение клеток по изобретению можно проводить любым общепринятым способом, известным специалистам в данной области. Клетки по настоящему изобретению можно вводить индивидууму посредством ингаляции аэрозоля, инъекции, приема внутрь, переливания крови, имплантации или трансплантации. Композиции, описываемые в настоящем описании, можно вводить пациенту трансартериально, подкожно, интрадермально, внутрь опухоли, внутрь узла, интрамедуллярно, внутримышечно, посредством внутривенной (в/в) инъекции или интраперитонеально. В других случаях, клетки по изобретению инъецируют непосредственно в участок воспаления у индивидуума, локальный участок заболевания у индивидуума, лимфоузел, орган, опухоль и т.п.

Клетки, описываемые в настоящем описании, также можно вводить с использованием любого числа матриц. В настоящем изобретении используют такие матрицы в новом контексте действия в качестве искусственного лимфоидного органа для поддержания, сохранения или модуляции иммунной системы, как правило, посредством модуляции Т-клеток. Таким образом, в настоящем изобретении можно использовать такие матричные композиции и составы, для которых демонстрировали пригодность в технологии культивирования тканей. Таким образом, тип матрицы, которую можно использовать в композициях, устройствах и способах по изобретению, практически не имеет ограничений и может включать как биологические, так и синтетические матрицы. В одном из конкретных примеров используют композиции и устройства, указанные в патентах США № 5980889, 5913998, 5902745, 5843069,

5787900 или 5626561, таким образом, эти патенты полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Матрицы обладают признаками, общепринято ассоциированные с биосовместимостью при введении являющемуся млекопитающим хозяину. Матрицы можно формировать из природных и/или синтетических веществ. Матрицы могут не являться биоразлагаемыми в тех случаях, когда желательно оставлять постоянные структуры или удаляемые структуры в организме животного, такие как имплантат; или могут являться биоразлагаемыми. Матрицы могут принимать форму губок, имплантатов, трубок, подушечек Telfa, волокон, пустотелых волокон, лиофилизированных компонентов, гелей, порошков, пористых композиций или наночастицы. Кроме того, матрицы можно конструировать так, чтобы обеспечивать длительное высвобождение высеваемых клеток или продуцируемого цитокина или другого активного средства. В определенных вариантах осуществления матрица по настоящему изобретению является гибкой и эластичной, и ее можно описать как полутвердый каркас, который является проницаемым для веществ, таких как неорганические соли, водные жидкости и растворенные газообразные агенты, включая кислород.

Матрицу используют в настоящем описании как пример биосовместимого вещества. Однако настоящее изобретение не ограничено матрицами и, таким образом, в тех случаях, когда появляется термин матрица или матрицы, эти термины следует читать как включающие устройства и другие вещества, которые обеспечивают удержание клеток или прохождение клеток, являются биосовместимыми и способны обеспечивать прохождение макромолекул непосредственно через вещество, т.к. вещество само по себе является полупроницаемой мембраной, или его можно использовать в сочетании с конкретным полупроницаемым веществом.

Фармацевтические композиции

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать модифицированную Т-клетку, как описано в настоящем описании, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов. Такие композиции могут содержать буферы, такие как

нейтральный забуференный солевой раствор, фосфатно-солевой буфер и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как EDTA или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно формулируют для внутривенного введения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в соответствии с заболеванием, в отношении которого необходимо проводить лечение (или профилактику). Количество и частота введения определяют по таким факторам как состояние пациента и тип и тяжесть заболевания пациента, хотя подходящие дозы можно определять путем клинических испытаний.

Когда указывают "иммунологически эффективное количество", "эффективное количество против иммунного ответа", "подавляющее иммунный ответ эффективное количество" или "терапевтическое количество", то врач можно определять точное количество композиций по настоящему изобретению, которые необходимо вводить, принимая во внимание индивидуальные различия возраста, массы, иммунного ответа и состояния пациента (индивидуума). Как правило, можно указывать, что фармацевтическую композицию, содержащую модифицированные Т-клетки, описываемые в настоящем описании, можно вводить в дозе от 10^4 до 10^9 клеток/кг масса тела, предпочтительно от 10^5 до 10^6 клеток/кг масса тела, включая все целочисленные значения в этих диапазонах. Композиции на основе Т-клеток также можно вводить много раз в этих дозах. Клетки можно вводить с использованием техник инфузии, которые являются общеизвестными в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988). Специалист в данной области медицины может легко определять оптимальную дозу и схему лечения для конкретного пациента путем мониторинга у пациента признаков заболевания и регулируя, таким образом, лечение.

В определенных вариантах осуществления желательным может являться введение активированных Т-клеток индивидууму, а затем повторный забор крови (или проведение афереза), активация Т-

клеток от него по настоящему изобретению и повторное введение инфузией пациенту этих активированных и размноженных Т-клеток. Этот процесс можно проводить много раз каждые несколько недель. В определенных вариантах осуществления Т-клетки можно активировать из заборов крови объемом от 10 мл до 400 мл. В определенных вариантах осуществления Т-клетки активируют из заборов крови объемом 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл или 100 мл. Без ограничения какой-либо теорией, использование такого протокола многократных заборов крови/многократных повторных инфузий может приводить к исключению определенных популяций Т-клеток.

В определенных вариантах настоящего изобретения клетки, размноженные и модифицированные с применением способов, описываемых в настоящем описании, или других известных в данной области способов, где Т-клетки размножают до терапевтических уровней, вводят пациенту в сочетании с (например, до, одновременно или после) любым количеством соответствующих способов лечения, включая, но, не ограничиваясь ими, лечение средствами, такими как противовирусная терапия, лечение цидофовиром и интерлейкином 2, цитарабином (также известным как ARA-C) или натализумабом для пациентов с MS или лечение эфализумабом для пациентов с псориазом, или другие виды лечения для пациентов с PML. В дополнительных вариантах осуществления Т-клетки по изобретению можно использовать в комбинации с химиотерапией, радиотерапией, иммуносупрессирующими средствами, таким как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антителами или другими иммунодеструктивными средствами, такими как CAMPATH, антитела против CD3 или другие виды терапии на основе антител, цитоксином, флударабином, циклоспорином, FK506, рапамицином, микофеноловой кислотой, стероидами, FR901228, цитокинами и облучением. Эти лекарственные средства ингибируют кальций-зависимую фосфатазу кальциневрин (циклоспорин и FK506) или ингибируют киназу p70S6, которая является важной для индуцируемой фактором роста передачи сигналов (рапамицин). (Liu et al., Cell, 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun., 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun., 5:763-773,

1993). В дополнительном варианте осуществления композиции клеток по настоящему изобретению вводят пациенту в сочетании с (например, до, одновременно или после) трансплантации костного мозга, Т-клеточной абляционной терапии с использованием химиотерапевтических средств, таких как, флударабин, дистанционная лучевая терапия (XRT), циклофосфамид или антитела, такие как OKT3 или CAMPATH. В другом варианте осуществления композиции клеток по настоящему изобретению вводят после В-клеточной абляционной терапии, такой как средства, которые взаимодействуют с CD20, например, ритуксан. Например, в одном из вариантов осуществления индивидуумы могут получать стандартное лечение высокими дозами химиотерапии с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В определенных вариантах осуществления после трансплантации индивидуумы получают инфузию размноженных иммунных клеток по настоящему изобретению. В дополнительном варианте осуществления размноженные клетки вводят до операции или после нее.

Доза указанных выше видов лечения, которую необходимо вводить пациенту изменяется в зависимости от точной природы состояния, подлежащего лечению, и реципиента лечения. Масштабирование доз для введения человеку можно проводить в соответствии с принятыми в данной области практиками. Доза CAMPATH, например, как правило, находится в диапазоне от 1 приблизительно до 100 мг для взрослого пациента, как правило, вводится каждые сутки в течение периода от 1 до 30 суток. Предпочтительная суточная доза составляет от 1 до 10 мг в сутки, хотя в некоторых случаях можно использовать более высокие дозы до 40 мг в сутки (описано в патенте США № 6120766).

Следует понимать, что способ и композиции, которые будут являться пригодными в настоящем изобретении, не являются ограниченными конкретными составами, указанными в примерах. Следующие ниже примеры сформулированы, таким образом, чтобы обеспечивать специалистам в данной области полное раскрытие сущности и описание, как получать и использовать клетки, способов размножения и культивирования и терапевтических способов по изобретению, и не предназначены для ограничения

объема того, что авторы изобретения рассматривают как свое изобретение.

В практическом осуществлении настоящего изобретения, если не указано иное, применяют общепринятые способы молекулярной биологии (включая рекомбинантные способы), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые входят в компетенцию специалиста в данной области. Такие способы полностью описаны в литературе, такой как, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", четвертый издание (Sambrook, 2012); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Culture of Animal Cells" (Freshney, 2010); "Methods in Enzymology" "Handbook Methods in Enzymology" (Weir, 1997); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Short Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 2002); "Polymerase Chain Reaction: Principles, Applications and Troubleshooting", (Babar, 2011); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 2002). Эти способы можно применять для получения полинуклеотидов и полипептидов по изобретению, и по существу их можно рассматривать при реализации и практическом осуществлении изобретения. Особенно пригодные способы конкретных вариантов осуществления обсуждают в in разделах, которые следуют ниже.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРИМЕРЫ

Изобретение дополнительно подробно описано посредством ссылки на следующие ниже экспериментальные примеры. Эти примеры предоставлены только в целях иллюстрации и не предназначены являться ограничивающими, если не указано иное. Таким образом, не следует каким-либо образом рассматривать, что изобретение является ограниченным следующими ниже примерами, а наоборот следует рассматривать, что оно включает любые и все изменения, которые станут очевидны в результате указаний, предоставленных в настоящем описании.

Без дополнительного описания, полагают, что специалист в данной области может с использованием предшествующего описания и следующих ниже иллюстративных примеров получать и использовать соединения по настоящему изобретению и применять на практике заявляемые способы. Таким образом, следующие ниже

демонстрационные примеры конкретно указывают на предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, и их не следует истолковывать как ограничивающие каким-либо образом оставшуюся часть изобретения.

Ниже описаны вещества и способы, применяемые в этих экспериментах.

Первичные лимфоциты человека. Первичные лимфоциты стимулировали микрогранулами, покрытыми стимулирующими антителами против CD3 и CD28 (Life Technologies, Grand Island, NY, Catalog), как описано (Human gene therapy, 2011, 22(12):1575-1586). Т-клетки криоконсервировали на сутки 10 в растворе 90% эмбриональной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида (DMSO) при 1×10^8 клеток/флакон.

NALM-6 приобретали от German DSMZ Cell Collection (каталожный код DSMZ: ACC 128). K562 и PC3 приобретали от American Type Culture Collection. Линию меланомы 624mel получали от Surgery Branch (NCI/NIH). Все линии клеток культивировали в соответствии с указаниями и общепринято тестировали на загрязнение микоплазмой и подтверждали как отрицательное.

Получение конструкций TCR для электропорации иРНК и трансдукция лентивирусом. 1G4 NY-ESO-1 TCR с различными мутациями (1G4 и 8F) и CAR (PSCA или CD19) синтезировали и/или амплифицировали ПЦР на основании информации секвенирования, предоставленной в соответствующих публикациях (The Journal of experimental medicine, 2005, 201(8):1243-1255; J. Immunol., 2008, 180(9):6116-6131), и субклонировали в вектор на основе pGEM.64РНК или лентивирусный векторы pTRPE.

Получение первичных Т-клеток человека. Первичные CD4 и CD8 Т-клетки человека выделяли у здоровых доноров добровольцев после лейкофереза путем отрицательной селекции с использованием наборов RosetteSep (Stem Cell Technologies, Vancouver BC, Canada). Все образцы собирали в соответствии с протоколом, одобренным экспертным советом организации Университета, и получали письменное информированное согласие от каждого донора.

Дизайн и конструкция CRISPR. ДНК Cas9 синтезировали ПЦР,

затем вводили в вектор PGEM. гРНК выбирали по GN19 с участком PAM NGG, с некоторыми выбранными из N20 с участком PAM NGG. Все гРНК содержали комплементарные последовательности, содержащие более 13 ошибочных пар оснований, с возможными исключенными участками нецелевых иРНК (таблица 1). Конструировали гРНК, как продемонстрировано на фигуре 1А, и синтезировали перекрывающейся ПЦР. Все гРНК продукты ПЦР лигировали в вектор MSGV. Транскрибируемый *in vitro* CAS9 и гРНК, направленная на константные области α -, β -цепей TCR и бета-2-микроглобина. гРНК конструируют для направленного воздействия на последовательность в экзоне 1 константной области α TCR, консенсусной последовательности общей для экзона 1 константных областей 1 и 2 β TCR, бета-2-микроглобулина или PD1. Последовательности, кодирующие гРНК, собирали с использованием перекрывающейся ПЦР и клонировали в вектор MSGV, содержащий промотор T7. Эти плазмиды линеаризовали с *EcoRI*. гРНК транскрибировали *in vitro*. Cas9иРНК транскрибировали *in vitro* с использованием набора mMACHINE T7 ULTRA (Life Technologies, Carlsbad, CA). иРНК хранили при -80°C в одноразовых флаконах, не содержащих нуклеазу. Направляющие последовательности гРНК, используемые для исследования на животных, являлись такими, как указано ниже:

TRAC-гРНК: TGTGCTAGACATGAGGTCTA, SEQ ID NO:1

TRBC-гРНК: GCAGTATCTGGAGTCATTGA, SEQ ID NO:2

B2M-гРНК: CGCGAGCACAGCTAAGGCCA, SEQ ID NO:3

PD1-гРНК: GGCGCCCTGGCCAGTCGTCT, SEQ ID NO:4

FAS-гРНК: GAGGGTCCAGATGCCCAGCA, SEQ ID NO:5

Проточная цитометрия. Следующие ниже моноклональные антитела и реагенты использовали с указанной специфичностью и соответствующими изотипическими контролями. От BD Biosciences (San Jose, CA): конъюгированное с APC антитело против CD3 (555335), FITC-антитело против CD8 (555366), PE-антитело против CD8 (555635), FITC-антитело против CD27 (555440), PE-антитело против CD107 (555801), PE-антитело против бета-2-микроглобина (551337), FITC-антитело против HLA (555552); Biolegend (San Diego, CA): FITC-антитело против CD45RO (304204), APC-антитело

против CD62L(304814), APC-антитело против CCR7(353214) и Beckman Coulter (Pasadena, CA): PE-антитело против Vb13.1 (IM2021U). Данные регистрировали на FACS Accuri (BD Biosciences, San Jose, CA) с использованием CellQuest версия 3.3 (BD Biosciences, San Jose, CA) и анализировали посредством FCS Express версия 3.00 (De Novo Software, Los Angeles, CA) или FlowJo версия 7.6.1 (Tree Star, Inc. Ashland, OR).

Размножение первичных Т-клеток. Первичные человек Т-клетки культивировали в RPMI 1640, дополненной 10% FCS, 100 Ед/мл пенициллина, 100 г/мл стрептомицина сульфата, 10 мМ Непес, и стимулировали магнитными гранулами, покрытыми антителом против CD3/антителом против CD28 в отношении клетка к грануле 1:3. Клетки подсчитывали и подпитывали каждые 2 суток, и после того как Т-клетки оказывались в состоянии покоя, как определяли по сниженной кинетике роста и размеру клеток, Т-клетки использовали для функциональных анализов или криоконсервировали.

Получение CD3-отрицательных Т-клеток. Плазмиды со суперскрученной ДНК линеаризовали SpeI и EcoRI, соответственно. гРНК транскрибировали *in vitro* посредством T7 mCscript™ Standard mRNA Production System (Cambio, C-MS100625, Cambridge, England). Все иРНК (Cas9, TCR α , TCR β и CAR) транскрибировали *in vitro* с использованием набора mMESAGE mMACHINE T7 ULTRA (Life Technologies, AM1345, Carlsbad, CA). Перед электропорацией Т-клетки стимулировали Dynabead CD3/CD28 в течение трех суток. Десять миллионов первичных Т-клеток подвергали очищению от гранул перед электропереносом 20 мкг Cas9, 10 мкг молекул гРНК в клетки с параметрами 360 В, 1 мс посредством BTX830, с последующими вторым и/или третьим электропереносом 10 мкг гРНК. Также, Т-клетки промывали три раза OPTI-MEM и ресуспендировали в OPTI-MEM (Invitrogen) в конечной концентрации $1-3 \times 10^8$ клеток/мл. Затем, 0,1 мл клеток смешивали с 10 мкг РНК IVT (или как указано) и элеткропорировали в 2 мм кювете. Десять миллионов первичных Т-клетки подвергали очищению от гранул перед электропереносом 20 мкг Cas9 и 10 мкг молекул гРНК в клетки с использованием BTX830 (Harvard Apparatus BTX) при 360 В и 1 мс;

за этим процессом следовал второй и третий электроперенос 5 мкг гРНК от 12 до 24 часов позже.

После электропорации клетки сразу же помещали в 2 мл предварительно нагретые среды для культивирования и культивировали при 37°C, 5% CO₂ или 32°C, 5% CO₂ в течение 1 суток, затем возвращались к 37°C, 5% CO₂.

Двойное разрушение TCR α и β или тройное разрушение TRAC, TRBC и B2M. Для получения Т-клеток с двойным нокаутом по TCR α и β иРНК Cas9 электропорировали совместно с двумя различными гРНК, направленными на α -цепь TCR (TRAC) и β -цепь TCR (TRBC). Т-клетки с двойным нокаутом по TCR α и β можно было очищать в 2 этапа: 1) истощение TCR-положительных клеток и клеток с одним нокаутом по α -цепи микрогранулами с антителами против CD3 после электропорации РНК α -цепи TCR 1G4, и 2) истощение клеток с одним нокаутом β -цепи TCR микрогранулами с антителами против CD3 после электропорации РНК β -цепи TCR. Для тройного разрушения TRAC, TRBC и B2M Т-клетки электропорировали иРНК Cas9 и гРНК, направленными на α - и β -цепи TCR и бета-2-микроглобулин через 3 суток после стимуляции гранулами с антителами против CD3/CD28. HLA-I-отрицательную популяцию клеток обогащали на сутки 9 и электропорировали РНК α -цепи TCR. TCR-отрицательную популяцию обогащали на сутки 10. Через пять суток эти клетки электропорировали РНК β -цепи TCR и на следующие сутки сортировали TCR-отрицательную популяцию клеток с получением универсальных Т-клеток. На сутки 18 РНК TCR или CAR электропорировали в универсальные Т-клетки с получением универсальных эффекторных клеток. На каждом этапе подтверждали экспрессию TCR и молекулы HLA-I.

Получение универсальных CART-клеток. Универсальные CART-клетки получали комбинацией трансдукции лентивирусом CD19 или PSCCAR с электропорацией РНК CRISPR/гРНК. Через 1 сутки после стимуляции гранулами с антителами против CD3/CD28 Т-клетки трансдуцировали лентивирус-CD19 или PSCCAR. Через 2 суток Cas9 и гРНК, направленные на α -, β -цепь TCR, B2M, PD1, электропорацией

переносили в Т-клетки. Через 6 суток после доставки CRISPR Т-клетки отрицательные по CD3, HLA-I, PD1 сортировали посредством истощения микрогранулами.

Обогащение CD3-отрицательных Т-клеток. Клетки, промытые буфером Auto MACS, инкубировали в течение 30 минут с микрогранулами CD3 (Miltenyi Biotec, 130-050-101, Auburn, CA) при 4°C. После двукратного промывания клетки пропускали через колонку LD (MiltenyiBiotec, 130-042-901, Auburn, CA) и собирали фракцию фильтрата для дальнейшего использования. Экспрессию CD3 CD3-отрицательных Т-клеток восстанавливали совместной электропорацией иРНК α и β 1G4TCR и размножали клетки с использованием протокола единичного быстрого размножения (Rapid Expansion Protocol) (REP), Dynabead CD3/CD28 или aAPC на основе K562.

Получение и размножение CD3-отрицательных Т-клеток. CD3-отрицательные Т-клетки характеризовались экспрессией CD3, восстановленной электропереносом экзогенной транскрибируемой *in vitro* иРНК альфа-цепи 1G4TCR и бета-цепи TCR (5 мкг для каждой цепи). Эти клетки размножали с использованием одного протокола быстрого размножения (REP). PBMC от трех различных доноров: ND052 105×10^6 , ND405 83×10^6 , ND410 136×10^6 облучали, затем смешивали друг с другом с получением в общем 324×10^6 PBMC. PBMC ресуспендировали в конечном объеме 90 мл, затем добавляли R10 до 300 мл, смешивали и разделяли на две T150 мл колбы. Добавляли ОКТ до конечной концентрации 30 нг/мл. На сутки 2 добавляли IL-2 до 50 УЕ/мл. На сутки 5 клетки подсчитывали и подпитывали каждые 2 суток, и после того как Т-клетки оказывались в состоянии покоя, как определяли по сниженной кинетике роста и размеру клеток, их использовали для функциональных анализов или криоконсервировали.

Секвенирование по Сенгеру. Уровень геномного разрушения α -цепи TCR (TRAC), β -цепи 1 TCR (TRBC1) и β -цепи 2 TCR (TRBC2) в Т-клетках определяли с использованием нуклеазного теста (Surveyor Nuclease assay) (Transgenomics, Omaha, NE). Процент разрушения мишени количественно определяли денситометрией. Праймеры для

ПЦР, используемые для амплификации локуса-мишени являлись:

TRAC прямой, 5'-TCATGTCCTAACCCCTGATCCTCTT-3' SEQ ID NO:6

TRAC обратный, 5'-TTGGACTTTTCCCAGCTGACAGA-3' SEQ ID NO:7

TRBC общий прямой, 5'-TACCAGGACCAGACAGCTCTTAGA-3' SEQ ID NO:8

TRBC общий обратный, 5'-TCTCACCTAATCTCCTCCAGGCAT-3' SEQ ID NO:9

Продукты ПЦР очищали и лигировали с вектором для клонирования ТОРО (Invitrogen), затем трансформировали *E.coli*. Один клон накалывали и секвенировали для вычисления инсерционно-делеционных мутаций.

Получение миРНК и CRISPRi для электропорации. Дуплекс РНК, направленной на константные области TCR для альфа (5'-rArGrGrArGrGrArUrUrCrGrGrArArCrCrCrArArUrCrArCrUrGrArC-3' SEQ ID NO:10 и 5'-rCrArGrUrGrArUrUrGrGrGrUrUrCrCrGrArArUrCrCrUrCCT-3' SEQ ID NO:11) или бета (5'-rArCrCrUrCrCrUrUrCrCrCrArUrUrCrArCrCrCrArCrCrArGrCrUrC-3' SEQ ID NO:12 и 5'-rGrCrUrGrGrUrGrGrGrUrGrArArUrGrGrGrArArGrGrArGGT-3' SEQ ID NO:13), конструировали с использованием Custom RNAi Design Tool (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) и синтезировали миРНК (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). миРНК для TCR альфа и бета смешивали и электропорировали в стимулированные Т-клетки для нокдауна эндогенного TCR.

Транскрипция иРНК *in vitro* и электропорация Т-клеток. Для получения транскрибируемой *in vitro* РНК (IVT) использовали набор T7 mscript systems (CellScript). Стимулированные гранулами CD3/CD28 Т-клетки электропорировали РНК IVT с использованием BTX EM830 (Harvard Apparatus BTX), как описано ранее (*Cancer research.*, 2010, 70(22):9053-9061). В кратком изложении, Т-клетки промывали три раза и ресуспендировали в OPTI-MEM (Invitrogen) в конечной концентрации $1-3 \times 10^8$ клеток/мл. Затем 0,1 мл клеток смешивали с 10 мкг РНК IVT (или как указано) и электропорировали в 2 мм кювете.

Анализы ELISA. Клетки-мишени, различные линии опухолевых клеток, экспрессирующие CD19, промывали и суспендировали при

1×10^6 клеток/мл в среде R10 (RPMI 1640, дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой; Invitrogen). 100 мкл каждого типа клеток-мишеней добавляли в двух повторениях в 96-луночный круглодонный планшет (Corning). Эффекторные Т-клетки промывали и ресуспендировали при 1×10^6 клеток/мл в среде R10, а затем 100 мкл Т-клеток объединяли с клетками-мишенями в указанных лунках. Кроме того, в качестве контроля получали лунки, содержащие отдельно Т-клетки. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 18–20 часов. После инкубации супернатант собирали и подвергали анализу ELISA (eBioscience).

Окрашивание CD107a. Клетки высевали в отношении эффекторная клетка:Т-клетка 1:1 (1×10^5 эффекторов к 1×10^5 мишеней) в 160 мкл полной среды RPMI в 96-луночном планшете. Добавляли 20 мкл меченного фикоэритрином антитела против CD107a (BD Biosciences, 555801) и инкубировали планшет при 37°C в течение 1 часа перед добавлением Golgi Stop (2 мкл Golgi Stop в 3 мл среды RPMI, 20 мкл/лунку; BD Biosciences, 51-2092KZ) и инкубацией планшета еще 2,5 часа. Затем добавляли 5 мкл FITC-антитела против CD8 и 5 мкл APC-антитела против CD3 и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. После инкубации образцы промывали буфером FACS и анализировали проточной цитометрией.

Анализ CTL на основе люциферазы. Получали опухолевые клетки Nam16-CBG и применяли в модифицированном варианте анализа цитотоксических Т-лимфоцитов на основе люциферазы. В кратком изложении ген зеленой люциферазы жука-шелкуна (CBG) клонировали в вектор pELNS, паковали в лентивирус, трансдуцировали опухолевые клетки Nam16 и сортировали по экспрессии CBG. Получаемые клетки Nam16-CBG промывали и ресуспендировали при 1×10^5 клеток/мл в среде R10 и 100 мкл меченных CBG клеток инкубировали с различными отношениями Т-клеток (например, 30:1, 15:1 и т.д.) в течение ночи при 37°C. 100 мкл смеси переносили в 96-луночный белый планшет для люминометра. К клеткам добавляли 100 мкл субстрата и сразу же определяли люминесценцию. Результаты приведены в виде процента цитолиза на основании люциферазной активности в лунках с опухолевыми клетками, но не с

Т-клетками ($\% \text{ цитолиза} = 100 - ((\text{RLU от лунки с совместной культурой эффектора и клетки-мишени}) / (\text{RLU из лунки с клетками-мишенями}) \times 100) \text{)}$).

Исследования ксенотрансплантата на мышах. Исследования проводили, как описано ранее, с определенными модификациями (Human gene therapy 2011, 22(12):1575-1586; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2009, 106(9):3360-3365). В кратком изложении, мышам NOD/SCID гамма (NSG) в возрасте 6-10 недель инъецировали подкожно 1×10^6 опухолевых клеток PC3-CBG в правый бок на сутки 0, и те же мыши получали опухолевые клетки SK-OV3-CBG (5×10^6 клеток/мышь, подкожно) в левый бок на сутки 5. Мышей обрабатывали Т-клетками через хвостовую вену на сутки 23 после инокуляции опухоли PC3-CBG, таким образом, что объем обеих опухолей составлял приблизительно 200 мм^3 . Трансдуцированные лентивирусом Т-клетки вводили 1×10^7 клеток/мышь (10М) или 3×10^6 клеток/мышь (3М). В кратком изложении, для модели опухоли Nalm6 мышам NOD/SCID гамма (NSG) в возрасте от 6 до 10 недель инъецировали 1×10^6 трансдуцированные зеленым белком жука-щелкуна (CBG) клетки Nalm6 (Nalm6-CBG) через хвостовую вену на сутки 0. Обработку Т-клетками начинали на сутки 7 после инокуляции опухоли. Для модели солидной опухоли PC3-PDL1 мышам NOD/SCID гамма (NSG) в возрасте от 6 до 10 недель инъецировали подкожно 1×10^6 трансдуцированные PSCA, PD-L1 и CBG (PC3-PSCA-PDL1-CBG) опухолевые клетки PC3 в правый бок на сутки 0. Мышей обрабатывали Т-клетками через хвостовую вену на сутки 22 после инокуляции опухоли PC3-PDL1-CBG, таким образом, что объем опухолей составлял приблизительно 200 мм^3 . Т-клетки вводили при 2×10^6 клеток/мышь (2М). Животных случайным образом распределяли и разделяли по группам в зависимости от исходного размера опухоли. Всех животных включали в эксперименты, и проводили оценку опухолей в слепом режиме для всех проводимых экспериментов на животных.

Способ стимуляции Т-клеток, трансдукции лентивирусом и электропорации CRISPR. На фигуре 84 представлен способ,

используемый для стимуляции, трансдукции лентивирусом и электропорации CRISPR T-клеток. На сутки 0 получали T-клетки от 3 доноров (100×10^6 клеток/донор). Клетки стимулировали гранулами с антителами против CD3/CD28 в отношении T-клетка:гранула 1:3. Концентрацию клеток доводили до $0,5 \times 10^6$ /мл с использованием 100 мл/колба. На сутки 1 стимулированные T-клетки трансдуцировали лентивирусом CD19 CAR при множественности заражения (MOI) 2. 50 мл (25×10^6 клеток) T-клеток сохраняли как немодифицированные T-клетки (группа 9). На сутки 3 удаляли гранулы, промывали клетки 2х в среде Opti-MEM и трансдуцированные T-клетки от каждого донора разделяли на две группы, CART/в условиях имитации EP (10 мл, 50×10^6 /мл) и CART/CRISPR (10 мл, 50×10^6 /мл). Затем клетки электропорировали РНК CAS9 (1 EP) при 500 В/1 мс 120 мкг РНК CAS9/400 мкл T-клеток. Затем после электропорации клетки групп 1, 3, 5 и 7 разделяли культивированием T-клеток в половине новой среды и половине культивированной среды. На сутки 4 клетки дважды промывали и ресуспендировали в Opti-MEM при 50×10^6 /мл. 20 мкг гРНК TRBC4 и B2M электропорировали в 400 мкл T-клеток. После электропорации клетки культивировали при 1×10^6 клеток/мл в половине свежей среды и половине культивированной среды. На сутки 5 и 7 клетки разделяли и ресуспендировали в половине свежей среды и половине культивированной среды. На сутки 8 CD3+ клетки удаляли из групп 2, 4 и 6 посредством колонки низкой плотности. CD3-T-клетки ресуспендировали при $0,5-1 \times 10^6$ клеток/мл в половине свежей среды и половине культивированной среды и культивировали для размножения клеток. На сутки 11 T-клетки собирали и клеток 25×10^5 от трех доноров отправляли на кариотипирование. Оставшиеся клетки разделяли на аликвоты и замораживали.

Ниже описаны результаты экспериментов.

Пример 1: Разрушение комплекса TCR-CD3 на T-клетках с использованием CRISPR.

Тринадцать гРНК, направленных на константные области α -цепь TCR, 10 гРНК, направленных на константные области β -цепи TCR, и

10 РНК, направленных на ген бета-2-микроглобина (фигуры 1A-1C и фигуры 9A-9D) разрабатывали и тестировали в клетках 293T. Первичные Т-клетки человека выращивали *ex vivo* в течение трех суток с Dynabead с антителами против CD3/CD28 в течение трех суток. Вследствие того, что транзиторная экспрессия CRISPR является достаточной для опосредования нокаута гена, разрабатывали стратегию доставки "ударил-убежал" для транзитной экспрессии CRISPR путем использования электропереноса транскрибируемой *in vitro* РНК, кодирующей CAS9, и гРНК (фигура 2C).

Для измерения экспрессии TCR использовали mAb специфическое к CD3, который присутствует на клеточной поверхности, только когда экспрессируется антитело TCR. Через шесть суток после электропереноса анализом проточной цитометрии выявляли, что CRISPR, направленно воздействующие на TRBC, устраняли экспрессию CD3 на первичных Т-клетках на уровнях 13,7 (фигура 2D) у донора ND147. Эффективность нокаута по TCR коррелировала с количеством электропереносимой иРНК (фигура 2D). Хотя электроперенос РНК в первичных Т-клетках хорошо переносился, наблюдали незначительное снижение жизнеспособности клеток, что коррелировало с увеличением количеств вводимой РНК. Сообщали, что опосредованное ZFN и TALEN разрушение гена является более эффективным, когда клетки подвергали временному воздействию умеренной гипотермии. Аналогичное явление наблюдали с этой системой CRISPR.

После электропереноса Т-клетки культивировали в течение 1 суток при 32°C. Опосредованное CRISPR разрушение CD3 являлось в 2,5 раза выше, когда электропорированные Т-клетки культивировали при 32°C, а не при 37°C. С использованием этого подхода 5,43% и 16,7% электропорированных Т-клеток утрачивали экспрессию CD3 с использованием CRISPR, направленно воздействующих на TRAC и TRBC, соответственно (фигура 2D, нижняя панель). Не наблюдали изменений уровней CD3-негативных клеток в образцах с имитацией CAS9 и заметных снижений жизнеспособности (как измеряют по трипановому синему).

Когда гРНК электропереносили во второй и третий раз,

эффективность устранения экспрессии CD3 на первичных Т-клетках на уровнях являлась значительно выше.

- Направленное воздействие на TRAC: на уровнях, достигающих 77% после третьего раза электропереноса гРНК (фигура 4А),

- Направленное воздействие на TRAC или TRBC на уровнях, достигающих 64,5% или 57,5%, соответственно, после второго электропереноса гРНК с незначительным снижением жизнеспособности (фигура 4С).

Для подтверждения того, что электропорированные Т-клетки генетически модифицировали в предполагаемых участках-мишенях гРНК (α - или β -локусы TCR), проводили секвенирование по Сенгеру с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих участки-мишени в TRAC, TRBC1 или TRBC2. Множественные пики в указанных продуктах ПЦР, начиная от участков-мишеней, присутствовали только после электропереноса CRISPR, и процент разрушения коррелировал с утратой экспрессии CD3 на поверхности клеток (фигура 1С и 3В). Эти эксперименты в первичных Т-клетках подтверждали, что CRISPR, сконструированные для направленного воздействия на TRAC или TRBC, приводили к постоянному разрушению экспрессии TCR $\alpha\beta$, как оценивали секвенированием по Сенгеру и подтверждали анализом проточной цитометрии CD3.

Пример 2: Обогащение TCR $\alpha\beta$ -отрицательных Т-клеток.

Для дальнейших кинических применений можно использовать быстрые и надежные способы выделения источников популяций с разрушенным TCR. Для начала решения этой проблемы, популяцию TCR/CD3^{neg} обогащали путем отрицательной селекции с использованием клинически одобренных парамагнитных гранул и колонки для истощения. С одним этапом истощения CD3^{neg}-популяцию увеличивали на 99% (фигура 3А). CD3^{neg}-популяцию не возможно было обогащать из нетрансфицированных контрольных клеток. Последовательные этапы истощения приводили к >99% обогащению, без смещения субпопуляций CD4 или CD8 Т-клеток (фигура 3С). Результаты секвенирования также демонстрировали, что делеции и вставки вводили в локусы альфа и бета TCR после модификации

CRISPR (фигура 3D).

Пример 3: Получение HLA-CLASS I^{neg}-Т-клеток посредством CRISPR.

Для тестирования способности CRISPR вызывать нокаут экспрессии HLA-CLASS I аллогенных Т-клеток конструировали гРНК, направленные на бета-2-микроглобин. Над локусом бета-2-микроглобина можно проводить манипуляцию посредством CRISPR в Т-клетках 293 (фигура 9A). Данные демонстрировали, что разрушение бета-2-микроглобина отменяло экспрессию HLA-CLASS I на поверхности Т-клетки (фигура 9B).

IFN-гамма значительно улучшал, приблизительно в 10 раз, целевую эффективность бета-2-микроглобина в Т-клетках (фигура 9C). Многократные электропереносы гРНК бета-2-микроглобина давали на 66% отрицательной по бета-2-микроглобину популяции (фигура 11A).

Для дальнейших клинических применений трансплантации аллотрансплантата необходимыми являются быстрые и надежные способы выделения источников популяций с нулевым HLA-CLASS I. Для начала решения этой проблемы, клетки метили PE-антителом против бета-2 микроглобина и обогащали HLA-CLASS I^{neg}-популяцию путем отрицательной селекции с использованием клинически одобренных парамагнитных микрогранул с антителом против PE и колонки для истощения. С одним этапом истощения HLA-CLASS I^{neg}-популяцию повышали до 99%. HLA-CLASS I^{neg}-популяцию невозможно было обогатить из нетрансфицированных контрольных клеток. Анализ репертуара HLA-CLASS I в обогащенных HLA-CLASS I^{neg}-Т-клетках посредством проточной цитометрии подтверждал устранение экспрессии HLA-CLASS I на клеточной поверхности (фигура 9D).

Пример 4: CD3^{neg}-Т-клетки можно выращивать различными способами.

CD3^{neg}-Т-клетки восстанавливали экспрессию CD3 после электропереноса транскрибируемой *in vitro* иРНК альфа- и бета-цепи экзогенного 1G4-TCR (5 мкг каждой). Эти клетки размножали: (1) по протоколу единичного быстрого размножения (REP), затем тестировали на активность и специфичность. PBMC получали от трех

разных доноров: ND052 105×10^6 , ND405 83×10^6 , ND410 136×10^6 . Клетки являлись после облучения, затем их смешивали друг с другом и получали в общем 324×10^6 РВМС. В 2×10^6 клеток электропереносили РНК. CD3^{neg}-Т ресуспендировали в конечном объеме 90 мл и добавляли среду R10 до общего объема 300 мл. Клетки разделяли на 2 T150 мл колбы. Добавляли ОКТ до конечной концентрации 30 нг/мл. На сутки 2 добавляли IL-2 до 50 УЕ/мл. Начиная на сутки 5 клетки подсчитывали и подпитывали каждые 2 суток, и после того как Т-клетки оказывались в состоянии покоя, как определяли по сниженной кинетике роста и размеру клеток, их использовали для функциональных анализов или криоконсервировали.

После единичного REP CD3^{neg}-Т-клетки размножали до увеличения числа в 500 раз. Эти клетки размножали: (2) стимулировали магнитными гранулами, покрытиями антителом против CD3/антителом против CD28 в отношении клетка к грануле 1:3.

После единичного REP CD3^{neg}-Т-клетки размножали до увеличения числа в 500 раз. Эти клетки размножали: (3) костимулировали облученными K562-CD19 и K562/86/64/A2 (2D11) в равной смеси в концентрации 1×10^6 /мл.

После единичного REP CD3^{neg}-Т-клетки размножали до увеличения числа в 500 раз. Эти клетки размножали: (4) кокультивировали с облученными K562-CD19 и K562/86/64/A2 (2D11) в равной смеси в концентрации 1×10^6 /мл с 30 нг/мл ОКТ

После единичного REP CD3^{neg}-Т-клетки размножали до увеличения числа в 500 раз. Эти клетки размножали: (5) кокультивировали с облученными K562-CD19 и K562/86/64/A2 (2D11) в равной смеси в концентрации 1×10^6 /мл с 1 мг/мл пептида NY-ESO.

Пример 5: Перенаправление TCR^{neg}-Т-клеток электропереносом TCR.

Для тестирования функции TCR^{neg}-Т-клеток эти клетки перенаправляли электропереносом TCR. В результате введения альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR эти клетки экспрессировали высокие уровни TCR. Экспрессия Vb13.1 являлась значительно выше в TCR^{neg}-Т-клетках после электропереноса по сравнению с контролем

CAS9 в условиях имитации (фигура 7A). Когда клетки кокультивировали с лейкозной линией клеток Nalm-6 NY-ESO, для положительных по HLA-A2 и NY-ESO клеток демонстрировали высокие уровни 107a, что указывает на повышенную активность дегрануляции (фигура 7B). Анализ цитолиза также демонстрировал высокую токсичность в отношении этой линии клеток (фигура 7C). Это указывает на то, что эти клетки являются, вероятно, более безопасными, чем традиционные клинические испытания с Т-клетками, экспрессирующими CAR и TCR, т.к. эти клетки не запускают GVHD и характеризуются меньшей побочной токсичностью по сравнению с нормальными Т-клетками с обработкой TCR.

Некоторые сообщения демонстрировали, что Т-клетки можно генетически редактировать ZFN или TALEN для устранения экспрессии эндогенного $\alpha\beta$ TCR. Способы и композиции, описываемые в настоящем описании, для селективного истощения Т-клеток, экспрессирующих нежелательный $\alpha\beta$ TCR, также включают неполный нокаут эндогенного TCR для лечения GVHD и ингибирования отрицательного влияния эндогенного TCR на функцию CAR (например, через конкуренцию за факторы транскрипции). Таким образом, разрабатывали генетический подход с использованием искусственных ZFN для постоянного разрушения последовательностей α - и β -константных областей в Т-клетках, таким образом, устраняя экспрессию TCR.

ZFN и TALEN представляют собой искусственные ферменты рестрикции, получаемые слиянием ДНК домена связывания с ДНК домена расщепления. Когда ZFN и TALEN не работают эффективно, часто трудно определить причину. Неэффективность может отражать проблему с конструкцией, с доступом к последовательности-мишени или проблемой с доставкой. Одновременно целевая эффективность ZFN, как правило, является низкой в Т-клетках, что затрудняет манипуляцию над многими генами за один раз.

Отдельные ZFN и TALEN, CRISPR/CAS-система недавно стала известной как потенциально простая и эффективная альтернатива ZFN и TALEN для введения целевых генетических изменений. В последней работе продемонстрировано, что для распознавания

мишени белком Cas9 необходимой является "затравочная" последовательность в crPНК и последовательность прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM), состоящего из консервативного динуклеотида, выше crPНК-связывающей области. Таким образом, CRISPR/CAS-систему можно перенацеливать на расщепление практически любой последовательности ДНК посредством реконструкции crPНК. Данные, описываемые в настоящем описании, демонстрируют возможность редактирования гена посредством CRISPR/CAS в клетках 293Т и первичных Т-клетках. CRISPR/CAS-система может одновременно направленно воздействовать на многие геномные локусы в результате коэкспрессии одного белка CAS9 с двумя или более гPНК, что делает эту систему однозначно подходящей для мультиплексного редактирования генов или синергической активации генов-мишеней. Введением различных гPНК совместно с CAS9 в Т-клетках можно одновременно разрушать многие гены.

Пример 6: Тройной нокаут HLA I класса и TCR α -, β -цепи посредством CRISPR.

Для работы в направлении "готовых к использованию" видов терапии аллогенными Т-клетками злокачественных новообразований и инфекционных заболеваний разрабатывали клеточную терапию путем введения инфузией Т-клеток для восстановления иммунитета против патогенов и злокачественных новообразований. Количество времени, необходимое для производства Т-клеток с желаемыми свойствами и в достаточных количествах *ex vivo* часто является несовместимым с терапевтическим окном для пациентов. Кроме того, аутологичные Т-клетки от пациентов с заболеванием на поздней стадии могут характеризоваться нарушенной функцией и являться толерантными к желаемым антигенам.

Для решения этой проблемы пациентам можно вводить инфузией аллогенными Т-клетки для избегания иммуноопосредованного отторжения, вызываемого Т-клетками хозяина, распознающими несовместимые основные или минорные антигены гистосовместимости вводимых клеток. Для расширения области применения Т-клеточной терапии и для дальнейшей трансплантации аллотрансплантатов можно

получать быстрые и надежные способы выделения источников популяций с разрушенными TCR и HLA-I класса.

ZFN и TALEN содержат ДНК-связывающий домен "цинковый палец", сконструированный так, чтобы связывать конкретную последовательность ДНК, слитую с доменом расщепления эндонуклеазы FokI. Дизайн и конструкция ZFN и TALEN являются очень сложными и времязатратными, если необходимо проводить манипуляцию над более чем одним геном, т.к. необходимо направленно воздействовать на гены по одному. С CRISPR-системой, описываемой в настоящем описании, можно получать эффективное и сокращенное по времени разрушение гена.

Для решения этой проблемы CAS9 электропереносили с тремя различными гРНК, направленными на TRAC, TRBC и бета-2-микроглобин. Клетки метили PE-антителом против бета-2-микроглобина и обогащали HLA-I класса^{neg}-популяцией посредством отрицательной селекции с использованием клинически одобренных парамагнитных микрогранул с антителом против PE и колонки для истощения. С применением одного этапа истощения HLA-I класса^{neg}-популяцию повышали до 99% (фигура 9D). Затем в клетки were повторно вводили альфа-цепь TCR и HLA-I класса^{neg} CD3^{neg}-популяцию обогащали микрогранулами (фигура 11). Через пять суток бета-цепь TCR повторно вводили в клетки и снова обогащали HLA-CLASS I^{neg} CD3^{neg}-популяцию микрогранулами. Через двое суток TCR was электропереносили в эти клетки с тройным нокаутом. Через сутки после электротрансформации клетки стимулировали Dynabead CD3/CD28. Затем на следующие сутки клетки подвергали доставки посредством лентивируса специфического к антигену TCR и размножению культуры.

Пример 7: Нокаут FAS, PD1, CTLA4, PPP2R2D посредством CRISPR.

Апоптозный путь передачи сигнала рецептор FAS/лиганд FAS (FAS/FASL) широко исследовался и хорошо охарактеризован в Т-клетках. PD1 и CTLA4 представляют собой два основных ингибирующих путей передачи сигнала в Т-клетках, которые также активно исследовали. Прямое доказательство возможного терапевтического влияния направленного воздействия на эти пути

пришло из исследований на доклинических моделях опухолей на мышах, демонстрирующих повышенный противоопухолевый иммунитет после опосредованной антителом блокады CTLA-4, PD-1 или PD-L1. Разрабатывали аналогичные антитела для применения у людей, и ранние клинические данные демонстрировали многообещающие результаты. Нокдаун Ppp2r2d может также ингибировать апоптоз Т-клеток и увеличивать пролиферацию Т-клеток, а также продукцию цитокинов. Ppp2r2d является предполагаемой мишенью для улучшения функции Т-клеток человека.

Для решения этой проблемы CAS9 и три различные гРНК, направленные на FAS, PD1, CTLA4, PPP2r2d, электропереносили в Т-клетки. Данные секвенирования по Сенгеру демонстрировали, что указанные локусы FAS, PD1, CTLA4, PPP2r2d модифицировали посредством CRISPR. FAS также заменяли GFP гомологичной рекомбинацией, запускаемой CRISPR. Данные FACS демонстрировали, что устраняли экспрессию FAS и PD1 на поверхности.

Пример 8: Получение клеток IPS с генномодифицированными и первичными Т-клетками.

Прогресс адоптивной Т-клеточной терапии злокачественной опухоли и инфекционных заболеваний был затруднен вследствие отсутствия легкодоступных и антигенспецифических Т-лимфоцитов человека. Плюрипотентные стволовые клетки могут обеспечивать неограниченный источник Т-лимфоцитов. Для решения этой проблемы в первичных клетках и Т-клетках нарушали экспрессию of FAS, PD1, CTLA4, PPP2r2d.

Для перепрограммирования первичных клеток и Т-клеток использовали вирус Сендай. Существует много способов получения iPSC, включая опосредованную вирусом трансдукцию генов и химическую индукцию. Несмотря на то, что для лентивирусных и ретровирусных векторов необходимым является встраивание в хромосомы хозяина для экспрессии перепрограммирующих генов, векторы на основе ДНК, такие как такие как векторы на основе аденовируса, аденоассоциированного вируса и плазмидные векторы, существуют эписомально и не требуют встраивания. Однако они могут быть встроены в хромосомы хозяина с определенными частотами, и перепрограммирующая эффективность является

относительно низкой. Подобным образом перепрограммирование на основе иРНК является сложным, и продемонстрировано, что оно является очень неэффективным.

В отличие от этих способов вирус Сендай не встраивается в геном хозяина или не изменяет генетическую информацию клетки-хозяина. Вирус Сендай также обладает потенциалом перепрограммирования, сравнимым с трансдукцией гена на основе лентивируса и ретровируса.

В каждую лунку в 24-луночной планшете высевали 0,1 миллиона Т-клеток дикого типа, FAS^{neg}, CD3^{neg} Т-клеток с нокаут альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR. Клетки стимулировали гранулами CD3/CD28. На сутки 3 после стимуляции гранулы удаляли, ресуспендировали клетки в 1 мл предварительно подогретой полной среды для Т-клеток, а затем инкубировали с рассчитанным объемом вируса Сендая CytoTune, содержащим полицистронный вектор для экспрессии hKlf4, hOct3/4 и hSox2 в клетках (Lifetechnologies, Carlsbad, CA). Обработываемые Т-клетки высевали в 24-луночные планшеты и центрифугировали при 2250 об./мин. в течение 90 минут при комнатной температуре. В каждую лунку добавляли дополнительный 1 мл полной среды для Т-клеток и инкубировали планшет в течение ночи при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂.

Через сутки после трансдукции вирус Сендай удаляли промыванием Т-клеток свежей полной средой и культивировали клетки в течение 2 суток. Среду наполовину заменяли каждые сутки. На сутки 3 после инфицирования клетки переносили в планшеты с фидерным слоем MEF и культивировали в среде для Т-клеток без каких-либо цитокинов. Через четверо суток после инфицирования клетки культивировали в стандартной среде hES. Среду заменяли каждые сутки. Приблизительно на сутки 7 наблюдали ES-подобные колонии. Клетки культивировали в кондиционированной среде hES с суток 15 и продолжали культуры еще дополнительно 10 суток. Колонии накалывали приблизительно через 25-30 суток после трансдукции.

Приблизительно на сутки 4 образовывались скопления клеток на фидерных клетках, что указывает на начало процесса

перепрограммирования. Во время процесса перепрограммирования в iPSC T-клетки проходили через значительные морфологические изменения. Приблизительно на сутки 12 начинали появляться большие скопления клеток со свободными краями. Приблизительно на сутки 18 T-клетки трансформировались в характерные ES-подобные колонии с хорошо определяемыми краями. Наблюдали характерную морфологию эмбриональных стволовых клеток, что указывает на то, что у FAS^{neg}, CD3^{neg} T-клеток с нокаутом альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR индуцировали плюрипотентное состояние в различных условиях перепрограммирования (фигура 17A и 18A).

FAS-отрицательные T-клетки легче поддавались перепрограммированию в iPSC с эффективностью приблизительно в 5 раз больше своих аналогов дикого типа (фигура 17B). Подобным образом, перепрограммированная CD3^{neg} T-клетка являлась приблизительно в 5 раз более эффективной по сравнению с аналогами дикого типа (фигура 18B). Сообщалось, что линии клеток с недостаточностью p53 легче перепрограммировать, т.к. апоптозный путь является пространственно-затрудненным. Нокаут FAS дополнительно индуцировал устойчивость к апоптозу. Хотя утрата экспрессии TCR делает T-клетки менее здоровыми, это указывает на то, что апоптоз играет важную роль в процессе перепрограммирования.

Пример 9: Нокаут TCR в T-клетках миРНК.

Фигура 19 представляет собой график, демонстрирующий продукцию IFN-гамма TCR NY-ESO-1 дикого типа (wt) или модифицированным NY-ESO-1 TCR со второй дисульфидной связью и де-N-гликозилированием бета-цепи (S/SD). РНК электропорировали в T-клетки с нокаутом по эндогенным T-клеточным рецепторам (TCR) миРНК. IFN-гамма детектировали посредством ELISA, затем T-клетки стимулировали HLA-A2-положительной линией клеток, активированной специфическим пептидом NY-ESO-1, p156-165, в течение 18 часов.

На фигуре 20, содержащей фигуры 20A и 20B, продемонстрирован нокаут TCR альфа посредством коэлектропорации РНК CAS9 и гРНК. Через шесть суток после электропорации клетки анализировали на экспрессию TCR по оценке CD3.

На фигуре 21 представлено секвенирование по Сенгеру.

Результаты демонстрируют множество пиков в CD3-отрицательных обогащенных Т-клетках с электропорированной иРНК и гРНК CAS9 для нокдауна TCR альфа (TRAC-5) или TCR бета (TRBC-7).

Фигура 22 представляет собой панель графиков, демонстрирующих что CD3-отрицательные Т-клетки с нокдауном эндогенного TCR бета (TRB-7) реэкспрессировали CD3 через четыре часа после электропорации РНК NY-ESO-1 TCR альфа и бета (1G4LY95 TCR). В качестве контролей использовали нормальные Т-клетки (гранулы ND424), которые являлись приблизительно на 100% CD3-положительными с 5,25% экспрессии эндогенного TCR *vb13.1*.

Фигура 23, содержащая фигуры 23А-23D, представляет собой панель графиков, демонстрирующих, что нокдаун эндогенного TCR увеличивал экспрессию трансгена и функцию электропорированных РНК TCR Т-клеток. На фигуре 23А представлена экспрессия TCR Т-клеток, электропорированных миРНК TCR (закрашенная открытая гистограмма), контрольной миРНК (точечная открытая гистограмма), и Т-клеток без какой-либо миРНК (заполненная гистограмма). На фигуре 23В продемонстрирована экспрессия трансгена (TCR *vb13.1*) TCR NY-ESO-1 дикого типа (wt) или модифицированных электропорированных РНК TCR (SD) Т-клеток миРНК TCR, контрольной миРНК или без миРНК. На фигуре 23С продемонстрировано окрашивание тетрамера NY-ESO-1 TCR NY-ESO-1 дикого типа (wt) или модифицированных TCR (SD) электропорированных РНК Т-клеток с миРНК TCR, контрольной миРНК или без миРНК. На фигуре 23D продемонстрирован специфический лизис HLA-A2/NY-ESO-1-положительной линии опухоли Т-клетками, электропорированными миРНК для нокдауна TCR, РНК NY-ESO-1 TCR дикого типа.

Фигура 24 представляет собой график, демонстрирующий флуоресценцию опухолевых клеток после инъекции Т-клеток, на модели на мышах. Десять миллионов опухолевых клеток Nalm6-CBG-ESO-GFP (жук-шелкун зеленый), которые экспрессировали NY-ESO-1 и GFP, инъектировали внутривенно мышам NOD/SCID. Через пять суток после инокуляции опухоли трансдуцированные CBR (жук-шелкун красный) и электропорированные РНК Т-клетки инъектировали, как указано, различным группам и проводили мониторинг за ростом опухоли посредством биолуминесцентной визуализации (BLI).

На фигуре 25 продемонстрирована биолюминесцентные визуализации мышей из двух групп, которых обрабатывали Т-клетками РНК CAR CD19BBZ или модифицированным TCR РНК NY-ESO-1 в различные моменты времени.

Пример 10: Универсальные CAR19 Т-клетки, получаемые комбинацией трансдукции лентивирусом и разрушением комплекса TCR-CD3 на Т-клетках с использованием CRISPR.

Как продемонстрировано на фигуре 26, первичную Т-клетка стимулировали гранулами с антителами против CD3/CD28 на сутки 0, а затем трансдуцировали ленти-CAR19. Более 70% клеток являлись CAR19-положительными, как детектировали проточной цитометрией. Вследствие того, что транзитная экспрессия CRISPR является достаточной для опосредования нокаута гена, разрабатывали стратегию доставки "ударил-убежал" для транзитной экспрессии CRISPR с использованием электропереноса транскрибируемой *in vitro* РНК, кодирующей CAS9 и РНК, направленные на константные области α -цепи TCR, β -цепи TCR и ген бета-2-микроглобулин, на сутки 3. Т-клетки культивировали в течение 24 часов при 32°C после электропереноса, затем возвращали в нормальные условия.

Для измерения экспрессия TCR использовали моноклональное антитело, специфическое к CD3. Выбирали CD3, т.к. только CD3 присутствует на клеточной поверхности, когда экспрессируются TCR. Конструкции CRISPR электропорировали в первичные Т-клетки (фигура 26). Отрицательные по одному TCR и двойные отрицательные по TCR/HLA-A клетки размножали путем подвергания воздействию презентующих CD19 клеток K562, что приводило к >100 раз большему размножению (фигура 27).

После размножения клетки оставались отрицательными по одному TCR или двойными отрицательными TCR/HLA-A, и CAR19-положительную популяцию обогащали. Экспрессия эндогенного TCR оставалась отрицательной в отрицательных по одному TCR клетках, при этом экспрессия TCR и HLA-A оставалась отрицательной в двойных отрицательных по TCR/HLA-A Т-клетках после стимулированного K562-CD19 размножения (фигура 28A). CAR19-положительные клетки обогащали посредством стимулированного

K562-CD19 размножения (фигура 28B).

Большая часть размноженных универсальных Т-клеток являлась CD45RO-положительной (фигура 29A) и сохраняла высокие уровни экспрессии CD62L (фигура 29B), средние уровни экспрессии CD28 (фигура 29A) и низкие уровни экспрессии CCR7 (фигура 29B).

Редактирование гена CRISPR не оказывало влияния на противоопухолевую активность универсальных CAR19 Т-клеток *in vitro* (фигура 30A). Истощение TCR или TCR/HLA-A оказывало минимальный эффект на экспрессию CAR19 и противоопухолевую активность (фигуры 30B и 30C). Отрицательные по одному TCR и двойные отрицательные по TCR/HLA-A CAR19T характеризовались надежной литической емкостью при стимуляции опухолевыми клетками Nalm6 (фигура 30B). Высвобождение CD107a и секреция цитокинов также демонстрировали высокую противоопухолевую активность универсальных клеток (фигура 30C). CAR19 Т-клетки с единичной абляцией TCR или двойной абляцией TCR и HLA-A обладали аналогичной кинетикой пролиферации после стимуляции экспрессирующими CD19 клетками (фигура 30D).

Для тестирования противоопухолевой активности редактируемых CRISPR/CAS9 CAR19 Т-клеток отрицательные по одному TCR, двойные отрицательные по TCR и HLA-A CAR19 Т вводили инфузией мышам NSG, несущим опухолевые клетки Nalm6. Все мыши, получавшие не подвергавшиеся манипуляции Т-клетки, и мыши, которым вводили инфузией трансдуцированные лентивирусом GFP Т-клетки дикого типа, погибали в течение 3 недель после инфузии опухолевых клеток. Наблюдали объективную регрессию опухоли для мышей, получавших CAR19 Т-клетки (фигура 6). Было обнаружено, что CRISPR/CAS9 не влияли на цитолитическую активность *in vivo* в отношении опухолей CAR19 Т-клеток, таким образом, подтверждая преимущество комбинации лентивирусного переноса гена и CRISPR/CAS9 для Т-клеточной терапии.

Полная абляция α - и β -цепей TCR и молекулы HLA-A на Т-клетках полностью отменяла неспецифический цитолиз, когда клетки стимулировали несовпадающими по HLA линиями опухолевых клеток (фигура 32A). Устранение молекул HLA-A активировало NK-клетки

после длительного периода кокультивирования (5 суток). Не наблюдали побочной активности, когда эти клетки стимулировали аллогенными PBMC цельной крови через 24 часа в анализе IFN γ Elispot. Отсутствие побочной активности подтверждает, что Т-клетки могут играть основную роль в острых иммунных ответах после обнаружения аллогенных клеток. Все результаты позволяют предположить, что Т-клетки с редактируемыми CRISPR/CAS9 α - и β -цепями TCR и молекулами HLA-A (тройные отрицательные) могут служить в качестве источника универсальных эффекторных донорских клеток.

В Т-клетки электропереносили CAS9 и различные гРНК, направленные на FAS. FASneg-клетки сортировали, а затем трансдуцировали лентивирусом с CAR19. Данные проточной цитометрии и секвенирования по Сенгеру демонстрировали, что FAS модифицировали CRISPR (фигура 33). Экспрессия гена CAR19 FAS-отрицательных Т-клеток являлась сравнимой с дикого типа. Даже после короткого периода инкубации с опухолевыми клетками Nalm6 экспрессия CD107a значительно повышалась в FAS-отрицательных CAR19 Т-клетках по сравнению с аналогичными клетками дикого типа даже после 4 часов кокультивирования.

В некоторых сообщениях показано, что даже слабые антигенные стимулы могут запускать активацию FAS, способствуя пролиферации Т-клеток (Rethi, et al, Blood, vol. 112(4):1195-1204, 2008). Следует отметить, что, FAS-отрицательные CAR19 Т-клетки размножались намного быстрее, чем CAR19 Т-клетки дикого типа, когда клетки стимулировали высокими уровнями CD19+ K562 клеток. Это позволяет предположить, что FAS/FASL запускает апоптоз вместо активации при высоких уровнях антигенных условий (фигура 34A). FAS-отрицательные CAR19 Т-клетки также характеризовались сниженными уровнями апоптоза, как измеряли окрашиванием аннексином V (фигура 34B).

Как наблюдали *in vitro*, FAS-отрицательная Т-клетка характеризовалась повышенной пролиферацией по сравнению с Т-клетки дикого типа. Аналогичные результаты пролиферации наблюдали, когда проводили анализ точного подсчета CAR19 Т-

клеток после инфузии клеток мышам, несущим Nalm6. Для FASneg CAR19 группы демонстрировали высокую противоопухолевую активность по сравнению с группой дикого типа (фигура 35B). Это отличие проиллюстрировано на графике фигуры 35C, демонстрирующей данные биолюминесценции этих двух групп. Эти данные указывают на то, что абляция FAS в CART клетках повышала их противоопухолевую активность.

CAS9 и различные гРНК, направленные на PD1, электропереносили в Т-клетки после трансдукции лентивирусом с PSCA-CAR. Клетки с нокаут PD1 подтверждали по экспрессии PD1 на поверхности после стимуляции гранулами CD3/CD28 (фигура 36). PD1-отрицательные клетки обогащали истощением микрогранул, а затем стимулировали презентирующими антиген PSCA опухолевыми клетками PC3. PSCA-CAR-положительные клетки обогащали в группе дикого типа и в группе отрицательной по PD1. После инкубации с опухолевыми клетками PC3-PSCA-PDL1 экспрессия PD1 быстро повышалась на поверхности Т-клеток PSCA-CAR дикого типа, с очень низкими уровнями экспрессии PD1, детектируемой на PD1-отрицательных PSCA-CAR Т-клетках (фигура 37). Для PD1-отрицательных PSCA-CAR Т-клеток также демонстрировали значительно повышенные и устойчивые высокие уровни экспрессии CD137 (фигура 37), маркер активации Т-клеток, что указывает на то, что блокировали ингибирующий путь передачи сигнала PD1/PDL1.

При тестировании на модели PC3-PSCA-PDL1 NSG *in vivo* детектировали значительную повышенную противоопухолевую активность в группе PD1-отрицательных PSCA-CAR Т-клеток по сравнению с группой дикого типа (фигуры 38A и 38B), что подтверждает терапевтическую ценность абляции PD1 для CART-клеточной терапии.

Для тестирования эффекта на заболевание "трансплантат против хозяина" (GVHD) конструируемых с использованием CRISPR универсальных CART-клеток мышам NSG с лейкозом Nalm6 давали высокую дозу Т-клеток. Мышей обрабатывали CART-клетками с двойным или тройным нокаутом и не демонстрировали каких-либо признаков развития GVHD. В отличие от этого, у 3 из 4 мышей из группы CD19 CART дикого типа развивалось GVHD на сутки 65, что

подтверждали гистологическим анализом различных органов (фигура 39).

В другом эксперименте клетки ресуспендировали в FBS и вводили инфузией внутривенно мышам после сублетального облучения. За клиническим GVHD проводили мониторинг от 2 до 3 раз в течение недели. Четыре из 5 мышей, получавших Т-клетки дикого типа погибали в течение исследования продолжительностью 60 суток, тогда как в обрабатываемых PBS, обрабатываемых Т-клетками с абляцией одного TCR и двойной абляцией TCR/HLA-I группах не выявляли каких-либо признаков GVHD. Мыши, получавшие Т-клетки дикого типа, теряли массу тела. Однако обрабатываемые PBS, обрабатываемыми Т-клетками с абляцией одного TCR и двойной абляцией TCR/HLA-I группы незначительно набирали массу во время исследования (фигуры 40А и 40В).

Т-клетки обрабатывали Cas9 и гРНК, направленными на CD3, B2M и PD1 или Fas, после трансдукции CD19-CAR лентивирусом. Универсальные CART-клетки с тройным нокаутом инъецировали мышам, несущим опухоли Nalm6-PDL1. Наблюдали высокую противоопухолевую активность у мышей, получавших клетки с тройным нокаутом PD1/CD3/HLA-I по сравнению с клетками с двойным нокаутом CD3/HLA-I, что дополнительно указывает на терапевтическую ценность блокирования пути передачи сигнала PD1 (фигуры 41А и 41В). Эти данные обеспечивают способ улучшения обработки универсальных CART-клеток с использованием CRISPR/Cas9.

В следствие того, что гРНК подвергаются разрушению, разрабатывали упрощенный одностадийный способ получения универсальных CART-клеток. гРНКs конститутивно экспрессировали совместно с CAR в одном лентивирусном векторе. Наивные Т-клетки трансдуцировали лентивирусом, кодирующим гРНК и CAR, через одни сутки после стимуляции Dynabead CD3/CD28. Клетки электропорировали иРНК Cas9 на сутки 3 (фигура 42). Такая система позволяла проводить манипуляцию нескольких генов с использованием одного вектора (фигура 42). Экспрессию CD3 подтверждали проточной цитометрией на сутки 6. Для Т-клеток, обрабатываемых системой однократного действия, демонстрировали постоянную абляцию гена вплоть до 90% в каждой из групп

различных иРНК Cas9 (фигура 43).

Прогресс адоптивной Т-клеточной терапии злокачественной опухоли и инфекционных заболеваний был затруднен вследствие отсутствия легкодоступных антигенспецифических Т-лимфоцитов человека. Плюрипотентные стволовые клетки могут обеспечивать неограниченный источник Т-лимфоцитов. Для решения этой проблемы в первичных клетках и Т-клетках нарушали экспрессию of FAS, PD1, CTLA4, PPP2r2d.

Для перепрограммирования первичных клеток и Т-клеток использовали вирус Сендай. Существует много способов, доступных для получения iPSC, включая опосредованную вирусом трансдукцию генов и химическую индукцию. Несмотря на то, что для лентивирусных и ретровирусных векторов необходимым является встраивание в хромосомы хозяина для экспрессии перепрограммирующих генов, векторы на основе ДНК, такие как векторы на основе аденовируса, аденоассоциированного вируса и плазмидные векторы, существуют эписомально и не требуют встраивания, однако они могут быть встроены в хромосомы хозяина с определенными частотами, и перепрограммирующая эффективность является относительно низкой. Подобным образом, перепрограммирование на основе иРНК является сложным, и было доказано, что оно является очень неэффективным.

В противоположность этому, вирус Сендай не встраивается в геном хозяина или не изменяет генетическую информацию клетки-хозяина. Вирус Сендай также обладает потенциалом перепрограммирования, сравнимым с трансдукцией гена на основе лентивируса и ретровируса.

В каждую лунку 24-луночного планшета высевали 0,1 миллиона Т-клеток дикого типа, FASneg, CD3neg Т-клетки с нокаутом альфа- и бета-цепи нокаут TCR. Клетки стимулировали гранулами CD3/CD28. На сутки 3 после стимуляции гранулы удаляли, ресуспендировали клетки в 1 мл предварительно подогретой полной среде для Т-клеток, а затем инкубировали с рассчитанным объемом вируса Сендай CytoTune, содержащим полицистронный вектор для экспрессии of hKlf4, hOct3/4 и hSox2 в клетках (Lifetechnologies, Carlsbad, CA). обрабатываемые Т-клетки высевали в 24-луночные планшеты и

центрифугировали при 2250 об./мин. в течение 90 минут при комнатной температуре. В каждую лунку добавляли дополнительный 1 мл полной среды для Т-клеток и инкубировали планшет в течение ночи при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂.

Через сутки после трансдукции вирус Сендай удаляли промыванием Т-клеток свежей полной средой и культивировали клетки в течение 2 суток. Среду наполовину заменяли каждые сутки. На сутки 3 после инфицирования клетки переносили в планшеты с фидерным слоем MEF и культивировали в среде для Т-клеток без каких-либо цитокинов. Через четверо суток после инфицирования клетки культивировали в стандартной среде hES. Среду заменяли каждые сутки. Приблизительно на сутки 7 наблюдали ES-подобные колонии. Клетки культивировали в кондиционированной среде hES с суток 15 и продолжали культуры еще дополнительно 10 суток. Колонии накалывали приблизительно через 25–30 суток после трансдукции.

Приблизительно на сутки 4 образовывались скопления клеток на фидерных клетках, что указывает на начало процесса перепрограммирования. Во время процесса перепрограммирования в iPSC Т-клетки проходили через значительные морфологические изменения. Приблизительно на сутки 12 начинали появляться большие скопления клеток со свободными краями. FAS-отрицательные Т-клетки перепрограммировали в iPSC с эффективностью приблизительно в 5 раз большей аналогов дикого типа (фигура 44B). Сообщалось, что линии клеток с недостаточностью p53 проще перепрограммировать вследствие блокировки пути апоптоза. Нокаут FAS может облегчать процесс перепрограммирования с использованием аналогичного механизма.

Наблюдали ES-подобную морфологию iPSC, перепрограммированных из CD3neg-Т-клеток с нокаутом альфа- или бета-цепи нокаут TCR (фигура 45A). Морфология оставалась постоянной после нескольких пассажей. Перепрограммирование CD3-отрицательных Т-клеток являлось приблизительно в 5 раз менее эффективным по сравнению с аналогами дикого типа (фигура 45B), что подтверждает, что нокаут по TCR может играть роль в процессе

перепрограммирования Т-клеток или влиять на жизнеспособность клеток после инфицирования вирусом Сендай. Фигура 45С представляет собой панель изображений, демонстрирующих окрашивание фосфатазой CD3-отрицательных клеток iPSC.

Наблюдали характерную морфологию эмбриональных стволовых клеток морфология, что указывает на то, что плюрипотентное состояние индуцировали в FASneg, CD3neg-Т-клетках с нокаутом альфа- и бета-цепей TCR в различных условиях перепрограммирования. Хотя утрата экспрессии TCR делает Т-клетки менее здоровыми, данные, описываемые в настоящем описании, позволяют предположить, что апоптоз играет важную роль в процессе перепрограммирования.

Также детектировали индукцию эндогенных генов плюрипотентных стволовых клеток в различных линиях Т-iPSC клеток (фигура 46). Иммуноокрашивания на экспрессию Tra-1-60 и SSEA4 дополнительно указывало на фенотип стволовых клеток Т-iPSC клеток (фигура 47А). Нокаут Fas в Т-iPSC подтверждали секвенированием по Сенгеру (фигура 47В).

Сообщалось, что dCas9 и FokI-Cas9 обладают меньшей побочной активностью. Т-клетки оценивали, на возможность их редактирования модифицированным вариантом CRISPR/dCAS9- и CRISPR/FokI-CAS9-системы (фигура 48А). Данные проточной цитометрии демонстрировали, что первичные Т-клетки редактировали CRISPR/dCAS9 и CRISPR/FokI-CAS9 (фигура 48В). Для CRISPR/dCAS9-системы нокаута гена демонстрировали повышенную специфичность по меньшей мере с одной парой гРНК, делающей событие нокаута более точным и более специфичным.

Для тестирования побочных событий CRISPR/CAS9 в Т-клетках проводили анализ Surveyor нецелевых сайтов. Для тестируемых генов не наблюдали заметного расщепления в геномных локусах (фигура 48С).

Пример 11: Мультиплексное редактирование генома.

CART клетки получали с использованием CRISPR/Cas9-системы для одновременного разрушения многих геномных локусов. CART-клетки являлись дефицитными по экспрессии эндогенного TCR и молекул HLA I класса (HLA-I), для применения в качестве

аллогенных универсальных CART-клеток. Гены α -цепи Т-клеточного рецептора (TCR), β -цепи TCR и бета-2-микроглобулина (B2M) разрушали с высокой эффективностью посредством коэлектropорации иРНК, кодирующей Cas9, с гРНК, направленными на эти гены. Универсальные TCR или CART-клетки получали комбинацией лентивирусной доставки (LV) CAR и электропорацией РНК CRISPR для разрушения эндогенных генов TCR и B2M одновременно. Кроме того, разрушение эндогенного PD1 повышало эффективность терапии на основе CAR на модели солидной опухоли.

Доставка нескольких гРНК с высокой эффективностью разрушает гены в первичных Т-клетках человека без нарушения эффекторной функции

Эффективное мультиплексное геномное редактирование является необходимым для получения универсальных Т-клеток, которые являются дефицитными по TCR, HLA и другим генам. Оптимизировали электропорация CRISPR/РНК гРНК с получением эффективного разрушения гена в Т-клетках. Сначала Cas9 и гРНК коэлектropорировали с РНК, получаемой с использованием транскрипционной системы *in vitro* (фигура 49, слева), и разрабатывали стратегию доставки "ударил-беги" для транзитной доставки иРНК Cas9 и гРНК в Т-клетки электропорацией (фигура 49, справа).

В начальном эксперименте направленное воздействие на α константную область (TRAC) или β константную область (TRBC) TCR одной электропорацией приводило к 1%-3% CD3-отрицательных (CD3^{neg}) Т-клеток, соответственно, (фигура 50А, верхние графики). Для определения, может ли временное воздействие умеренной гипотермии, обеспечивать более эффективное разрушение гена, клетки редактировали при 37°C или 32°C. Опосредованное CRISPR разрушение TRAC и TRB увеличивалось в 4 раза, когда Т-клетки культивировали в течение 24 часов при 32°C после коэлектropорация Cas9/гРНК (фигура 50А, нижние графики). Оптимальное молекулярное отношение Cas9:гРНК для максимальной эффективности разрушения составляло от 1:1 до 2:1, и эффективность разрушения гена коррелировала с количеством электропереносимой иРНК (фигура

51A).

По сравнению с иРНК гРНК более подвержены быстрому разрушению, что потенциально ограничивает целевую эффективность. Таким образом, тестировали многократные последовательные электропорации гРНК после первичной электропорации Cas9/гРНК. Наблюдали заметное увеличение частоты разрушения на уровне белка, т.к. 82,4% клеток являлись CD3^{neg} после электропорации третьей гРНК (фигура 50B). Клональное секвенирование демонстрировало, что геномная целевая эффективность достигала 89,4% после третьей электропорации гРНК (фигура 51B). Анализ Surveyor подтверждал коэффициент расщепления 81,7% и 49,3% в геномных локусах TRAC и TRBC, соответственно, после третьей электропорации гРНКs (фигура 52). Многочисленные пики в данные секвенирования по Сенгеру, фланкирующие участки-мишени TRAC и TRBC, подтверждали, что геномная рамка считывания сдвигалась ниже участков-мишеней (фигура 53A). Появление вставок или делеций (инсерционно-делеционных мутаций), вызываемых опосредованной NHEJ посредством CRISPR/Cas9 подтверждали клональным секвенированием (фигура 53B). TCR/CD3^{neg}-популяцию с разрушенным TCR обогащали до 99% (99,70±0,20%) одностадийной отрицательной селекцией CD3 (фигура 54).

Для разработки способов размножения TCR/CD3^{neg}-Т-клеток TCR/CD3^{neg}-Т-клетки коэлектропорировали HLA-A2 рестриктированной РНК 1G4 NY-ESO-1 TCR ($\alpha+\beta$) для восстановления экспрессии CD3 (фигура 55, левая панель). После способов стимуляции/размножения Т-клеток сравнивали следующие ниже параметры: 1) протокол быстрого размножения Т-клеток (REP) с использованием РВМС в качестве фидерных клеток, 2) Dynabead с антителами против CD3/CD28 (гранулы) или 3) презентирющие искусственный антиген клетки на основе K562, нагруженных ОКТ3, которые экспрессируют лиганды для CD28 и 4-1BB (K562 aAPC). TCR/CD3^{neg}-Т-клетки также электропорировали РНК CD19 CAR (фигура 55, правая панель), а затем стимулировали облученными K562 aAPC, которые экспрессировали CD19 (K562-CD19). Величины кратности размножения 751,0±217,1, 35,7±9,3, 46,3±8,5 и 57,5±5,0 получали для REP,

гранул, K562 aAPC и K562-CD19, соответственно, после однократной стимуляции в течение 10 суток (фигура 56).

Для тестирования, будет ли редактирование гена CRISPR/Cas9 влиять на фенотип и функцию Т-клеток, анализировали фенотип TCR/CD3^{neg}-Т-клеток, размноженных различными способами, и демонстрировали, что все размноженные клетки оставались CD3-отрицательными, и большая часть сохраняла высокий уровень CD27 (от 79,8% до 93,4%), соответствующий фенотипу центральной клетки памяти (фигура 57). Размноженные TCR/CD3^{neg}-Т-клетки электропорировали второй раз иРНК CD19 CAR для тестирования их противоопухолевых активностей. Экспрессия CAR на поверхности TCR/CD3^{neg}-Т-клеток являлась эквивалентной экспрессии контрольной группы (фигура 58). Когда TCR/CD3^{neg} CD19 CAR Т-клетки стимулировали лейкозными клетками CD19⁺ Nalm6, усиление экспрессии CD107a (фигура 59А), секреция цитокинов (фигура 59С) и цитолитическая активность (фигура 59В) CD19 CAR⁺ TCR/CD3^{neg}-Т-клеток являлась эквивалентной аналогичному показателю контрольных клеток дикого типа. CD19 CAR TCR/CD3^{neg}-Т-клетки вводили инфузией мышам NSG, несущим Nalm6, для тестирования их противоопухолевой активности *in vivo*. Регрессия опухоли являлась заметной с эффективностью эквивалентной эффективности 9 аналогичных CART1 клеток дикого типа (фигуры 59D и 59E). Результаты указывают на то, что редактирование CRISPR/Cas9 эндогенного TCR не оказывало отрицательного влияния на функцию первичных Т-клеток для адоптивной иммунотерапии.

Пониженная аллореактивность Т-клеток с тройным разрушением TCR α , β и B2M.

Разрушение обеих α - и β -цепей TCR является необходимым для предотвращения ассоциированной с ошибочным спариванием TCR токсичности для адоптивной иммунотерапии перенаправленными TCR Т-клетками, и B2M является незаменимым для сборки и экспрессии комплекса HLA-I. В свете этого разрабатывали тройное разрушение α - и β -цепи TCR и B2M для получения универсальных Т-клеток. Сначала тестировали способность устранять экспрессию HLA-I на Т-клетках путем разрушения B2M. Т-клетки электропорировали

направленной на B2M РНК Cas9/гРНК. Это приводило к двойной отрицательной B2M и HLA-I популяции 79,9%. HLA-I^{neg}-популяцию можно было дополнительно обогащать посредством отрицательной селекции (фигура 60).

Для получения Т-клеток с тройным нокаутом, не содержащих α - и β -цепи TCR и B2M, коэлектropopировали иРНК Cas9 с тремя различными гРНК, направленными на TRAC, TRBC и B2M. В результате двойная отрицательная по CD3 и HLA-I популяция клеток составляла 65,4% (фигура 61). После обогащения клеток с двойным и с тройным нокаутом, α - и β -цепей TCR и B2M Т-клетки с тройным нокаутом утрачивали неспецифический цитолиз линий опухолевых клеток с несовпадающим HLA (фигура 62). Не наблюдали ответа, когда эти клетки стимулировали аллогенными облученными РВМС из цельной крови в анализе IFN γ Elispot (фигура 63, левая панель). Абляция молекул HLA-I также резко снижала аллореактивность, как подтверждают кокультивированием аллогенных РВМС с облученными клетками с разрушенным B2M (фигура 63, правая панель). Указанные выше результаты позволяют предположить, что тройные-отрицательные Т-клетки, которые не содержат α - и β -цепи TCR и B2M, могут, вероятно, случить в качестве источника универсальных Т-клеток для адоптивной иммунотерапии, препятствуя отторжению иммунной системой хозяина, при этом неспособны вызывать заболевание "трансплантат против хозяина".

Улучшенная противоопухолевая активность перепрограммированных TCR Т-клеток с разрушенным эндогенным TCR.

Для Т-клеток с опосредованным CRISPR/Cas9 разрушением α - и β -цепей TCR демонстрировали повышенную трансгенную экспрессию TCR на клеточной поверхности после перенаправления с использованием NY-ESO-1 TCR (1G4). Экспрессия трансгенного TCR составляла 67,6%, 78,8% или 94,3% для одного нокаута по α - или β -цепи TCR или двойного нокаута α/β , соответственно, по сравнению с 46,8% для Т-клеток дикого типа. Улучшенная трансгенная экспрессия TCR приводила к повышенной функции Т-клетки, о чем свидетельствует повышенная антигенспецифическая экспрессия CD107a (фигура 65A) и

повышенная цитотоксичность (фигура 65B) особенно для Т-клеток с двойным нокаутом α/β .

В отдельном эксперименте Т-клетки с двойным нокаутом α/β трансфицировали отличным NY-ESO-1 TCR (8F). Относительно 1G4 TCR, для этого 8F TCR демонстрировали более высокие значимые улучшения в трансгенной экспрессии TCR (фигура 66; 60,1% для TCR/CD3^{neg} в сравнении с 44,7% (с ~5% эндогенным исходным уровнем TCR V β 8) для Т-клеток дикого типа (Cas9 в условиях имитации Т-клетки)) и функции (экспрессия CD107a на фигуре 67A и продукция цитокинов на фигуре 67B). Эти результаты подчеркивают дифференциальное влияние эндогенного TCR на трансгенную экспрессию TCR и функцию.

Универсальные CART-клетки сохраняют противоопухолевую эффективность и не вызывают GVHD.

Универсальные CD19 CART-клетки получали комбинацией трансдукции LV CD19 CAR с электропорацией РНК Cas9/гРНК (фигура 68). Клетки размножали, и оставшиеся CD3^{neg}-клетки имели высокие уровни экспрессии CD19 CAR (фигура 69). Большая часть размноженных Т-клеток являлась CD45RO-положительной и сохраняла высокий уровень экспрессии CD62L и средний уровень экспрессии CD28, соответствующий статусу центральных клеток памяти (фигура 70). Для размноженных двойных отрицательных TCR/HLA-I CD19 CART демонстрировали устойчивые противоопухолевые активности *in vitro*, такие как высвобождение CD107a (фигура 71), секреция цитокинов (фигура 72), литическая емкость (фигура 73) и пролиферация (фигура 74), которая являлись такой же высокой как в CD19 CART-клетках дикого типа.

Т-клетки вводили инфузией мышам NSG, несущим рассеянный лейкоз Nalm6. У мышей, обрабатываемых CART-клетками с разрушенным эндогенным TCR (LV-CD19 CAR TCR^{neg}) или с одновременным разрушением TCR и HLA-I (LV-CD19 CAR TCR/HLA-I^{neg}) демонстрировали регрессию опухоли, аналогичную регрессии опухоли у мышей, обрабатываемых CD19 CART-клетками дикого типа (LV-CD19 CAR) (фигуры 75A и 75B), что подтверждает, что разрушение одного TCR или совместно с B2M не оказывало влияния на

противоопухолевую активность CART-клеток.

Для тестирования эффекта GVHD сконструированных Т-клеток мышам NSG с лейкозом Nalm6 давали высокую дозу Т-клеток (20×10^6 /мышь). Как продемонстрировано на фигуре 76, у мышей, которых обрабатывали CD19 CART-клетками с одним разрушением TCR (LV-CD19 CAR TCR/CD3^{neg}) или одновременным разрушением TCR и B2M (LV-CD19 CAR TCR/HLA-I^{neg}), демонстрировали аналогичную регрессию опухоли по сравнению с регрессией опухоли CD19 CAR-Т-клетками дикого типа (LV-CD19 CAR). У мышей, которых обрабатывали CAR Т-клетками с двойным или тройным нокаутом, не развивались какие-либо признаки GVHD. В отличие от этого, у 3 из 4 мышей из группы CD19 CART дикого типа (LV-CD19 CAR) развивалась GVHD на сутки 65, которую подтверждали гистологическим анализом различных органов. Таким образом, разрушение одного TCR или совместно с HLA-I не оказывало влияния на противоопухолевую активность *in vivo* CART-клеток, при этом устраняя аллореактивность.

Доставка аденовирусом CRISPR в первичные Т-клетки.

CRISPR/Cas9-систему быстро адаптировали для целей регуляции генов и редактирования генов на модельных организмах и линиях клеток. Вирусные векторы могут являться особенно пригодными для расширения применимости CRISPR в отношении других типов клеток, включая делящиеся и покоящиеся первичные клетки. Аденовирус, а именно аденовирус второго поколения с модифицированным волокнами, кодирующий Cas9, и молекулы одной гидовой РНК (гРНК) использовали для доставки нуклеазы Cas9 в локусы PD1, Fas и TRAC (фигура 77). Опосредованная аденовирусом трансдукция CRISPR в опухолевые клетки (фигура 78) приводила к высоким показателям целевого мутагенеза приблизительно до 71% (фигуры 79А и 79В). Аденовирус, по-видимому, представляет собой ценную платформу для введения CRISPR в Т-клетки человека независимо от их покоящегося статуса. Этот подход поможет исследовать возможное применение регуляции и редактирования генов CRISPR в различных экспериментальных условиях.

Оптимизация электропорации.

Эффективность нокаута CD3 и B2M и размножение Т-клеток

оценивали после электропорации (ЕР) Cas9 и гРНК в 4 мм кюветах и 2 мм кюветах. Для стандартных условий ЕР с 2 мм кюветой (360 В/1 мс, 1-ая ЕР – 20 мкг Cas9 РНК+10 мкг гРНК/100 мкл Т-клеток, 2-ая ЕР 5 мкг гРНК/100 мкл Т-клеток) демонстрировали наиболее высокий процент нокаута CD3 и B2M, 81,8% и 88,6%, соответственно, с размножением Т-клеток приблизительно в 2,7 раз (ЕР№1) по сравнению с приблизительно 18,8 кратным размножением контрольных ЕР Т-клеток (ЕР№12). Снижение дозы гРНК dose (ЕР№2-5) существенно увеличивало размножение Т-клеток, но только незначительно влияло на эффективность нокаута CD3 и B2M. См. фигура 80. Стандартные условия ЕР с 4 мм кюветой приводили к существенному снижению эффективности нокаута CD3 и B2M (ЕР№8), что подтверждает, что условия ЕР (напряжение или/и продолжительность импульса) необходимо дополнительно оптимизировать для использования с 4 мм кюветами.

По сравнению со стандартными условиями электропорации (ЕР) в 2 мм кювете (ЕР№10–13) или 4 мм кювете. Высокую эффективность нокаута CD3/B2M наблюдали с улучшенной кратностью размножения Т-клеток (ЕР№1 и 5). См. фигуру 81.

Для дополнительной оптимизации условий ЕР для получения максимальной кратности размножения Т-клеток с эффективностью нокаута CD3/B2M более 60% тестировали различные условия ЕР и количества РНК. Результаты демонстрировали, что кратность размножения улучшалась с относительно высокой эффективностью нокаута CD3/B2M (63,5% для CD3 и 84,8% для B2M) для ЕР№4 (400 В/2 мс/120 мкг CAS9 РНК) для ЕР№1 и (500 В/1 мс/20 мкг гРНК) для ЕР№2. См. фигуру 82.

Для оптимизации условий ЕР проводили дополнительные эксперименты. Результаты демонстрируют, что по сравнению с наиболее благоприятным тестируемым условием (ЕР№1 на фигуре 82) с использованием 500 В/1 мс/120 мкг CAS9 РНК (ЕР№1) и 500 В/1 мс/20 мкг гРНК (ЕР№2) приводило к повышенной эффективности нокаута CD3/B2M и размножению Т-клеток (ЕР№3). См. фигура 83.

Крупномасштабная электропорация и размножение.

Проводили эксперименты для определения, могут ли крупномасштабные электропорации приводить к высоким показателям

эффективности нокаута и размножения. На сутки 0 использовали гранулы с антителами против CD3/CD28 для стимуляции Т-клеток, получаемых от 3 доноров (100×10^6 клеток/донор, концентрированных до $0,5 \times 10^6$ /мл). На сутки 1 стимулированные Т-клетки трансдуцировали лентивирусом CD19 CAR. 50 мл (25×10^6 клеток) Т-клеток сохраняли как немодифицированные Т-клетки (группа 9). На сутки 3 удаляли гранулы и трансдуцированные Т-клетки от каждого донора разделяли на две группы, CART/в условиях имитации ЕР (10 мл, 5×10^6) и CART/CRISPR (10 мл, 50×10^6). Затем клетки электропорировали РНК CAS9 (1-ая ЕР), и разделяли клетки групп 1, 3, 5 и 7. На сутки 4 электропорировали гРНК в Т-клетки и культивировали клетки при 1×10^6 клеток/мл. На сутки 5 и 7 клетки разделяли. На сутки 8 CD3+ клетки удаляли из группы 2, 4 и 6. На сутки 11 Т-клетки собирали и 25×10^5 клеток от трех доноров отправляли на кариотипирование.

Таблица 1: Экспериментальные группы.

Группа №	Донор	Т-клетки
1	ND391	CART/MOCK EP
2	ND391	CART/CRISPR
3	ND463	CART/MOCK EP
4	ND463	CART/CRISPR
5	ND463	UNMOD
6	ND469	CART/MOCK EP
7	ND469	CART/CRISPR

Число Т-клеток (верхняя таблица фигуры 85) и кратность размножения (нижняя таблица фигуры 85) оценивали после процедуры электропорации и культивирования. Кратность размножения Т-клеток, трансдуцированных одним CD19 CAR (один TD) или трансдуцированных CD19 CAR и редактированным CRISPR (TD/KO) представлена на левом графике фигуры 86, и кратность размножения Т-клеток на сутки 10 представлена на правом графике фигуры 86. В результате оптимизации условий электропорация и доз CAS9/гРНК наблюдали приблизительно 60–70% эффективность нокдауна CD3/B2M и приблизительно 30-кратное размножение Т-клеток через 10 суток

(на фигуре 87 представлена экспрессия CD3/B2M/CAR на сутки 10).

Через восемь суток после стимуляции гранулами CD3/CD28 и электропорации РНК CRISPR CD3-положительные Т-клетки удаляли. На фигуре 88 представлена экспрессия CD3/B2M в трех популяциях от доноров на сутки 8. На сутки 11 Т-клетки подвергали окрашиванию FACS для детекции экспрессии CD3, B2M и CAR. В качестве отрицательного контроля использовали нетрансдуцированные ND463 (NOTD). На фигуре 89 представлена экспрессия CD3 и B2M в CD19 CAR TD (трансдуцированных)/электропорированных CRISPR, CD3-истощенных Т-клетках; CD19 CAR TD/электропорированных CRISPR Т-клетках и CD19 CAR TD Т-клетках. На фигуре 90 представлена экспрессия CAR в CD19 CAR TD/электропорированных CRISPR, CD3-истощенных Т-клетках; CD19 CAR TD/электропорированных CRISPR Т-клетках и CD19 CAR TD Т-клетках. На фигуре 91 представлена экспрессия CD3/B2M/CAR на сутки 11 в CD19 CAR TD (трансдуцированных)/электропорированных CRISPR, CD3-истощенных Т-клетках; CD19 CAR TD/электропорированных CRISPR Т-клетках и CD19 CAR TD Т-клетках. На фигуре 92 обобщена экспрессия CD3/B2M/CAR в различных группах Т-клеток.

На сутки 11 различные группы Т-клеток, как указано на фигуре 93, стимулировали CD19-положительными линиями клеток, Raji или Nalm6. K562 использовали в качестве CD19-отрицательного контроля. Через 4 часа после кокультивирования детектировали усиление экспрессии CD107a в каждой из групп Т-клеток, за исключением отрицательных контролей.

На сутки 11 тестировали цитолитическую способность Т-клеток, как указано на фигуре 94, с использованием люминесцентного анализа на цитотоксические лимфоциты (CTL) после кокультивирования Т-клеток с CD19-положительными клетками-мишенями, Nalm6-CBG. Также на сутки 11 анализировали продукцию цитокинов Т-клеток посредством стимуляции групп Т-клеток клетками-мишенями Nalm6, см. фигура 95.

Т-клетки культивировали в среде, содержащей 100 Ед/мл IL-2, до 26 суток. Результаты, представленные на фигуре 96, указывают на то, что не наблюдали аномального роста Т-клеток для отредактированных CRISPR Т-клеток от трех доноров.

В качестве одного из наиболее привлекательных применений CRISPR/Cas9-системы мультиплексное редактирование генома является очень перспективным для продвижения адоптивной иммунотерапии на основе Т-клеток. Однако низкая целевая эффективность трансфекции ДНК ограничивает использование мультиплексное редактирование генома в первичных Т-клетках. Была разработана стратегия доставки "ударил-убежал" для введения CRISPR в Т-клетки посредством коэлектropорация иРНК Cas9 и гРНК. Комбинацией до трех этапов электропорации гРНК с временным воздействием умеренной гипотермии обычно получали целевую эффективность >80% на уровне белка для одного разрушения гена. Более обнадеживающее тройное разрушение гена TRAC, TRBC и B2M приводило к двойному отрицательному CD3 и HLA-I приблизительно 65% без какой-либо очистки и селекции. Результаты также демонстрируют, что обогащение до чистоты >99% Т-клеток с разрушенным геном легко получали с использованием клинически одобренных парамагнитных гранул, и что очищенные Т-клетки размножали до 500 крат за 10 суток. Размноженные Т-клетки сохраняли фенотип разрушенного гена и проявляемые признаки, соответствующие центральным Т-клеткам памяти. Разрушенные Т-клетки не вызывали GVHD, что подтверждает, что их можно использовать в качестве аллогенных CAR Т-клеток. Следует отметить, что для Т-клеток с отредактированными генами демонстрировали противоопухолевые активности *in vitro* и на моделях различных опухолей на мышах, которые являлись такими же эффективными или более эффективными по сравнению с Т-клетками без редактирования генов. Таким образом, описываемый в настоящем описании способ получения синтетических клеток можно легко переводить в современные производственные процессы в соответствии с принципами GMP.

Описываемые в настоящем описании данные демонстрируют, что CRISPR/Cas9 является мощным средством мультиплексного редактирования генома в первичных Т-клетках человека. В предшествующих сообщениях было продемонстрировано, что Т-клетки можно генетически редактировать посредством ZFN или TALEN для

устранения экспрессии эндогенных α - и β -цепей TCR для предотвращения GVHD. Вследствие сложности стратегий направленного воздействия проводить манипуляцию многих генов посредством нуклеаз "цинковый палец" (ZFN) и TAL эффекторной нуклеазы TALEN в Т-клетках, предшествующие исследования оказались неспособны предотвращать GVHD и реакцию "трансплантат против хозяина" одновременно на доклинических моделях на животных. Активацию NK-клеток также можно отменять абляцией стимулирующих NK-лигандов посредством CRISPR/Cas9 или посредством экспрессии неклассических молекул HLA I класса, таких как HLA-E, что может потенциально защищать универсальные Т-клетки от опосредованного NK-клетками отторжения.

В итоге с использованием мультиплексной технологии CRISPR можно эффективно получать универсальные CART-клетки в клинических масштабах с высокой противоопухолевой активностью и пониженной аллореактивностью. Этот подход можно вводить в современные производственные процессы в соответствии с принципами GMP, и он обладает высоким потенциалом перехода, учитывая успешный переход терапии адоптивного переноса с ZFN для ВИЧ/СПИД. Возможно, что универсальные CAR и TCR Т-клетки обеспечат альтернативные аутологичным Т-клетки. Фактически, вполне возможно, что универсальные CAR и TCR Т-клетки с отключенными молекулами контрольных точек могут являться более эффективными и обладают более широким спектром применения по сравнению с современной терапией на основе CART с использованием аутологичных Т-клеток против злокачественных опухолей и инфекционных заболеваний.

Другие варианты осуществления

Перечисление списка элементов в любом определении переменной в настоящее описание включает определения такой переменной как любой один элемент или комбинацию (или подкомбинацию) приводимых элементов. Перечисление вариантов осуществления в настоящее описание включает такой вариант осуществления как любой отдельный вариант осуществления или в комбинации с любыми другими вариантами осуществления или их

частями.

Описание каждого и любого патента, патентной заявки и публикации, цитируемой в настоящее описание, таким образом, полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Несмотря на то, что изобретение раскрыто со ссылкой на конкретные варианты осуществления, специалистам в данной области понятно, что разрабатывать другие варианты осуществления и изменения настоящего изобретения, не выходя за рамки истинной сущности и объема изобретения. Прилагаемую формулу изобретения следует истолковывать как включающую все такие варианты осуществления и эквивалентные изменения.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированная Т-клетка, содержащая: нуклеиновую кислоту, способную подавлять экспрессию эндогенного гена, выбранного из группы, состоящей из α -цепи TCR, β -цепи TCR, бета-2-микроглобулина, молекулы HLA, CTLA-4 и PD1; и нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен костимулирующей молекулы.

2. Модифицированная Т-клетка по п. 1, где нуклеиновая кислота, способная подавлять экспрессию гена, выбрана из группы, состоящей из антисмысловой РНК, антагомирной РНК, миРНК, кшРНК и CRISPR-системы.

3. Модифицированная Т-клетка по п. 2, где CRISPR-система содержит вектор pAd5/F35-CRISPR.

4. Модифицированная Т-клетка по п. 1, где антигенсвязывающий домен CAR содержит антитело, выбранное из группы, состоящей из моноклонального антитела, поликлонального антитела, синтетического антитела, антитела человека, гуманизированного антитела, однодоменного антитела, одноцепочечного вариабельного фрагмента и их антигенсвязывающих фрагментов.

5. Модифицированная Т-клетка по п. 1, где антигенсвязывающий домен CAR специфически связывается с антигеном на клетке-мишени.

6. Модифицированная Т-клетка по п. 1, где внутриклеточный домен CAR содержит двойные сигнальные домены.

7. Модифицированная Т-клетка по п. 1, дополнительно содержащая экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую костимулирующую молекулу.

8. Модифицированная Т-клетка по п. 7, где костимулирующая молекула выбрана из группы, состоящей из CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BB, 4-1BBL, PD1 и PD1L.

9. Модифицированная Т-клетка по п. 8, где CD3 содержит по меньшей мере две различные цепи CD3.

10. Модифицированная Т-клетка по п. 9, где различные цепи CD3 представляют собой дзета-цепь CD3 и эpsilon-цепь CD3.

11. Способ получения модифицированной Т-клетки, включающий:
введение нуклеиновой кислоты, способной подавлять экспрессию гена эндогенного гена, выбранного из группы, состоящей из α -цепи TCR, β -цепи TCR, бета-2-микроглобулина, молекулы HLA, CTLA-4 и PD1, в Т-клетку; и

введение нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен.

12. Способ по п. 11, где нуклеиновая кислота, способная подавлять экспрессию гена выбрана из группы, состоящей из антисмысловой РНК, антагомириной РНК, миРНК, кшРНК и CRISPR-системы.

13. Способ по п. 12, где CRISPR-система содержит вектор pAd5/F35-CRISPR.

14. Способ по п. 11, где антигенсвязывающий домен CAR содержит антитело, выбранное из группы, состоящей из моноклонального антитела, поликлонального антитела, синтетического антитела, антитела человека, гуманизированного антитела, однодоменного антитела, одноцепочечного вариабельного фрагмента и их антигенсвязывающих фрагментов.

15. Способ по п. 11, где антигенсвязывающий домен CAR специфически связывается с антигеном на клетке-мишени.

16. Способ по п. 11, где внутриклеточный домен CAR содержит двойные сигнальные домены.

17. Способ по п. 11, где Т-клетку получают из группы, состоящей из мононуклеарных клеток периферической крови, клеток пуповинной крови, очищенной популяции Т-клеток и линии Т-клеток.

18. Способ по п. 11, где способ дополнительно включает размножение Т-клетки.

19. Способ по п. 18, где этап размножения Т-клетки включает культивирование Т-клетки с фактором, выбранным из группы, состоящей из flt3-L, IL-1, IL-3 и лиганда c-kit.

20. Способ по п. 11, дополнительно включающий

криоконсервацию Т-клетки.

21. Способ по п. 20, дополнительно включающий размораживание криоконсервированной Т-клетки перед введением нуклеиновой кислоты в Т-клетку.

22. Способ по п. 11, где введение нуклеиновой кислоты выбрано из группы, состоящей из трансдукции размноженных Т-клеток, трансфекции размноженных Т-клеток и электропорации размноженных Т-клеток.

23. Способ по п. 11, дополнительно включающий электропорацию РНК, кодирующей костимулирующую молекулу, в Т-клетку.

24. Способ по п. 23, где костимулирующая молекула выбрана из группы, состоящей из CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BB, 4-1BBL, PD1 и PD1L.

25. Способ по п. 11, дополнительно включающий экспрессию Klf4, Oct3/4 и Sox2 в Т-клетках для индукции плюрипотентности Т-клетки.

26. Способ лечения заболевания или состояния, связанного с повышенным иммунитетом у индивидуума, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей модифицированную Т-клетку по п. 1, нуждающемуся в этом индивидууму.

27. Способ лечения состояния у индивидуума, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей модифицированную Т-клетку по п. 1.

28. Способ по п. 27, где состояние представляет собой аутоиммунное заболевание.

29. Способ по п. 28, где аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД), очаговой алопеции, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, аутоиммунной болезни Аддисона, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного заболевания внутреннего уха (AIED), аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома (ALPS), аутоиммунной тромбоцитопенической пурпуры (АТФ), болезни Бехчета,

кардиомиопатии, целиакия-герпетиформного дерматита; синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции (CFIDS), хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатию (CIPD), рубцующегося пемфигоида, болезни холодовых агглютининов, CREST-синдрома, болезни Крона, заболевания Дего, юношеского дерматомиозита, дискоидной волчанки, первичной криоглобулинемии смешанного типа, фибромиалгии-фибромиозита, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото, идиопатического легочного фиброза, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ITP), нефропатии IgA, инсулинозависимого сахарного диабета, юношеского хронического артрита (болезни Стилла), юношеского ревматоидного артрита, болезни Меньера, смешанного заболевания соединительной ткани, рассеянного склероза, тяжелой миастении, пернициозной анемии, узелкового периартериита, полихондрии, полигландулярных синдромов, ревматической полимиалгии, полимиозита и дерматомиозита, первичной агаммаглобулинемии, первичного биллиарного цирроза, псориаза, псориатического артрита, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматической лихорадки, ревматоидного артрита, саркоидоза, склеродермии (прогрессирующего системного склероза (PSS), также известного как системный склероз (SS)), синдрома Шегрена, синдрома скованного человека, системной красной волчанки, артериита Такаясу, височного артериита/гигантоклеточного артериита, язвенного колита, увеита, витилиго, гранулематоза Вегенера и любого их сочетания.

30. Способ по п. 27, где состояние представляет собой злокачественную опухоль.

31. Способ по п. 30, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака молочной железы, рака предстательной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака кожи, рака поджелудочной железы, колоректального рака, злокачественной опухоли почки, рака печени, злокачественной опухоли головного мозга, лимфомы, лейкоза, рака легких и любого их сочетания.

32. Способ стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа к клетки-мишени или ткани-мишени у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества

фармацевтической композиции, содержащей модифицированную Т-клетку по п. 1.

33. Способ по п. 32, дополнительно включающий индукцию лизиса клетки-мишени или ткани-мишени.

34. Способ по п. 33, где индуцированный лизис представляет собой антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

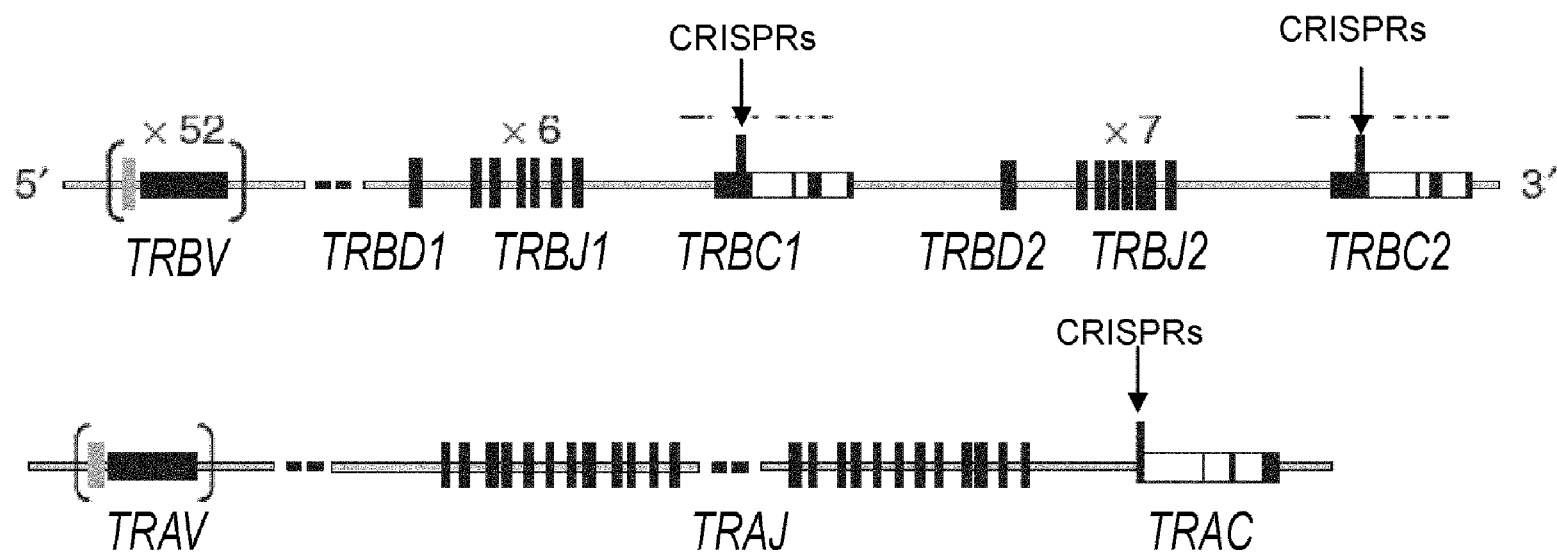
35. Способ терапии адоптивного переноса клеток, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей модифицированную Т-клетку по п. 1, нуждающемуся в этом индивидууму для профилактики или лечения иммунного ответа, который является неблагоприятным для индивидуума.

36. Применение модифицированной Т-клетки по п. 1 в производстве лекарственного средства для лечения иммунного ответа у нуждающегося в этом индивидуума.

37. Композиция, содержащая модифицированную Т-клетку, получаемую способом по п. 11.

38. Фармацевтическая композиция, содержащая модифицированную Т-клетку, получаемую способом по п. 11, и фармацевтически приемлемый носитель.

По доверенности



ФИГ.1А

промотор T7 + целевая РНК + каркас гидовой РНК

TTAATACGACTCACTATAGGCACCAAAGCTGCCCTTACC

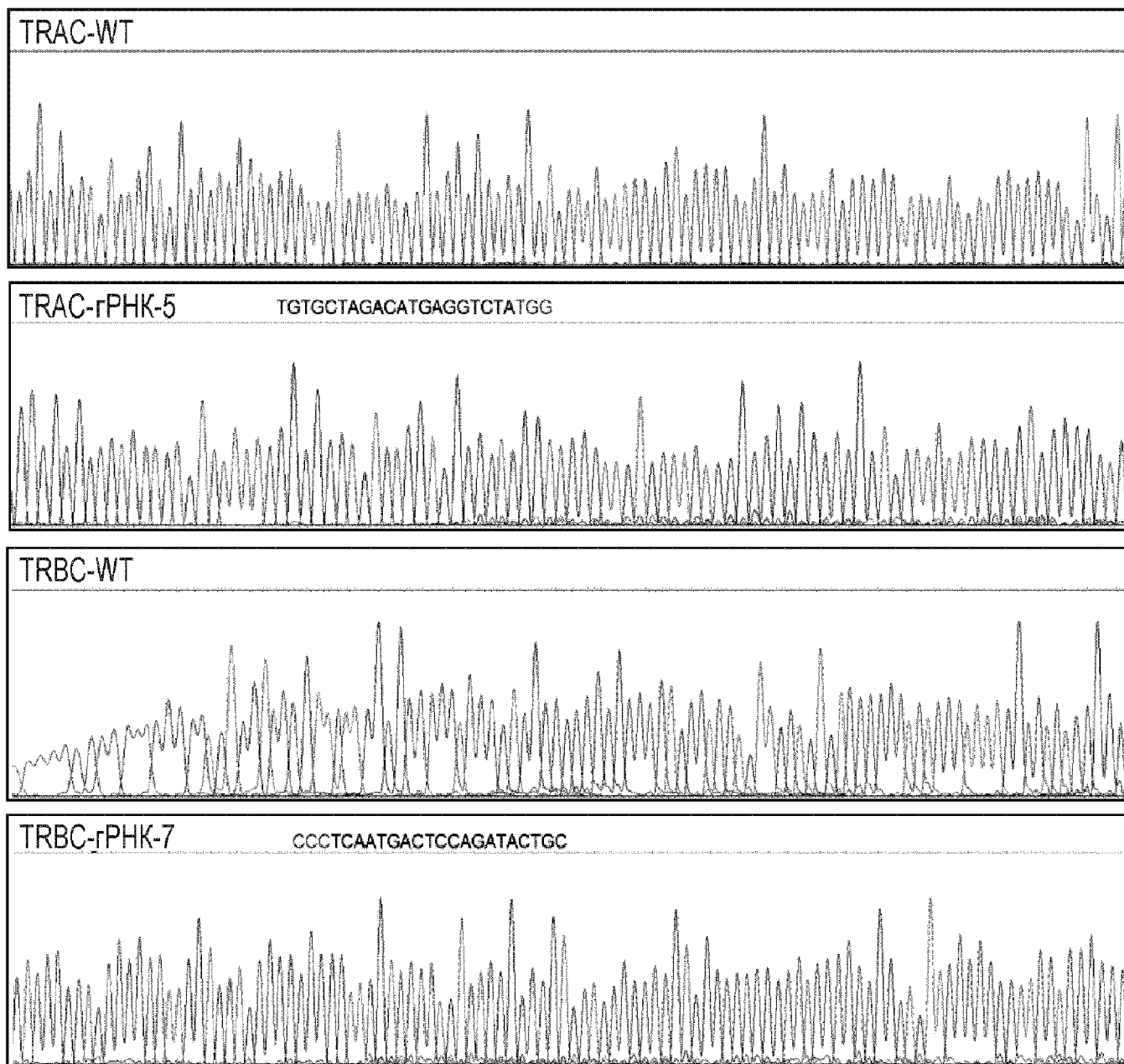
GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGT

CCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTT

TTTTT

ФИГ.1В

ФИГ.1С

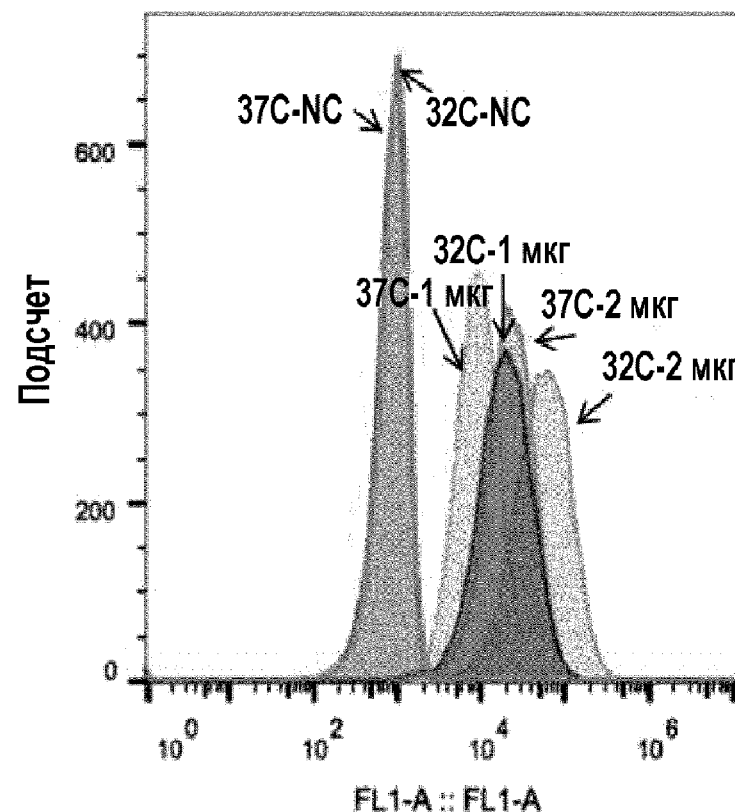
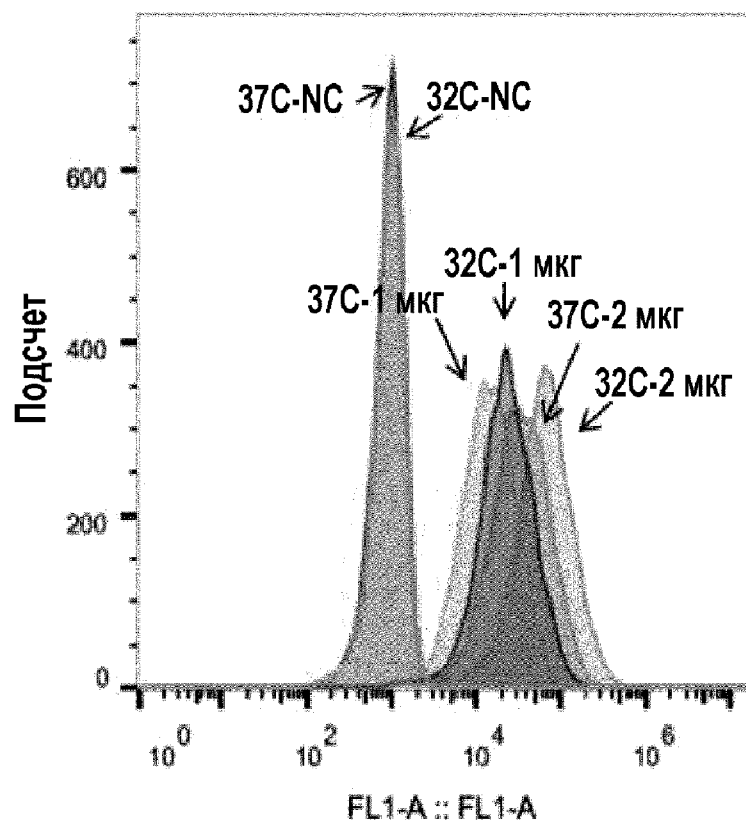


	% GFP	MFI	% выживаемости	мкм ³
200 В/20 мс	61.4	151806	31	300
200 В/10 мс	87.7	165419	37	280
300 В/10 мс	95.4	168023	23	250
360 В/5 мс	65.5	76453	40	320
360 В/1 мс	98.3	100755	82	600
400 В/0.7 мс	97.5	81368	87	610
500 В/0.7 мс	97.8	89314	80	600

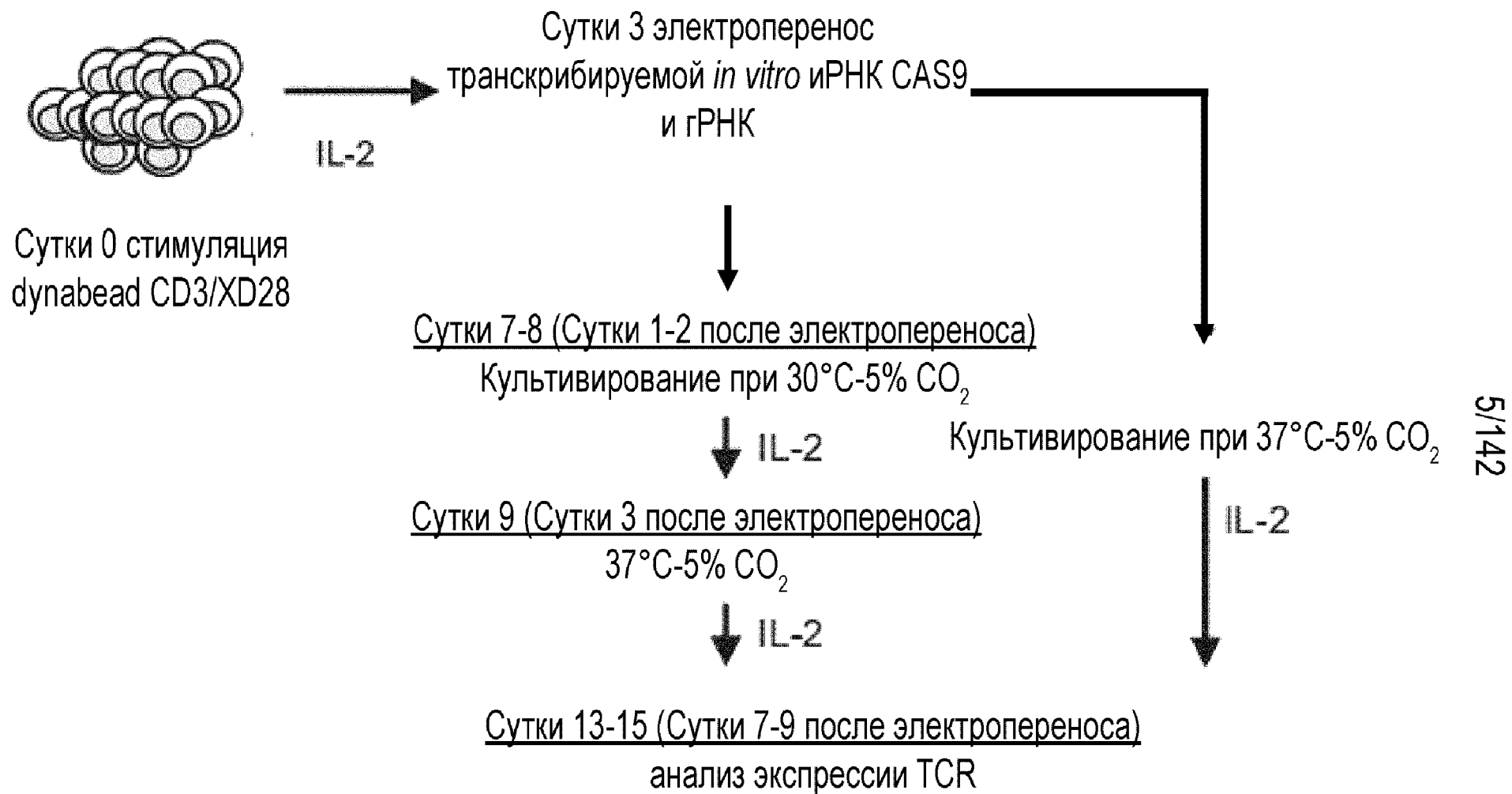
ФИГ.2А

	Название образца	Название подпопуляции	Под-счет
■	E01 32C-NC сутки 1. флуоресц.	Лимфоциты	10206
■	E02 32C-1 мкг сутки 1. флуор.	Лимфоциты	10196
■	E03 32C-2 мкг сутки 1. флуор.	Лимфоциты	10182
■	D01 37C-NC сутки 1. флуоресц.	Лимфоциты	10439
■	C02 37C-1 мкг сутки 1. флуор.	Лимфоциты	10331
■	D03 37C-2 мкг сутки 1. флуор.	Лимфоциты	10336

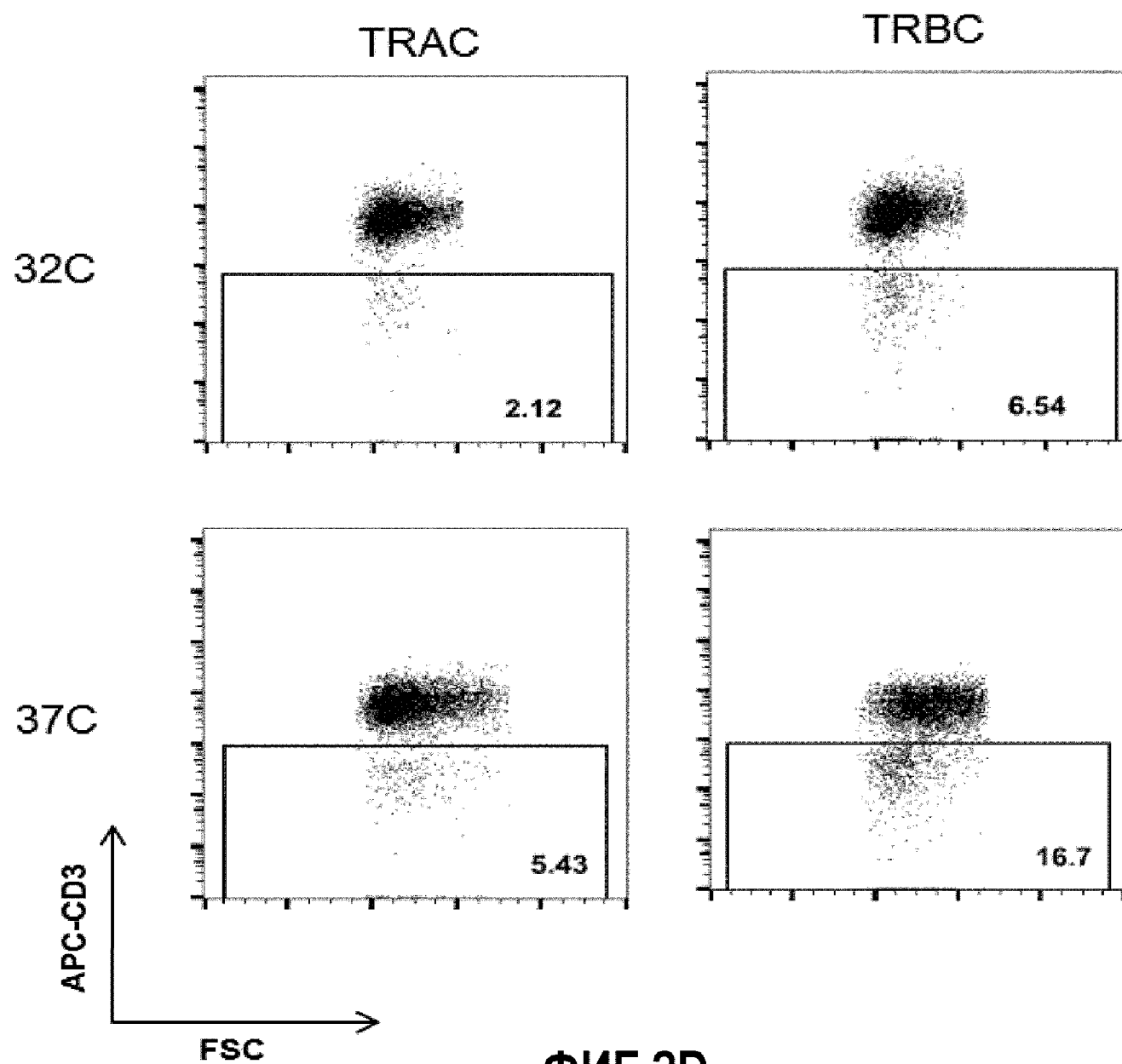
	Название образца	Название подпопуляции	Под-счет
■	E07 32C-NC сутки 2. флуоресц.	Лимфоциты	10549
■	E08 32C-1 мкг сутки 2. флуор.	Лимфоциты	10467
■	E09 32C-2 мкг сутки 2. флуор.	Лимфоциты	10527
■	D07 37C-NC сутки 2. флуор.	Лимфоциты	10508
■	D08 37C-1 мкг сутки 2. флуор.	Лимфоциты	10414
■	D09 37C-2 мкг сутки 2. флуор.	Лимфоциты	10569



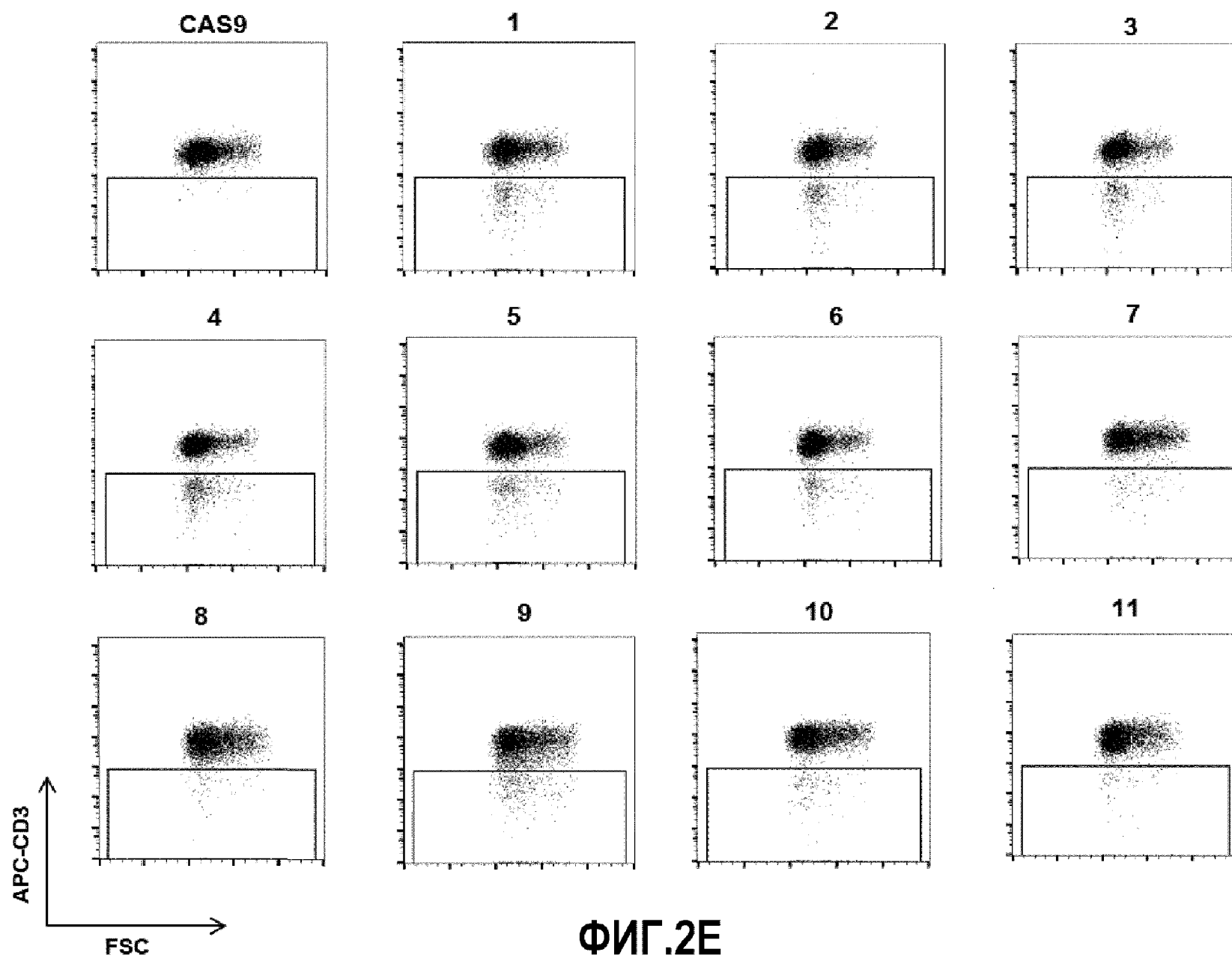
ФИГ.2В



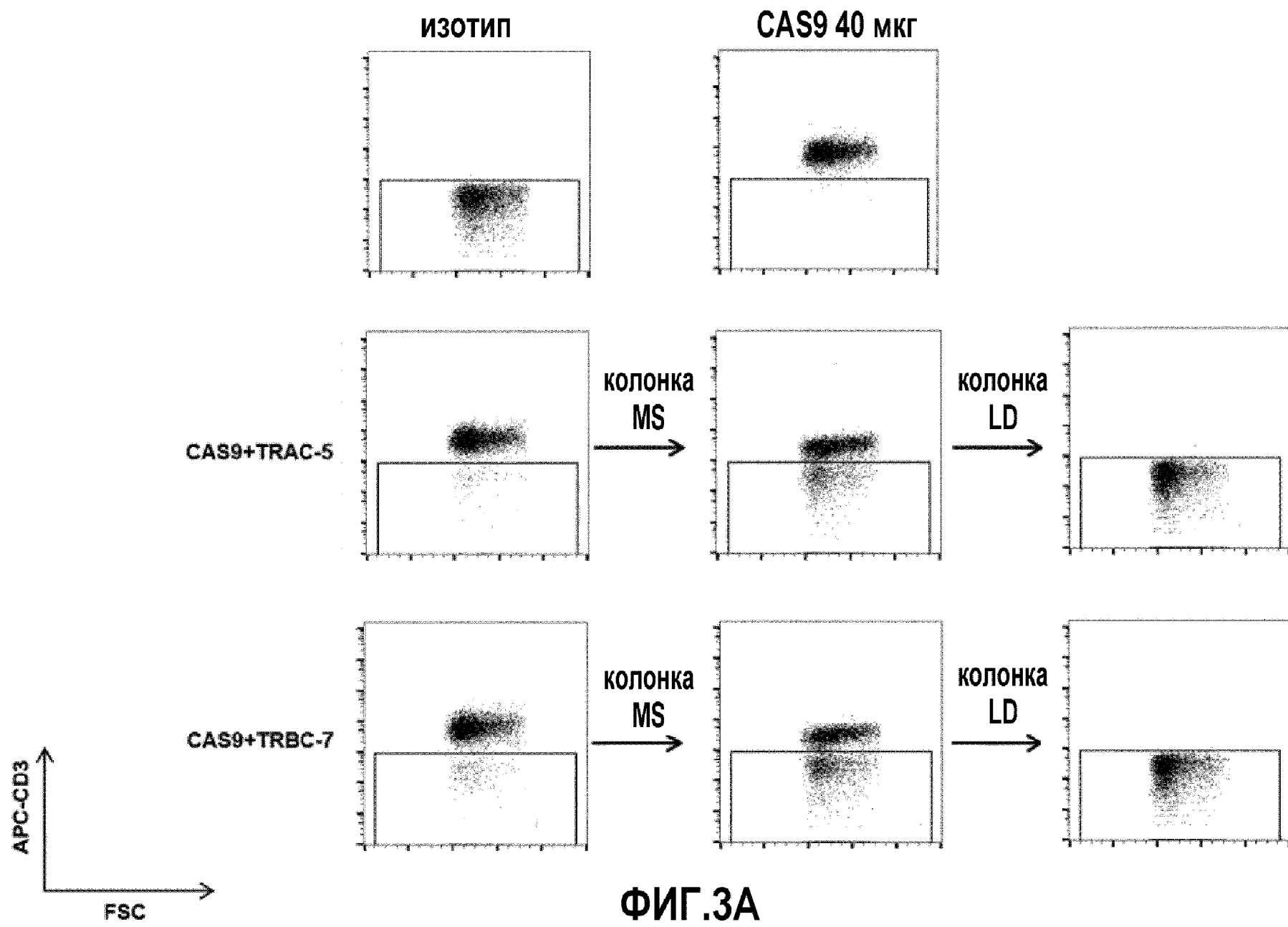
ФИГ.2С

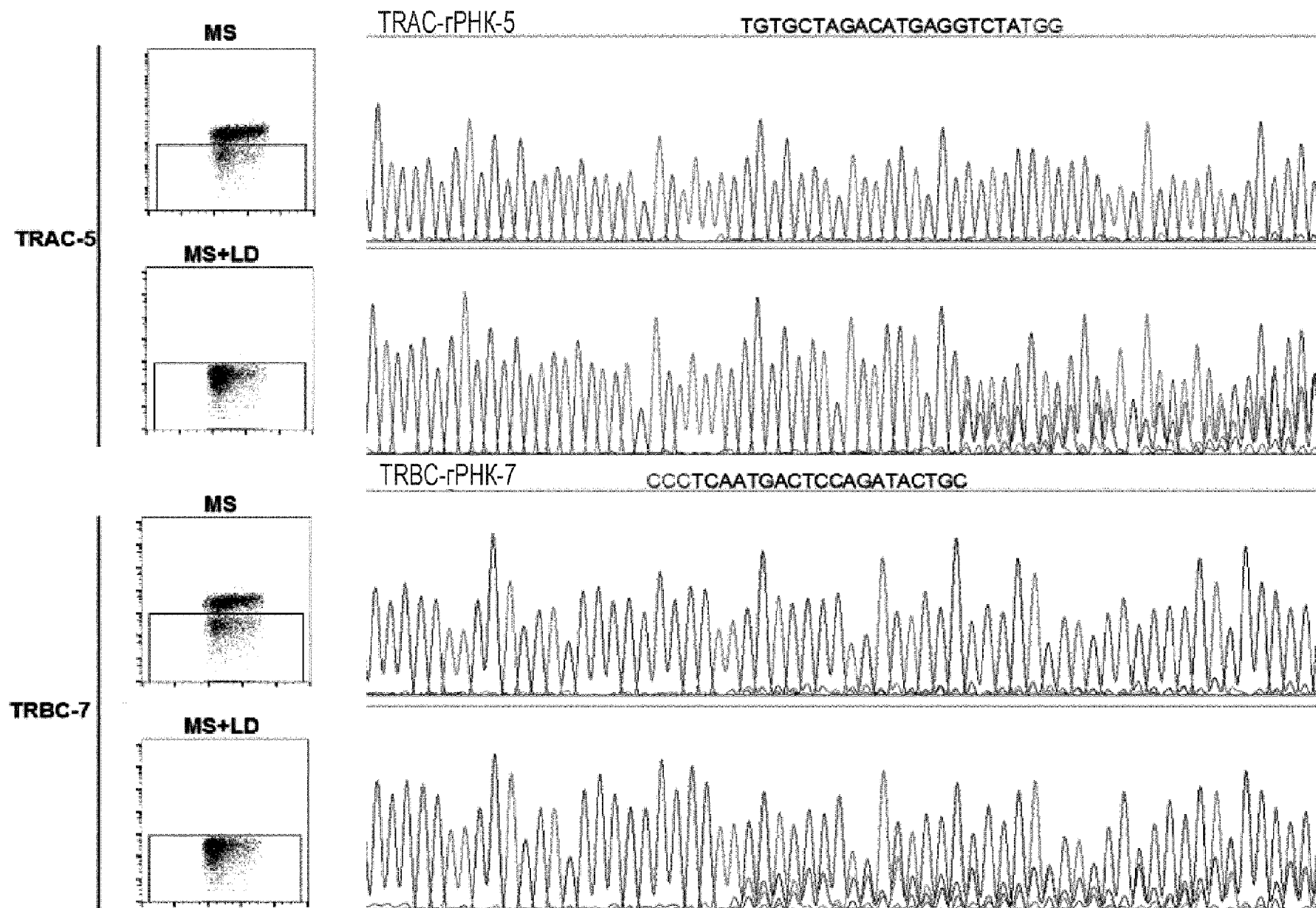


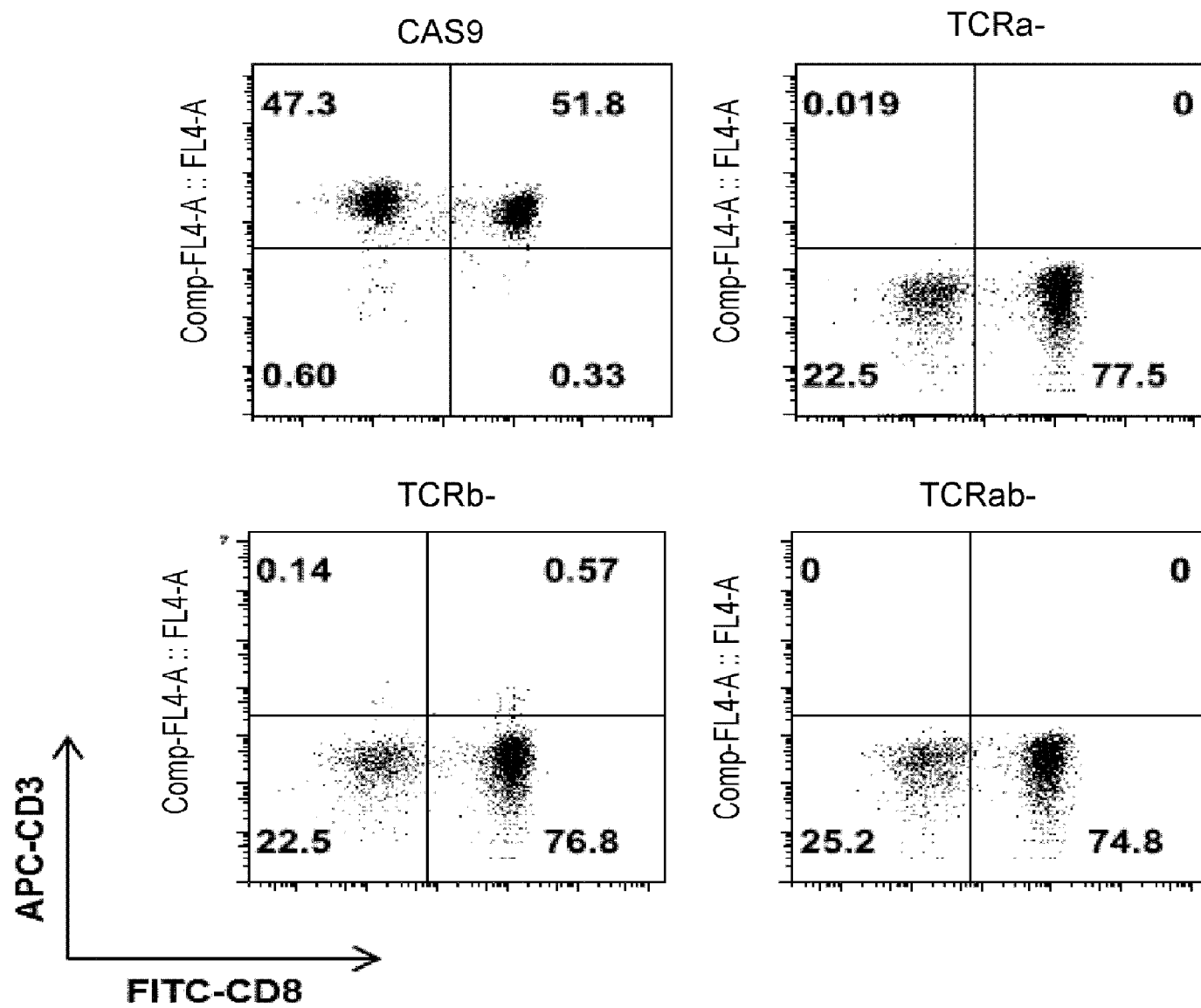
ФИГ.2D



ФИГ.2Е







ФИГ.3С

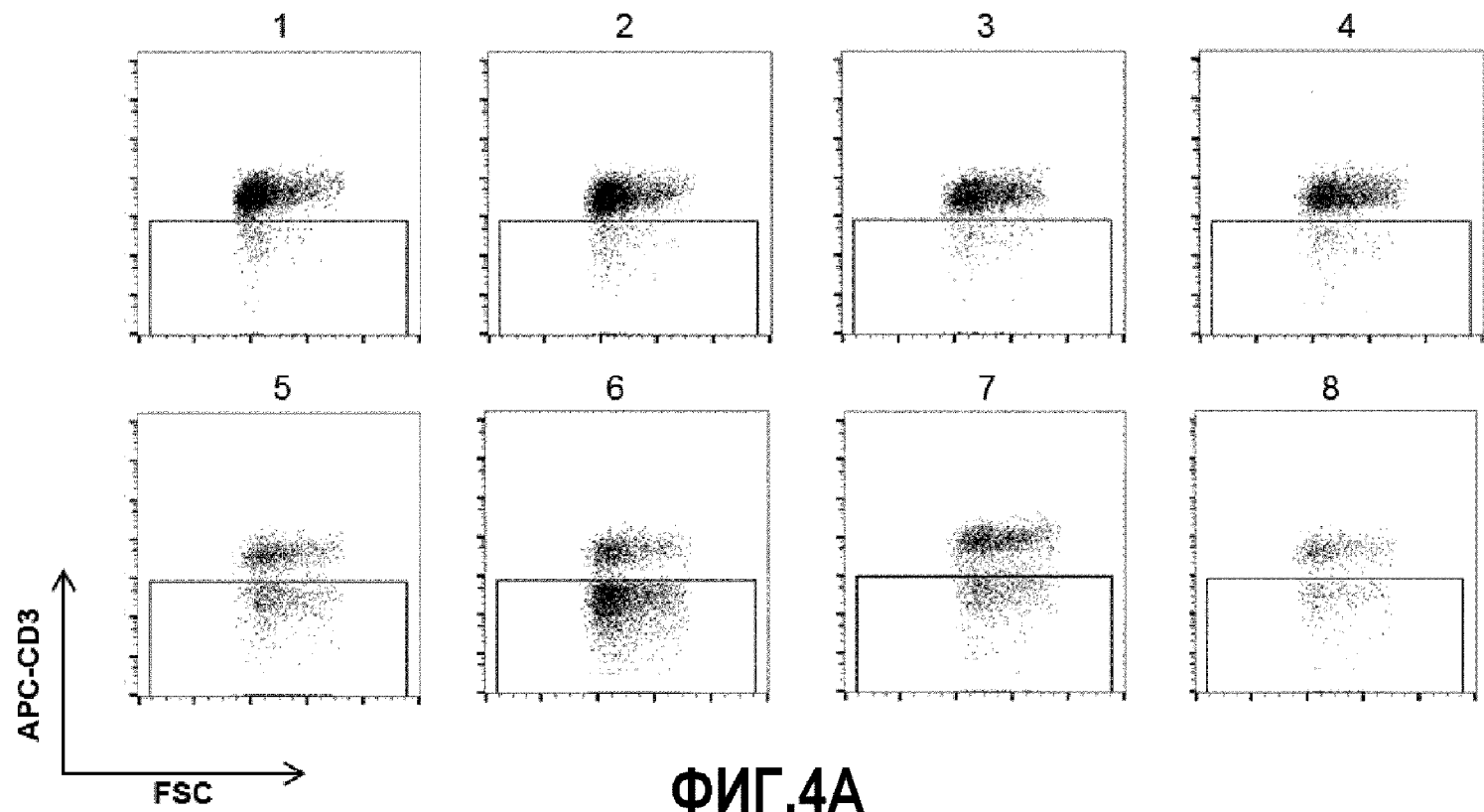
TRAC WT TATATCACAGACAAAACGTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCT
 (X4) TATATCACAGACAAAACGTGTGCTAGACATGAG- TCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCT
 (X3) TATATCACAGACAAAACGTGTGCTAGACATG -- GTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCT
 (X1) TATATCACAGACAAAACGTGTGCTAGACATGA - GTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCT
 (X1) TATATCACAGACAAAACGTGTGCTAGACATG --- TCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCT
 (X1) TATATCACAGACAAAACGTGTGCTAGAC - TGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCT
 (X1) TATATCACAGACAAAACGTGTGCTAG --- TGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCT
 (X1) TATATCACAGACAAAACGTGTGCT ---- TGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCT
 (X1) TATATCACAGACAAAACGTGTGCTAGACATGAGGTTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCC
 (X1) TATATCACAGACAAAACGTGTGCTAGACATGAGGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCC

 TRBC1 WT AGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
 (X2) AGCAGCCCGCCCTC - ATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
 (X2) AGCAGCCCGCC - TCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
 (X1) AGCAGCCCGCCCTCAATGACTC - AGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
 (X1) AGCAGCCCGCCCTCAATGACT - - AGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
 (X1) AGCAGCCCGCCC ---- GACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
 (X1) AGCAGCCCGCCCTCAAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCT
 (X1) AGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCT

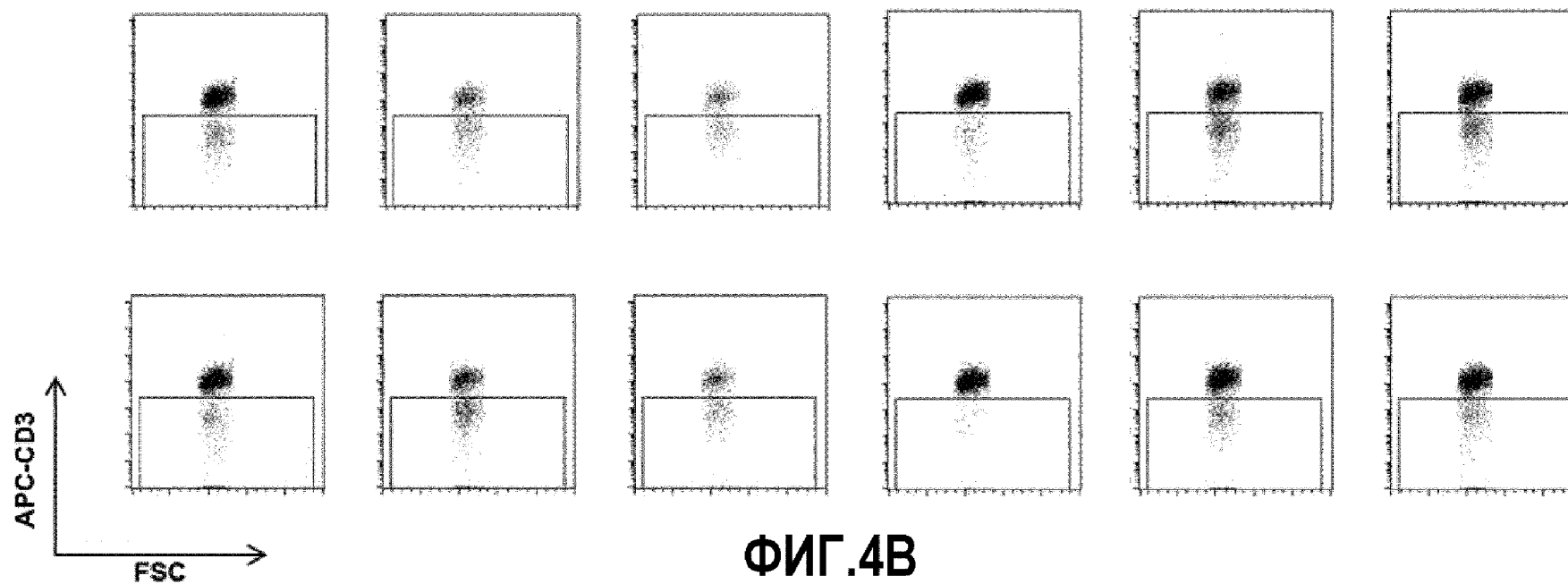
 TRBC2 WT AGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
 (X3) AGCAGCCCGCCCTCAATGAC - - - AGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
 (X2) AGCAGCCCGCCCTCAATGACTC - AGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
 (X1) AGCAGCCCGCCCTCA ----- ACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
 (X1) AGCAGCCCGCC - TCA - TGA - CT - CAGATACTG - CTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCT
 (X1) AGCAGCC ----- ACTG ---- C - G ----- TGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCT
 (X1) AGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCT

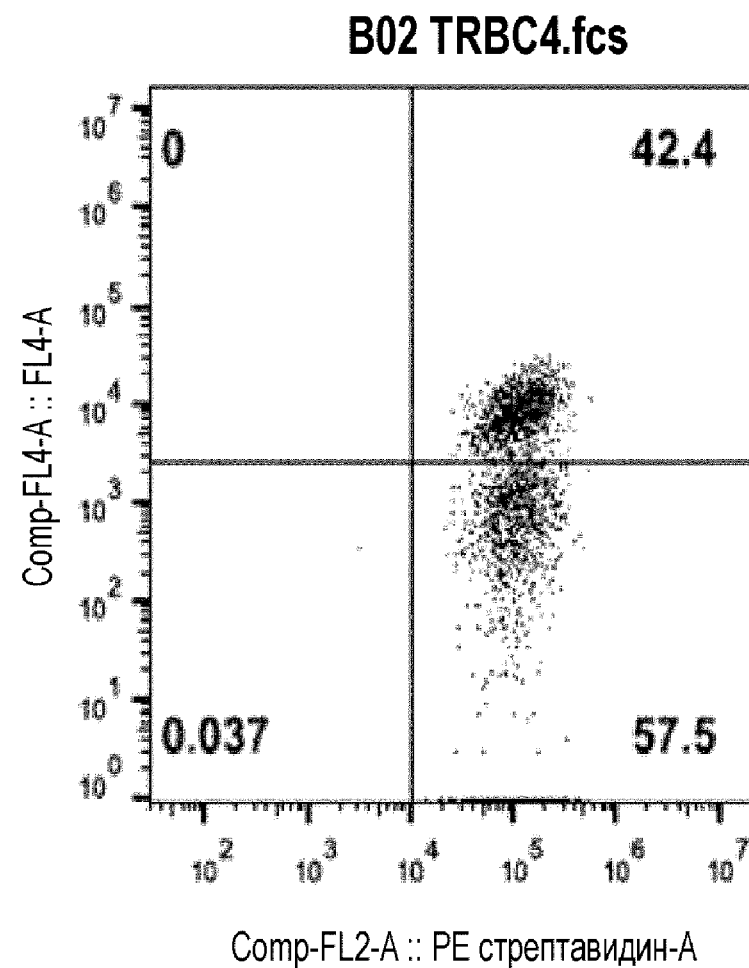
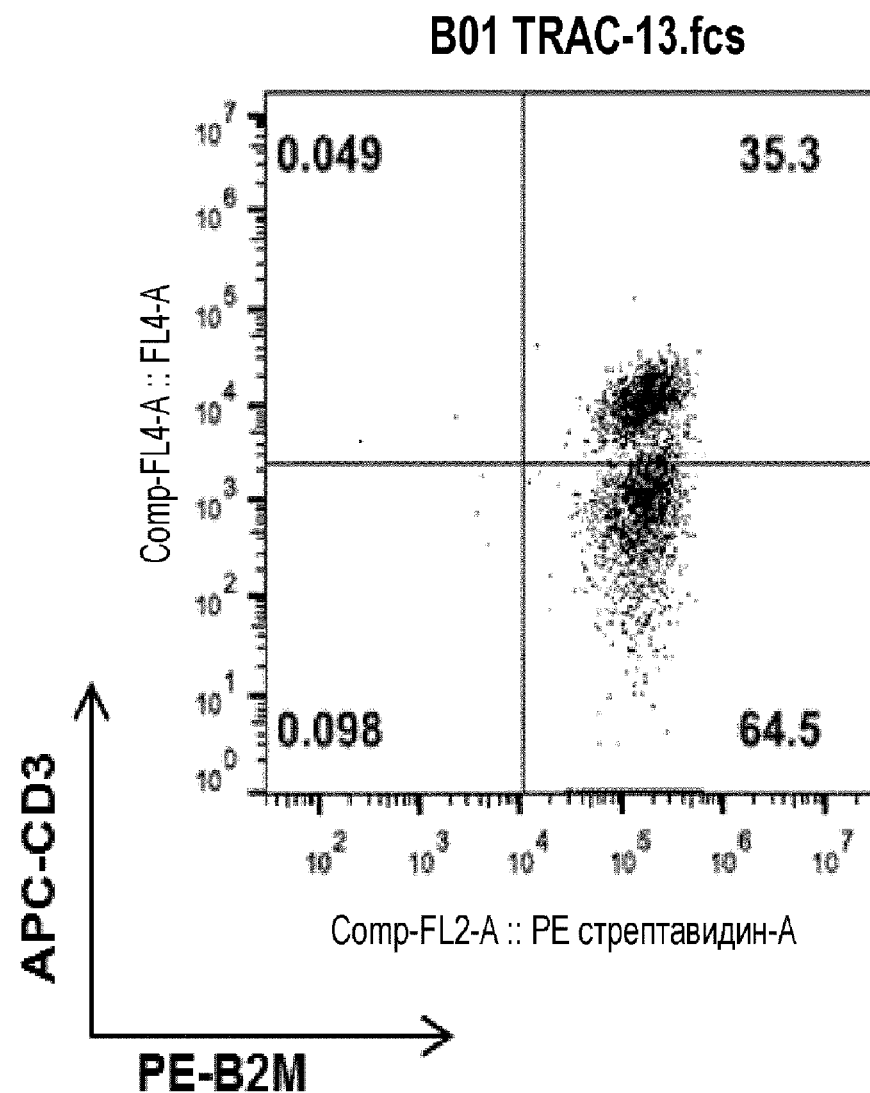
ФИГ.3D

	0 часов	18 часов	24 часа	36 часов
1	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг			
2	CAS9 20 мкг, гРНК 20 мкг			
3	CAS9 2 мкг, гРНК 40 мкг			
4	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг			
5	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг	гРНК 10 мкг		
6	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг	гРНК 10 мкг	гРНК 10 мкг	
7	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг		гРНК 10 мкг	гРНК 10 мкг
8	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг	гРНК 10 мкг	гРНК 10 мкг	гРНК 10 мкг



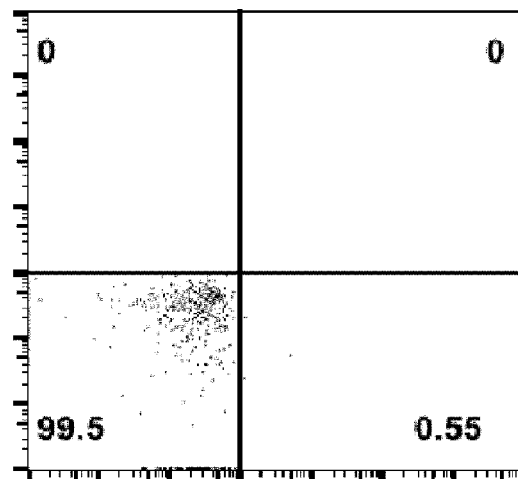
	CAS9 20 мкг	первый раз	второй раз	
		0 часов	18 часов	24 часа
1	TRAC13	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг		
2	TRAC13	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг	гРНК 10 мкг	
3	TRAC13	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг		гРНК 10 мкг
4	TRBC4	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг		
5	TRBC4	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг	гРНК 10 мкг	
6	TRBC4	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг		гРНК 10 мкг
7	кэпированный TRAC13	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг		
8	кэпированный TRAC13	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг	гРНК 10 мкг	
9	кэпированный TRAC13	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг		гРНК 10 мкг
10	кэпированный TRBC4	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг		
11	кэпированный TRBC4	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг	гРНК 10 мкг	
12	кэпированный TRBC4	CAS9 20 мкг, гРНК 10 мкг		гРНК 10 мкг



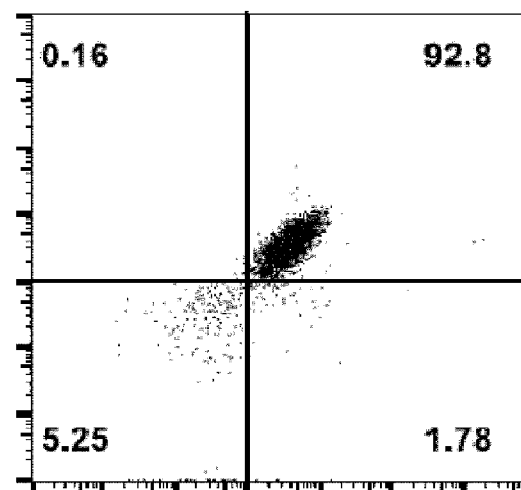


ФИГ.4С

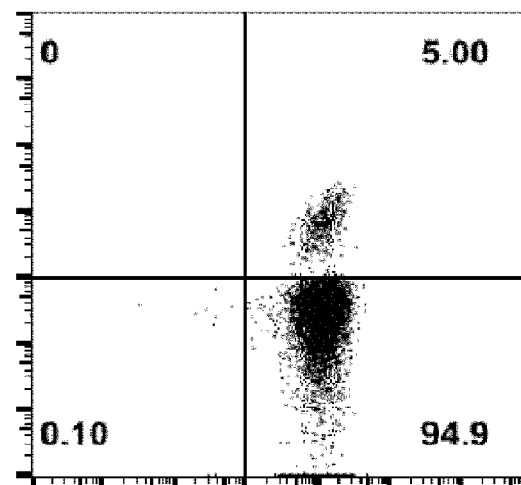
TCR-/-



TCR-/- + 1G4ab

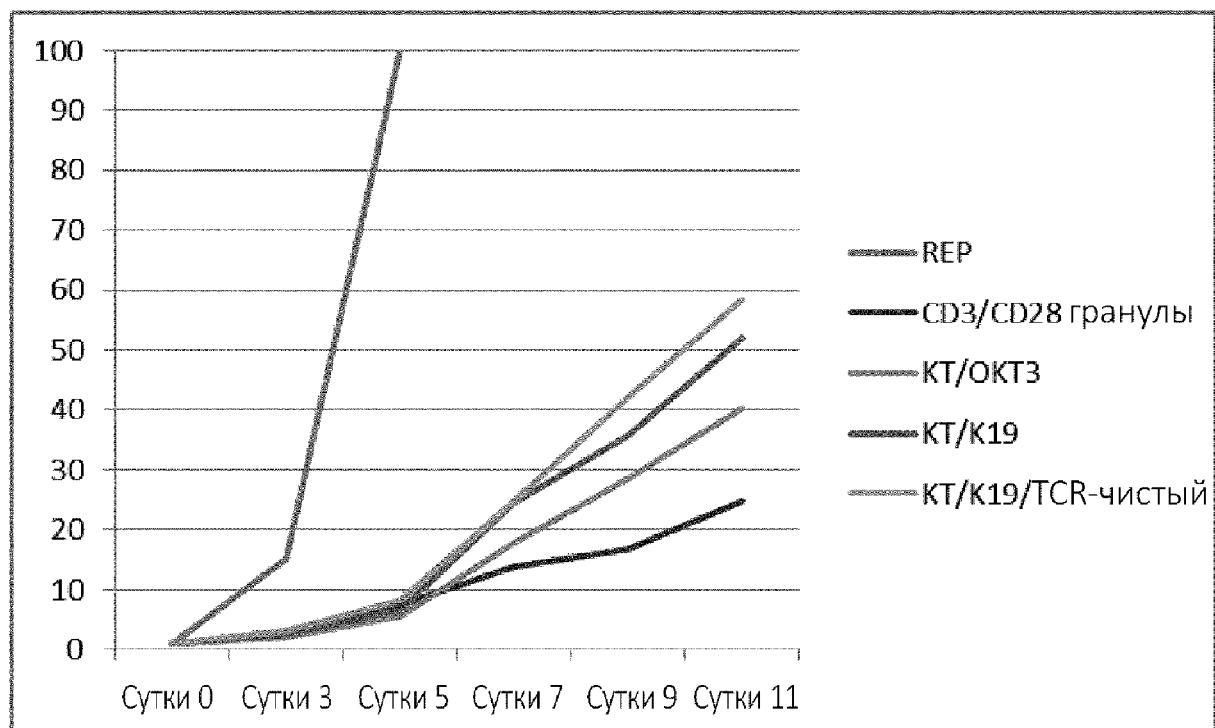


CAS9 MOCK

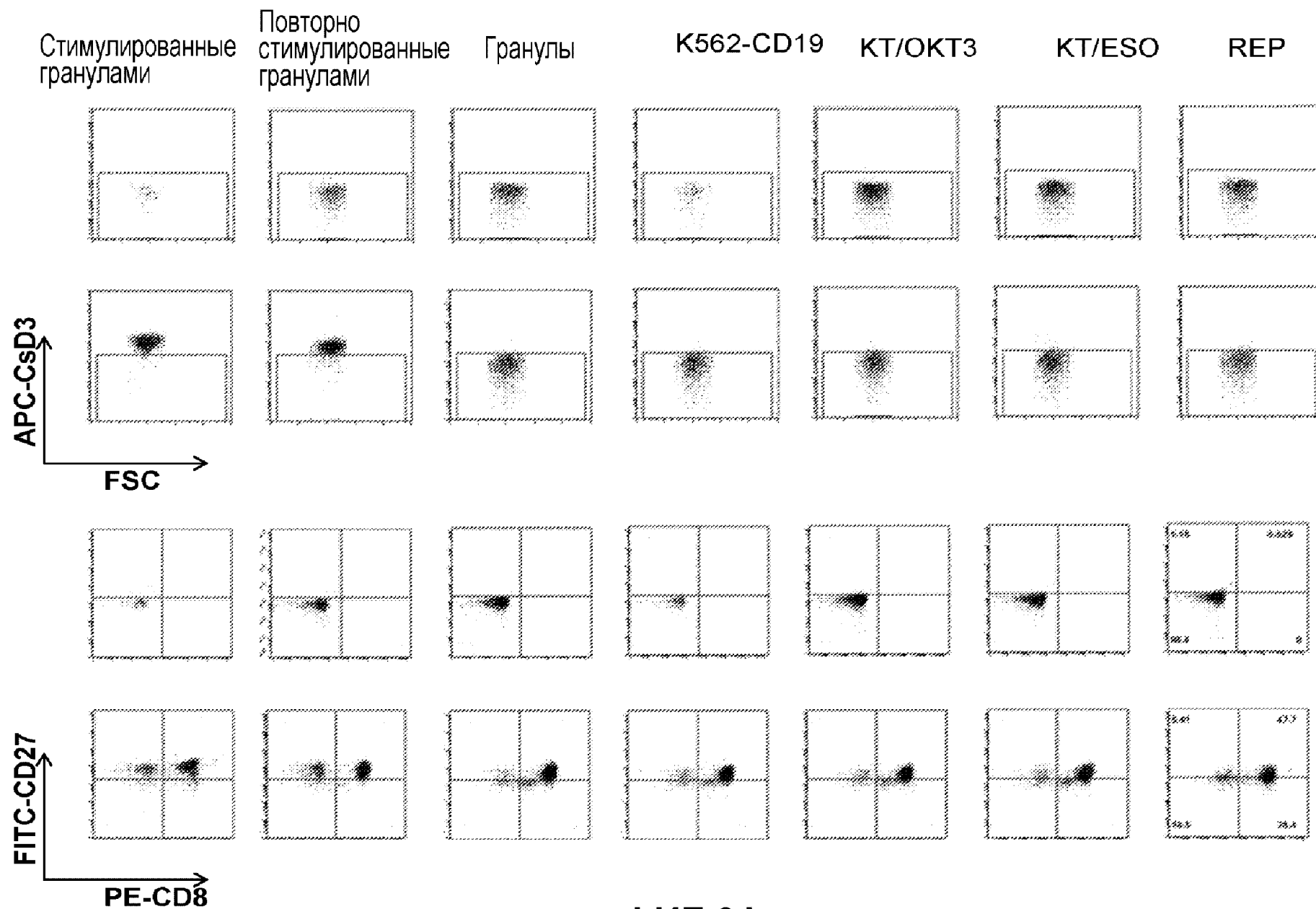


ФИГ.5А

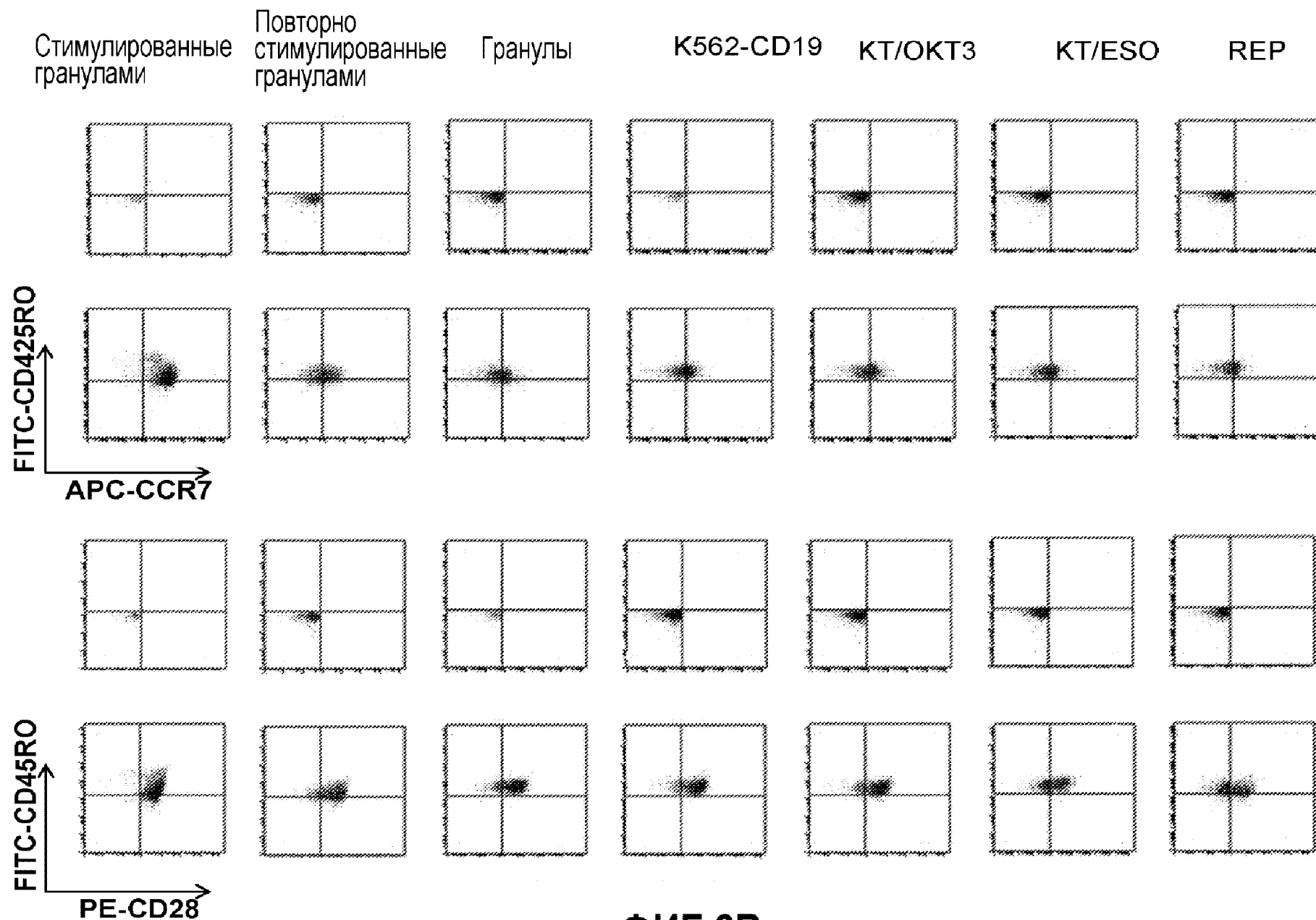
Кратность размножения						
Группы	Сутки 0	Сутки 3	Сутки 5	Сутки 7	Сутки 9	Сутки 11
REP	1	15	100	198	335	507
CD3/CD28 гранулы	1	2	7	14	17	25
КТ/ОКТ3	1	2	5	18	29	40
КТ/К19	1	3	7	24	36	52
КТ/К19/TCR-чистый	1	3	8	25	42	58



ФИГ.5В

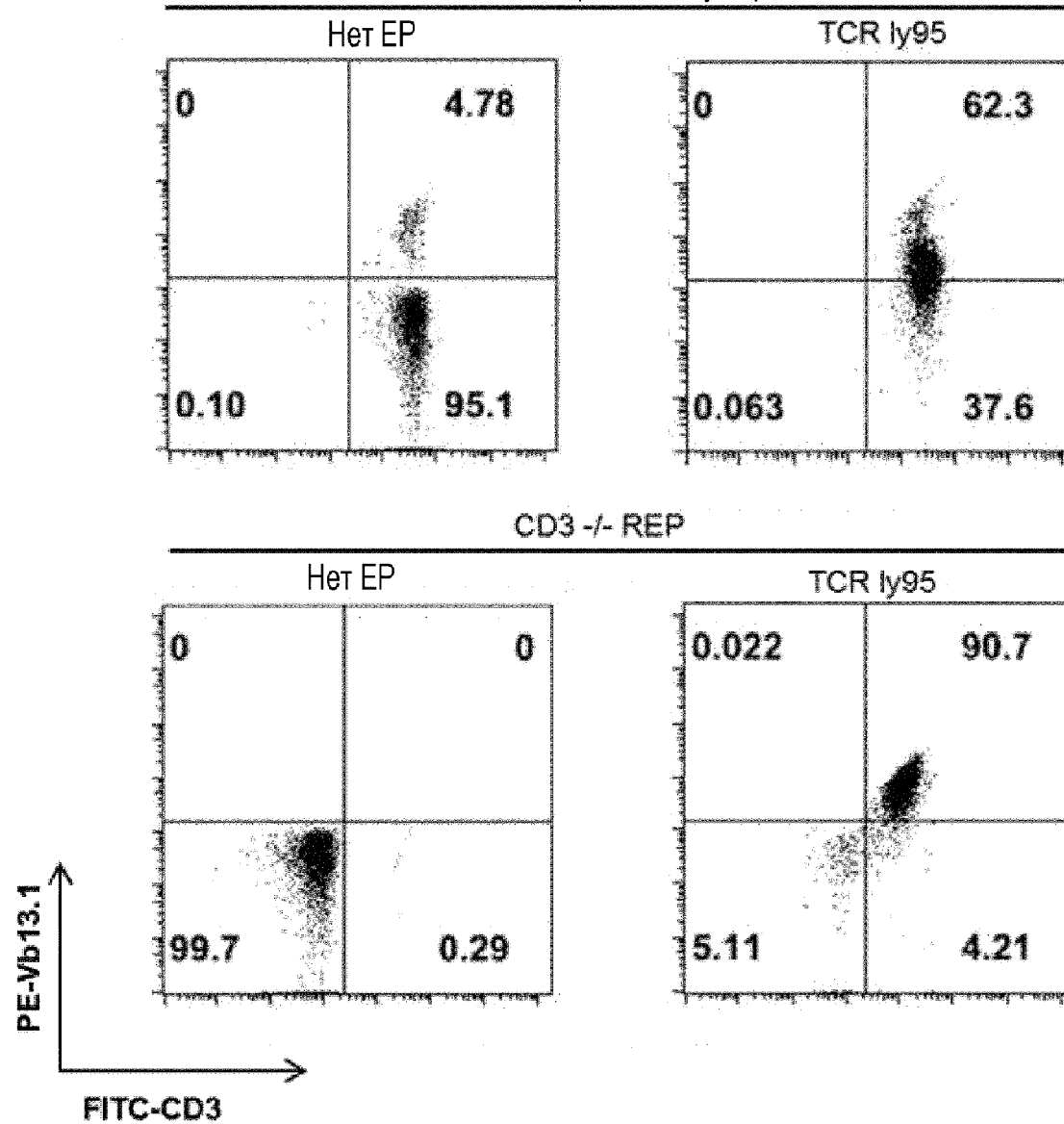


ФИГ.6А



ФИГ.6В

CAS9 МОСК повторно стимулированные



ФИГ.7А

CAS9 MOCK повторно стимулированные

CD3 -/- REP

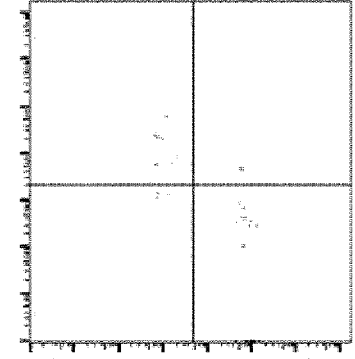
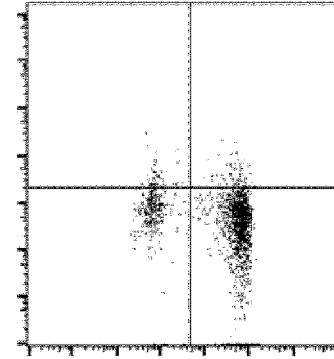
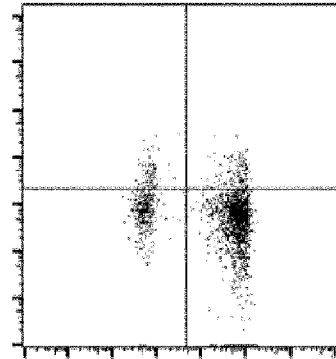
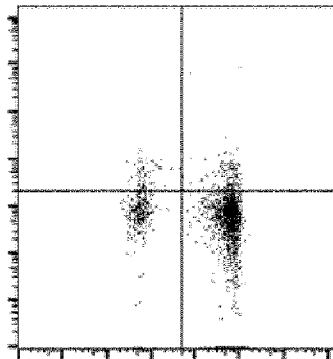
TCR Iy95

Нет EP

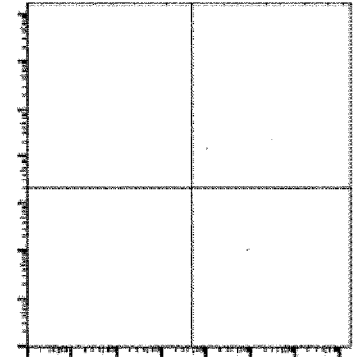
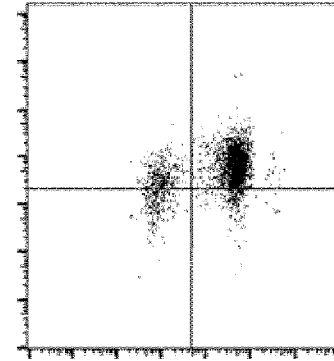
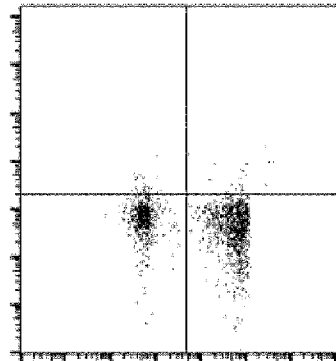
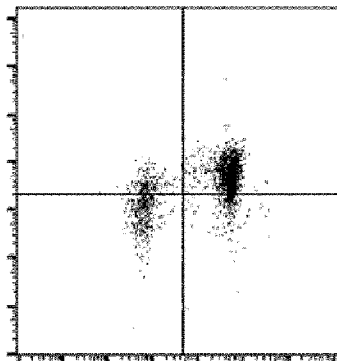
TCR Iy95

Нет EP

Nalm6



Nalm6-NY-ESO

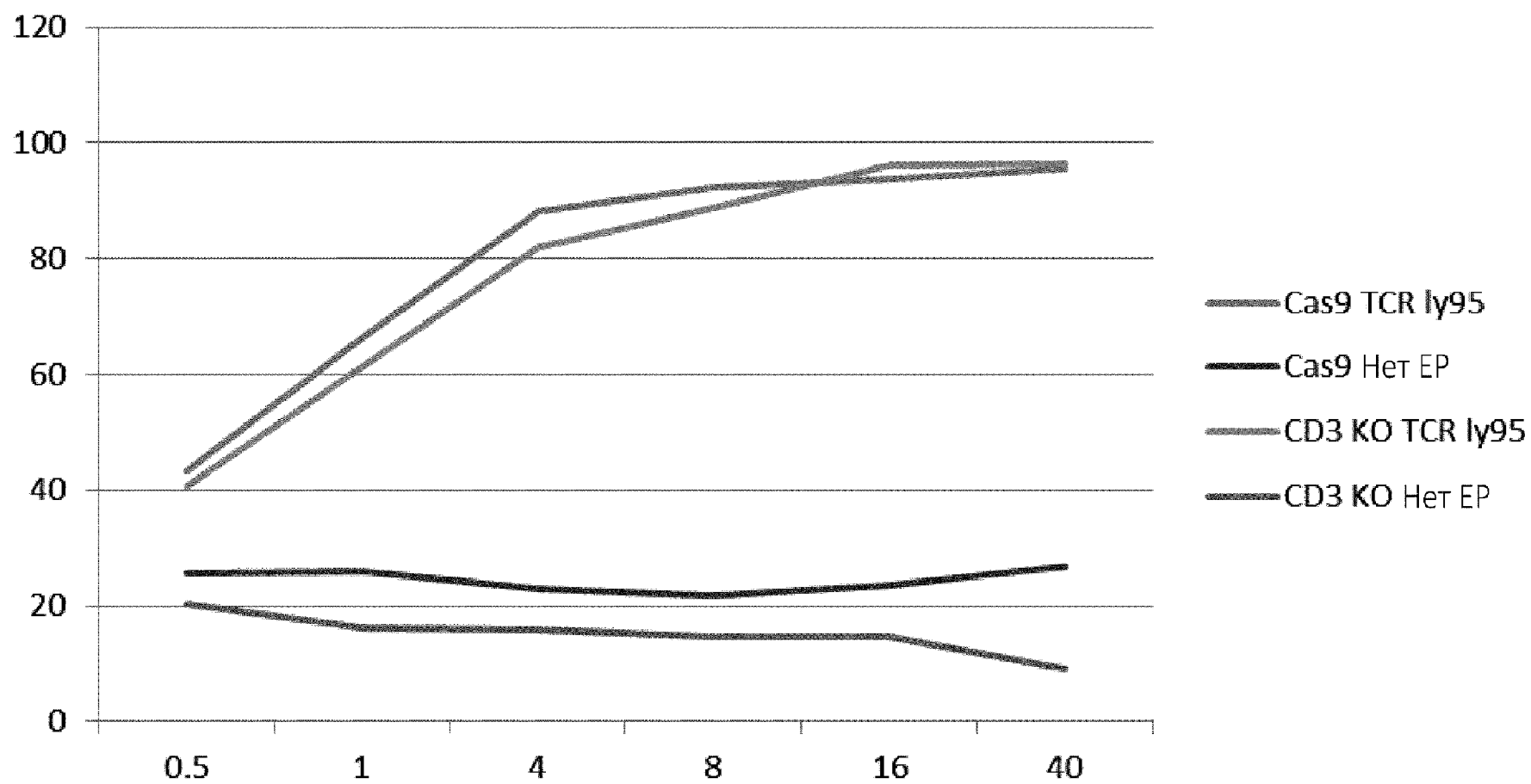


PE-107a

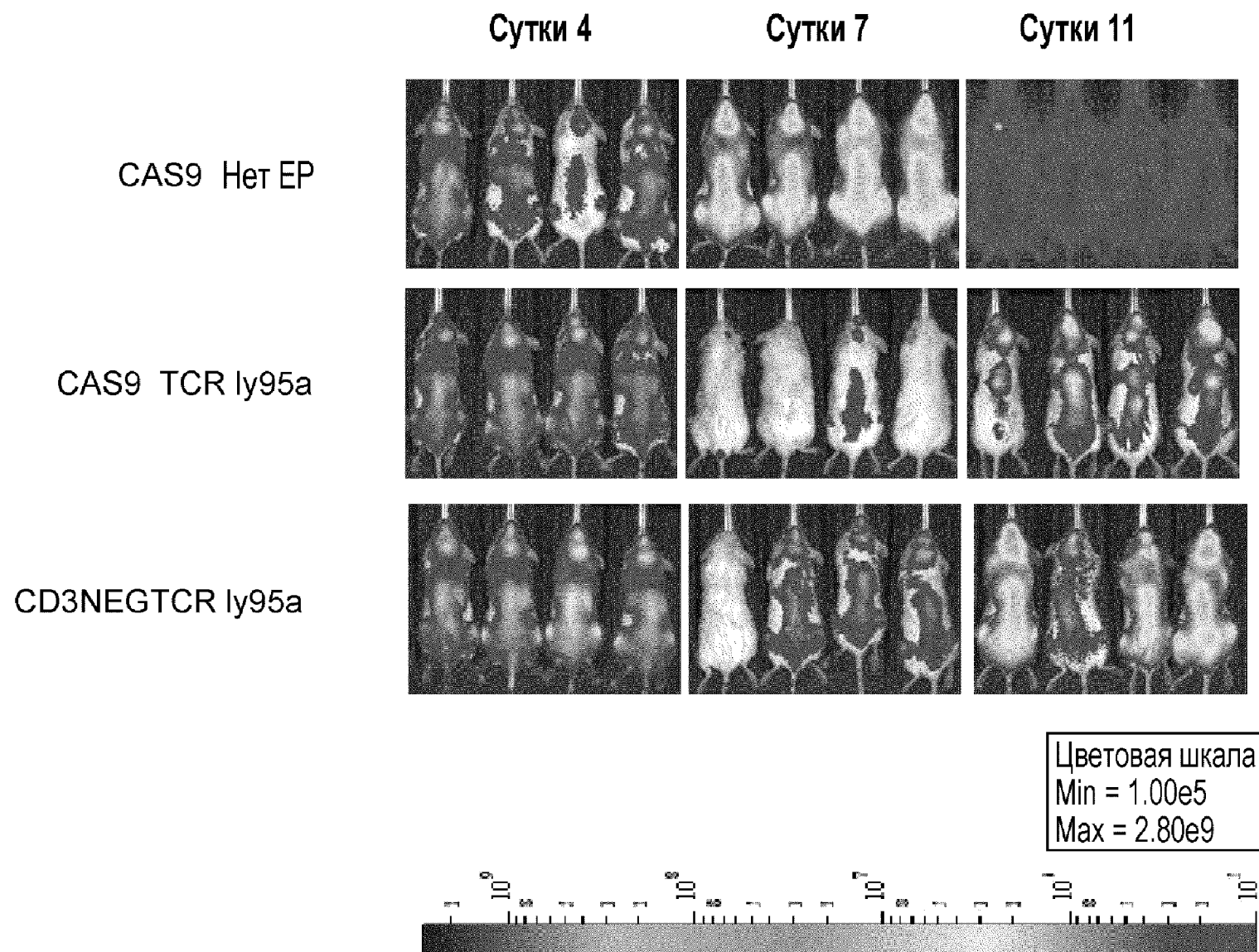
FITC-CD8 (установка дискриминационного окна по CD3+ клеткам)

20/142

ФИГ.7В



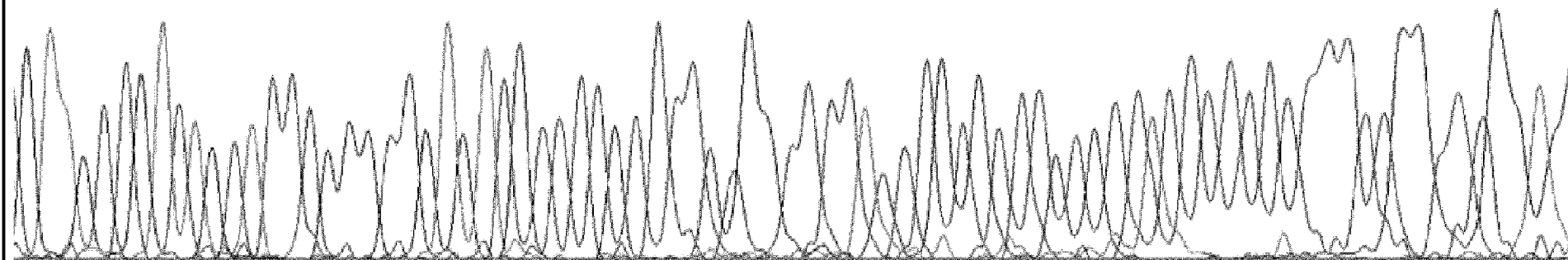
ФИГ.7С



22/142

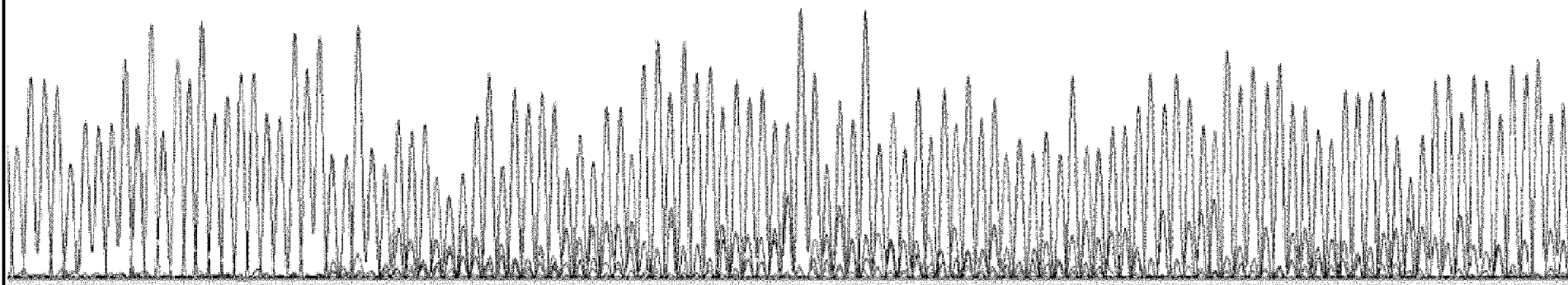
ФИГ.8

B2m-WT



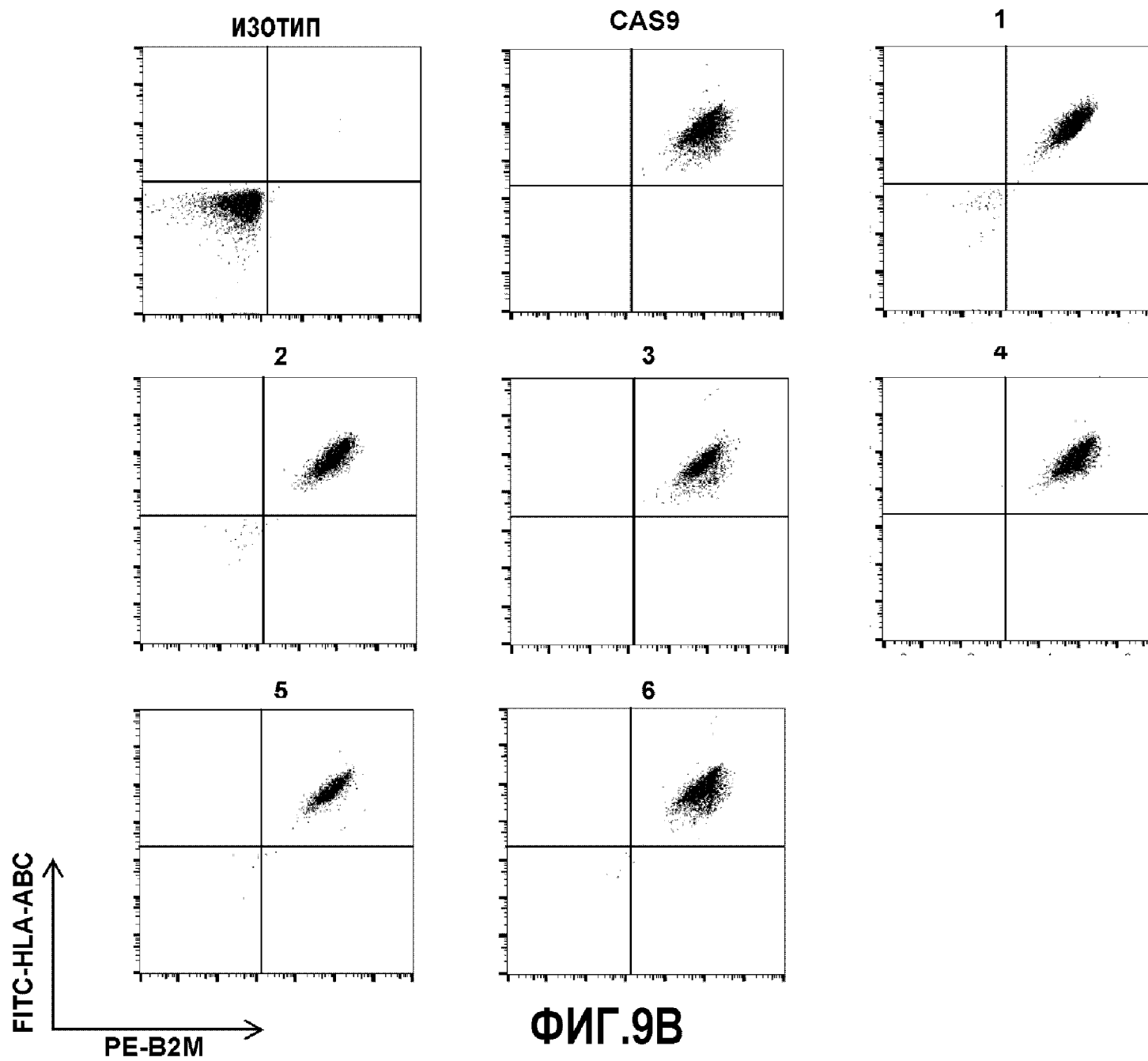
B2m-rPHK-10

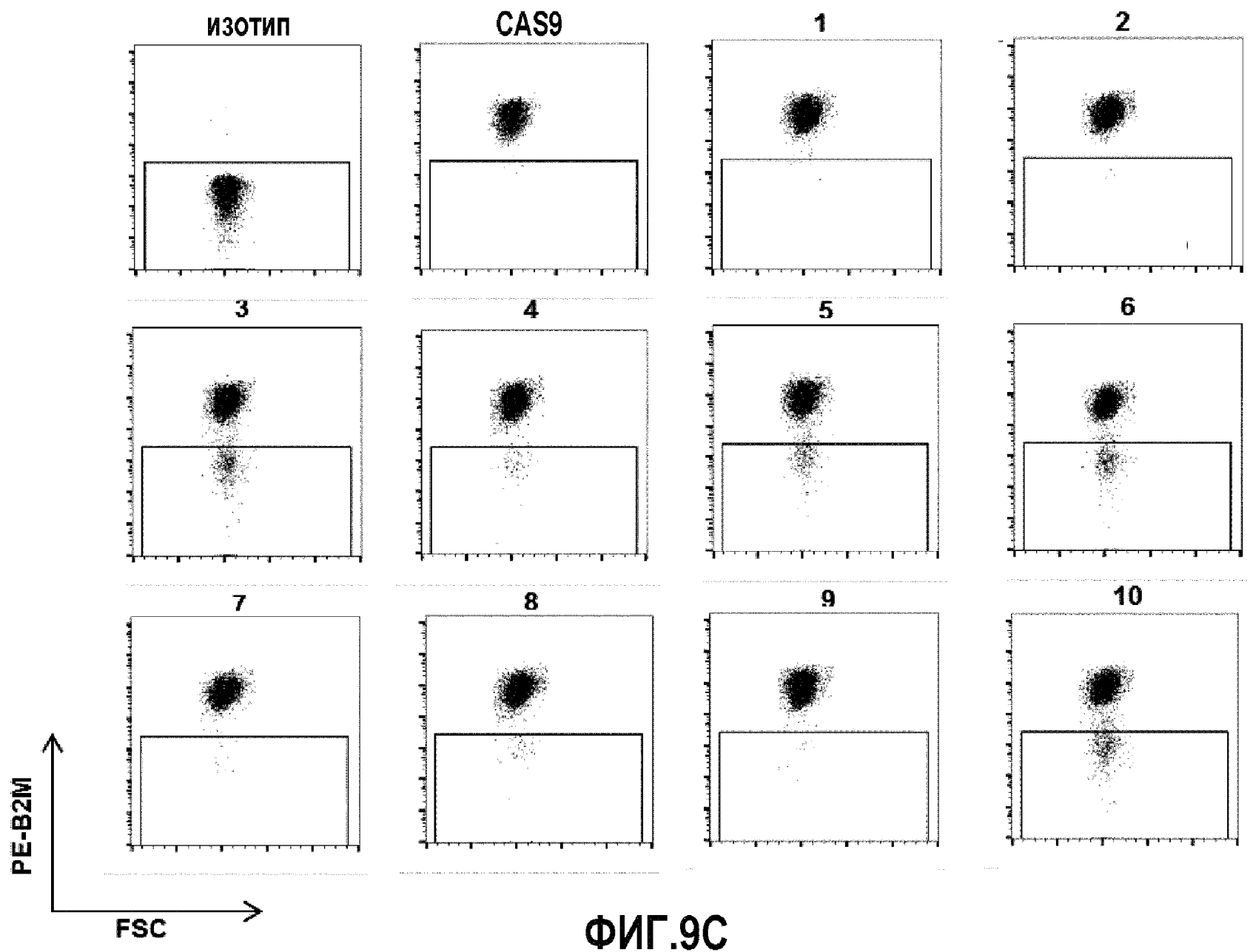
CCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCG

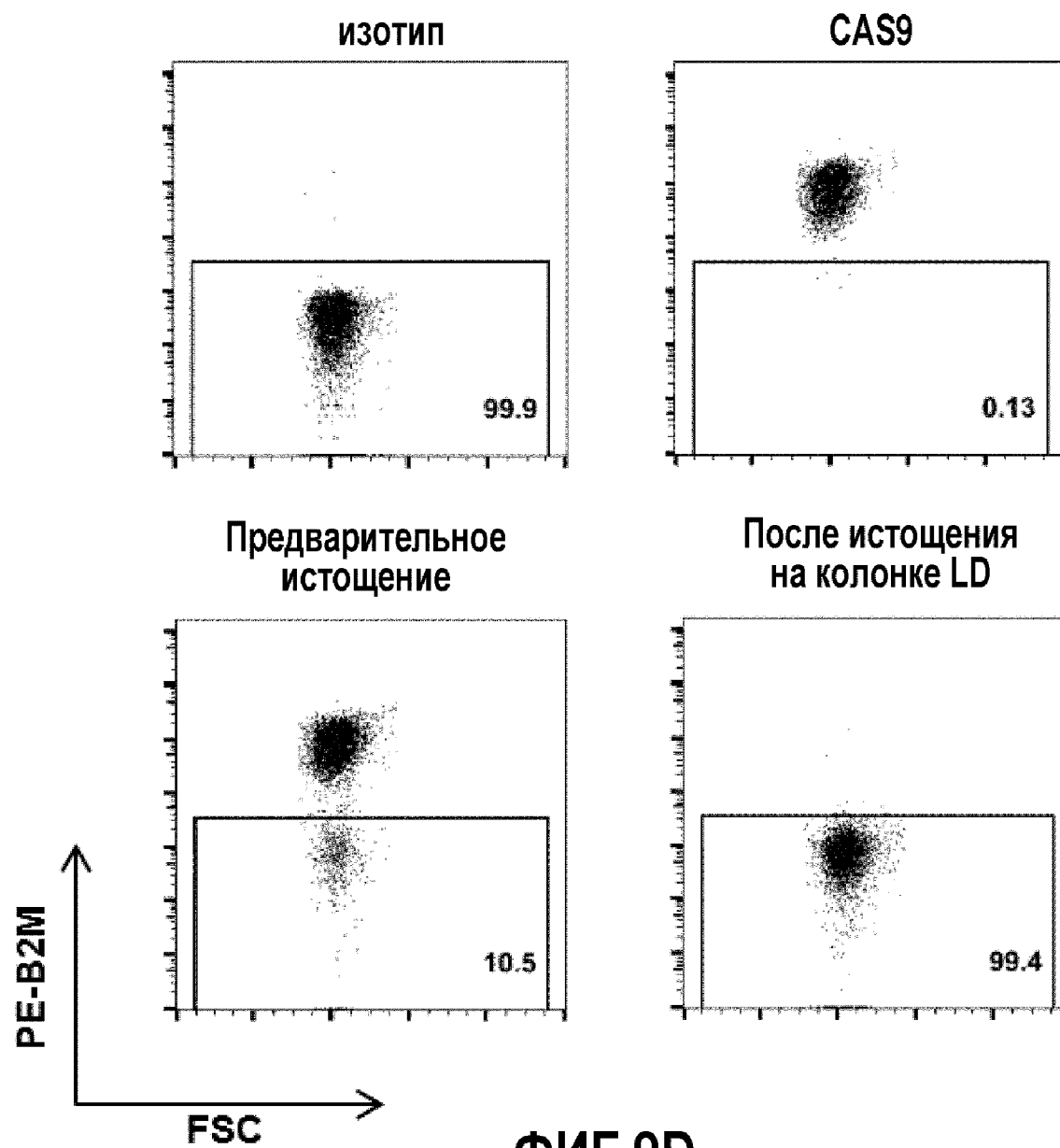


23/142

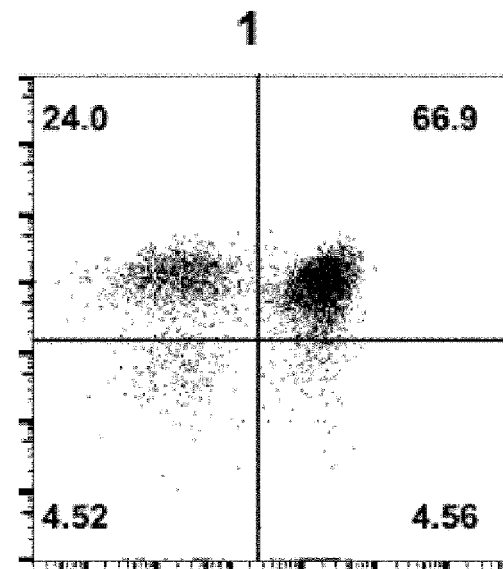
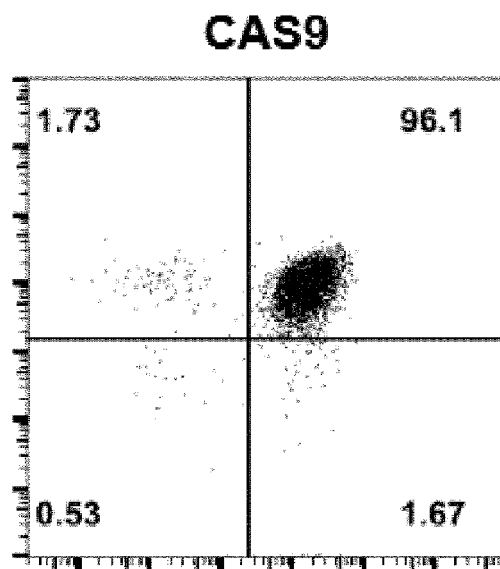
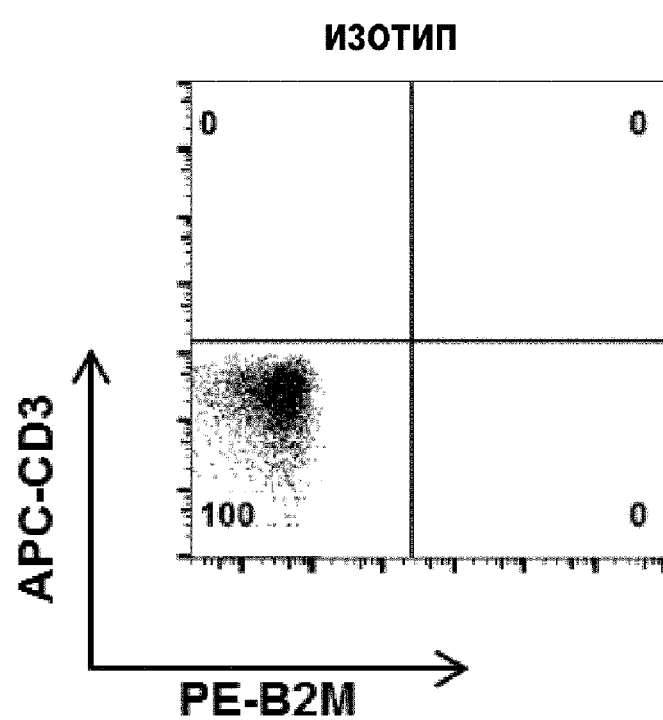
ФИГ.9А





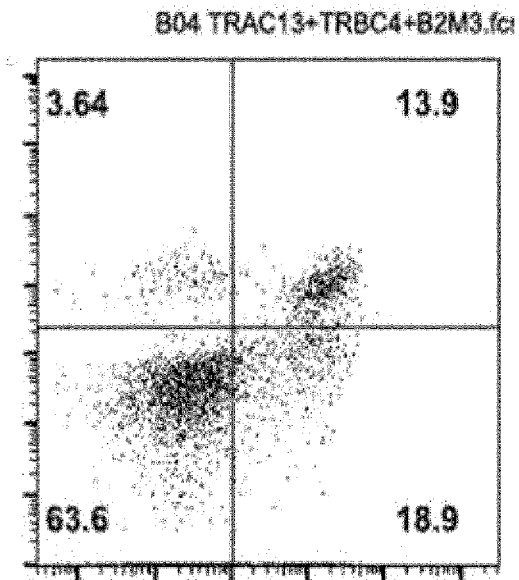
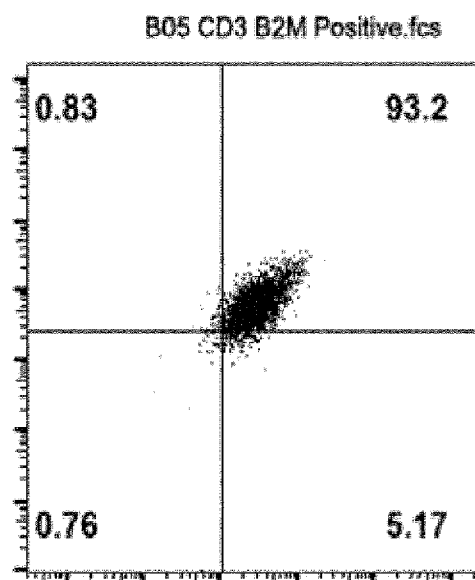
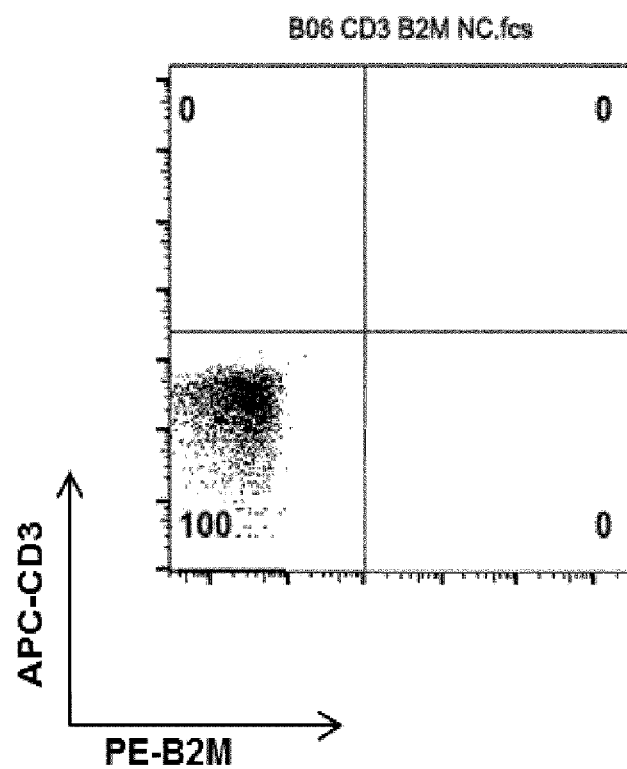


ФИГ.9D



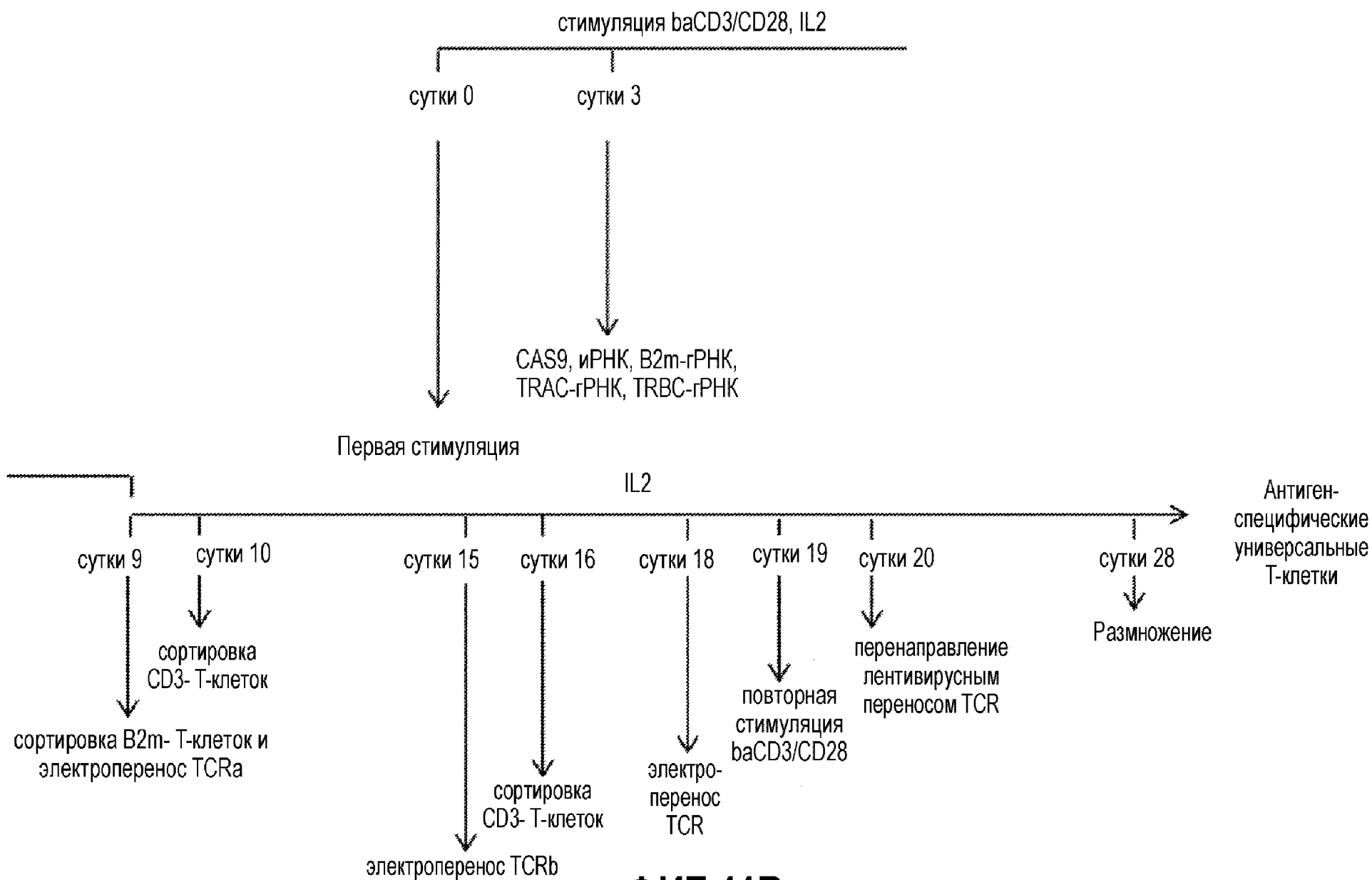
27/142

ФИГ.10



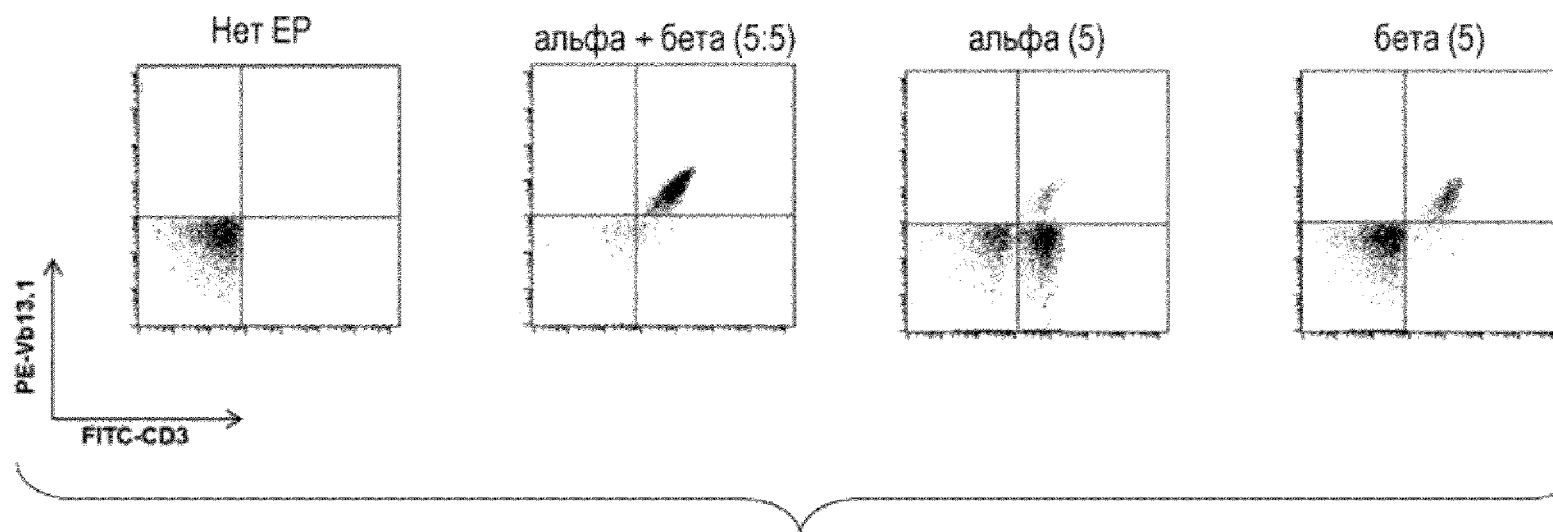
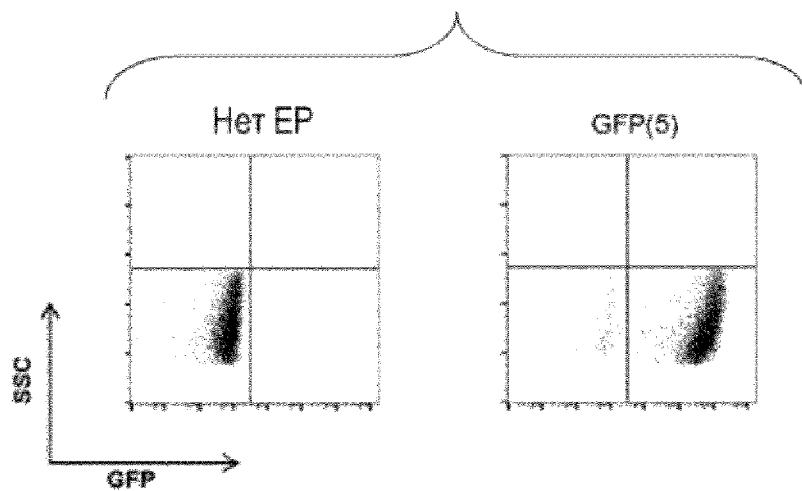
28/142

ФИГ.11А



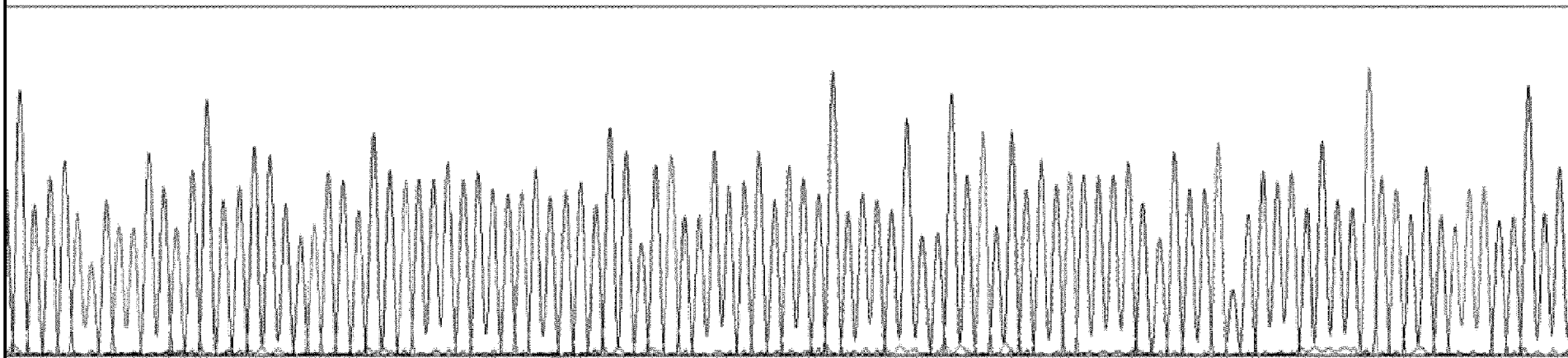
ФИГ.11В

ФИГ.11С



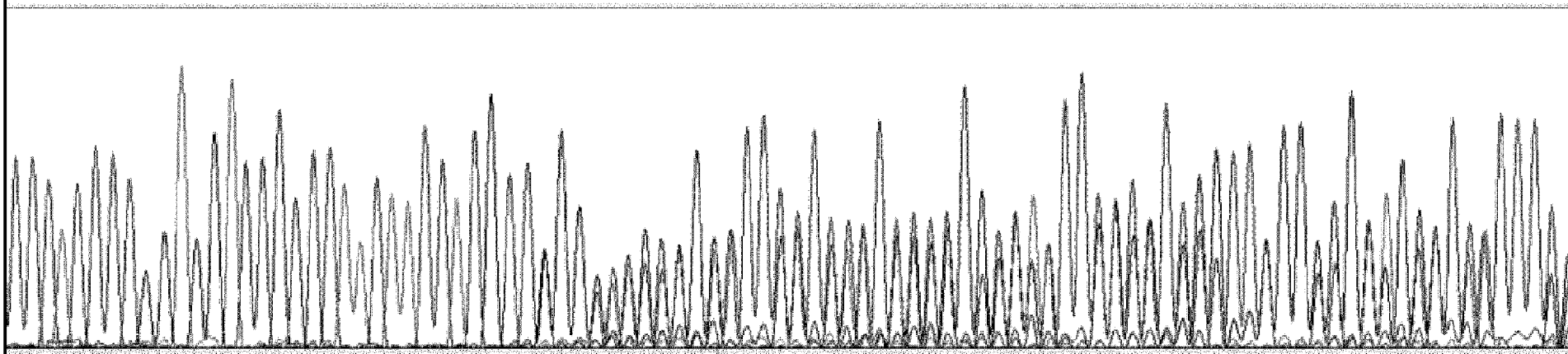
ФИГ.11D

FAS контроль дикого типа



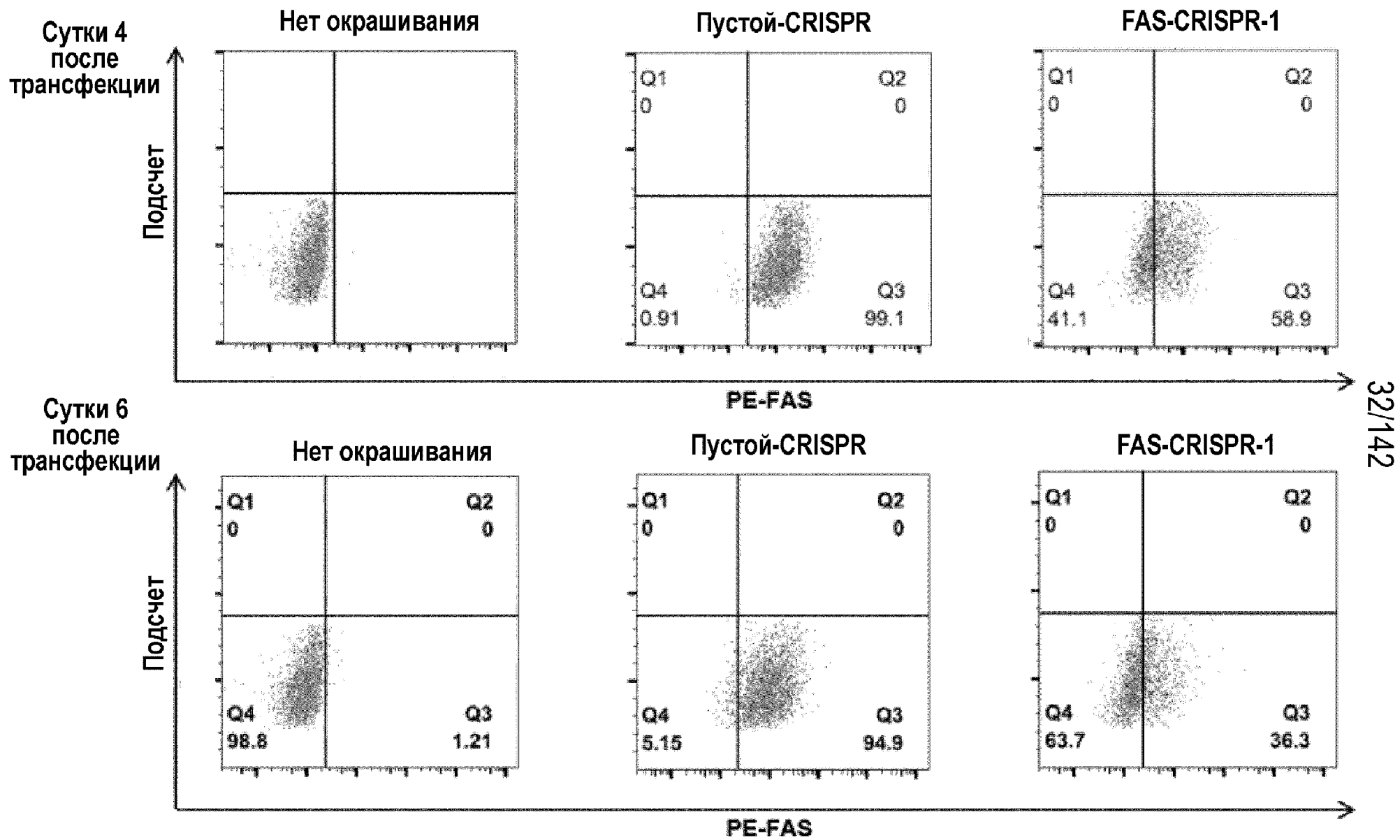
FAS-гPHK-7

CCATGCTGGGCATCTGGACCCTC



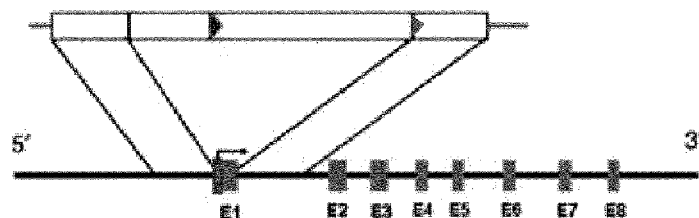
31/142

ФИГ.12А



ФИГ.12В

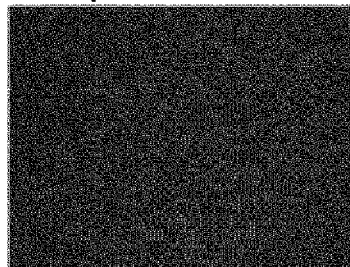
Сутки 7 после селекции



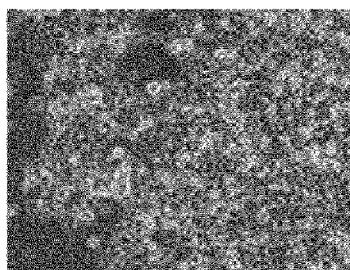
Направленный на FAS вектор

Только направленный вектор, 4x

GFP



BF

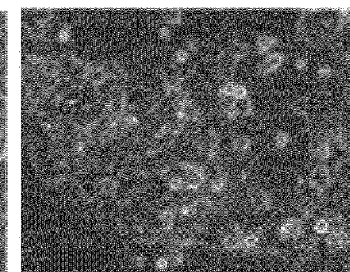
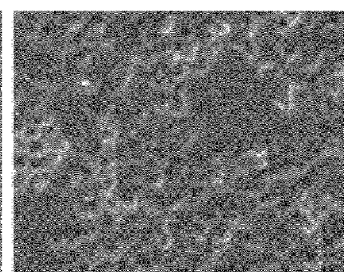
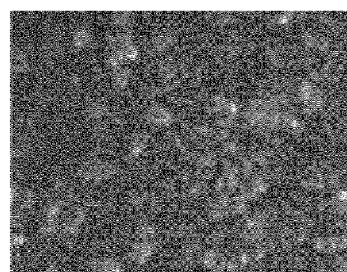
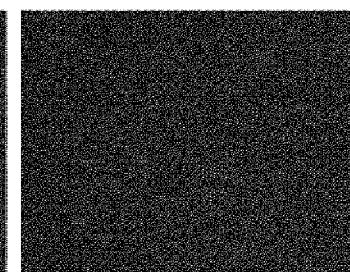
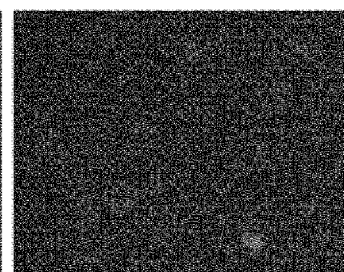
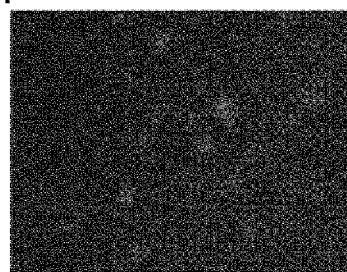


Отношение:

1:1

1:4

1:9



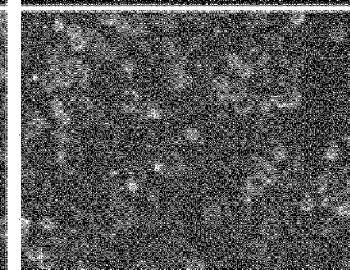
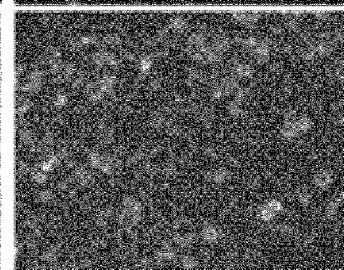
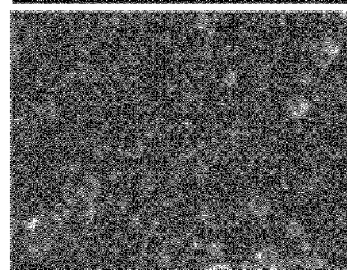
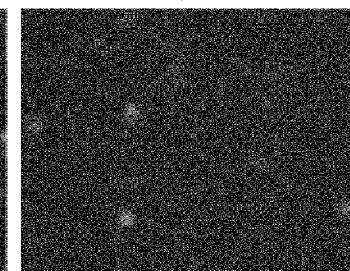
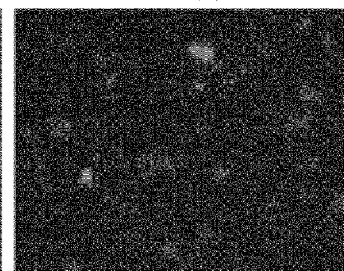
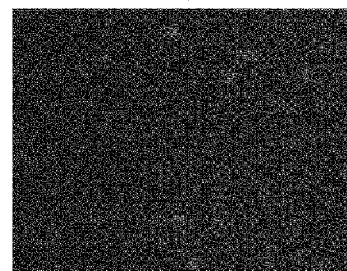
FAS-CRISPR-7 + направленный вектор, 20x

Отношение:

1:1

1:4

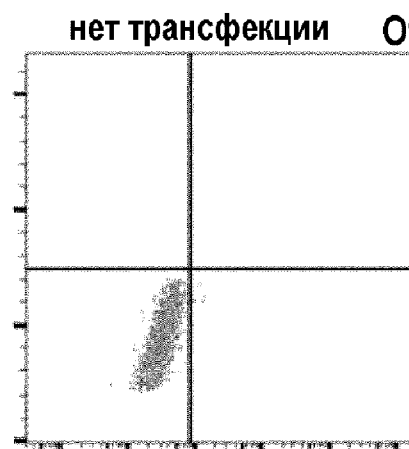
1:9



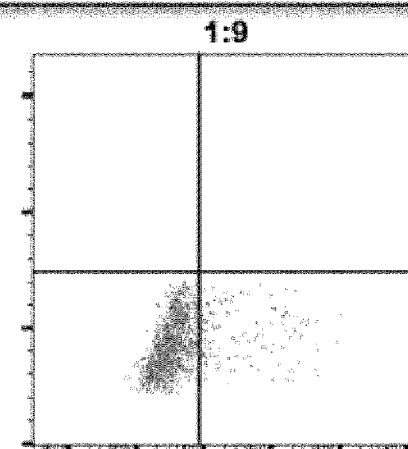
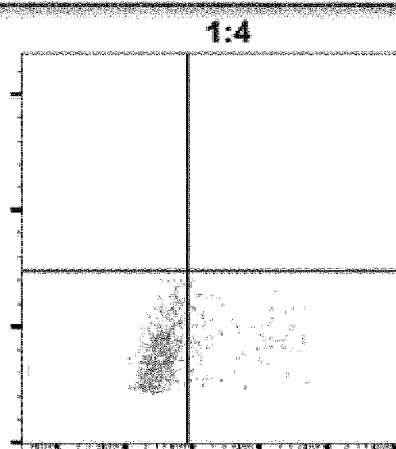
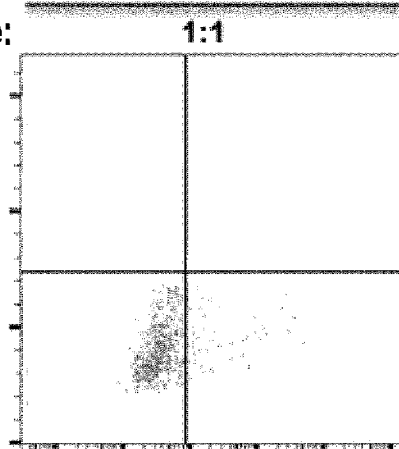
ФИГ.12С

Сутки 7 после селекции

FAS-CRISPR-1 + направленный вектор, 20x

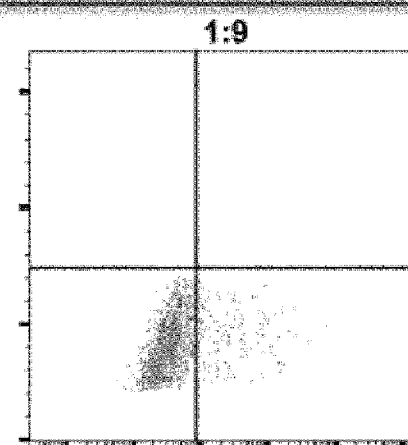
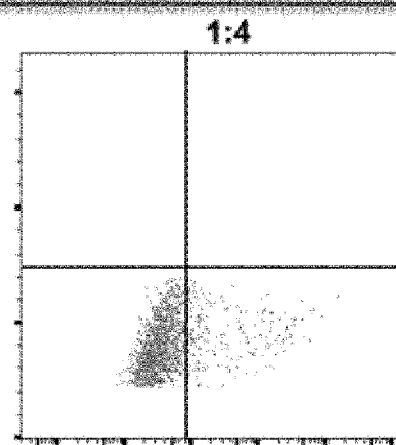
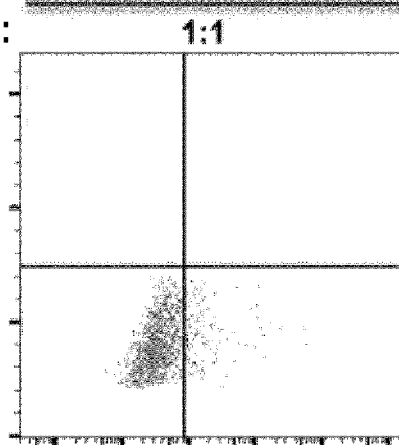


Отношение:

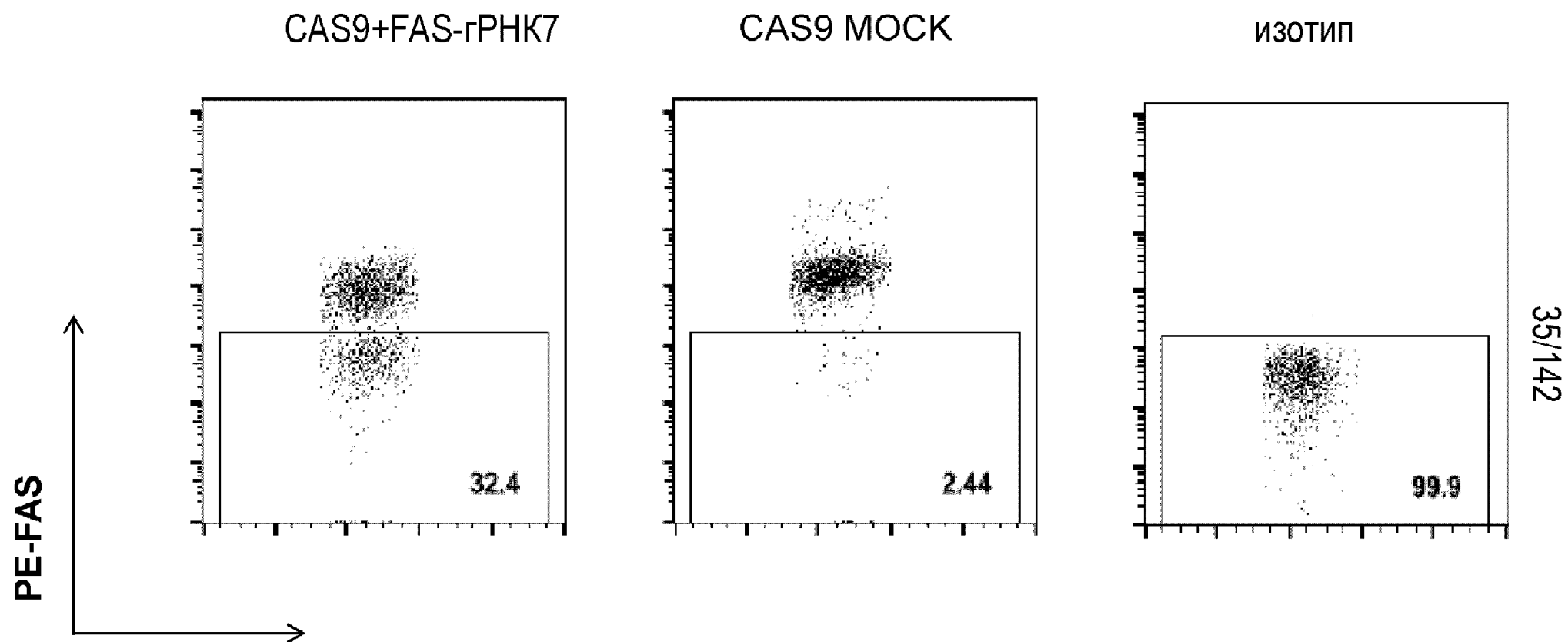


FAS-CRISPR-7 + направленный вектор, 20x

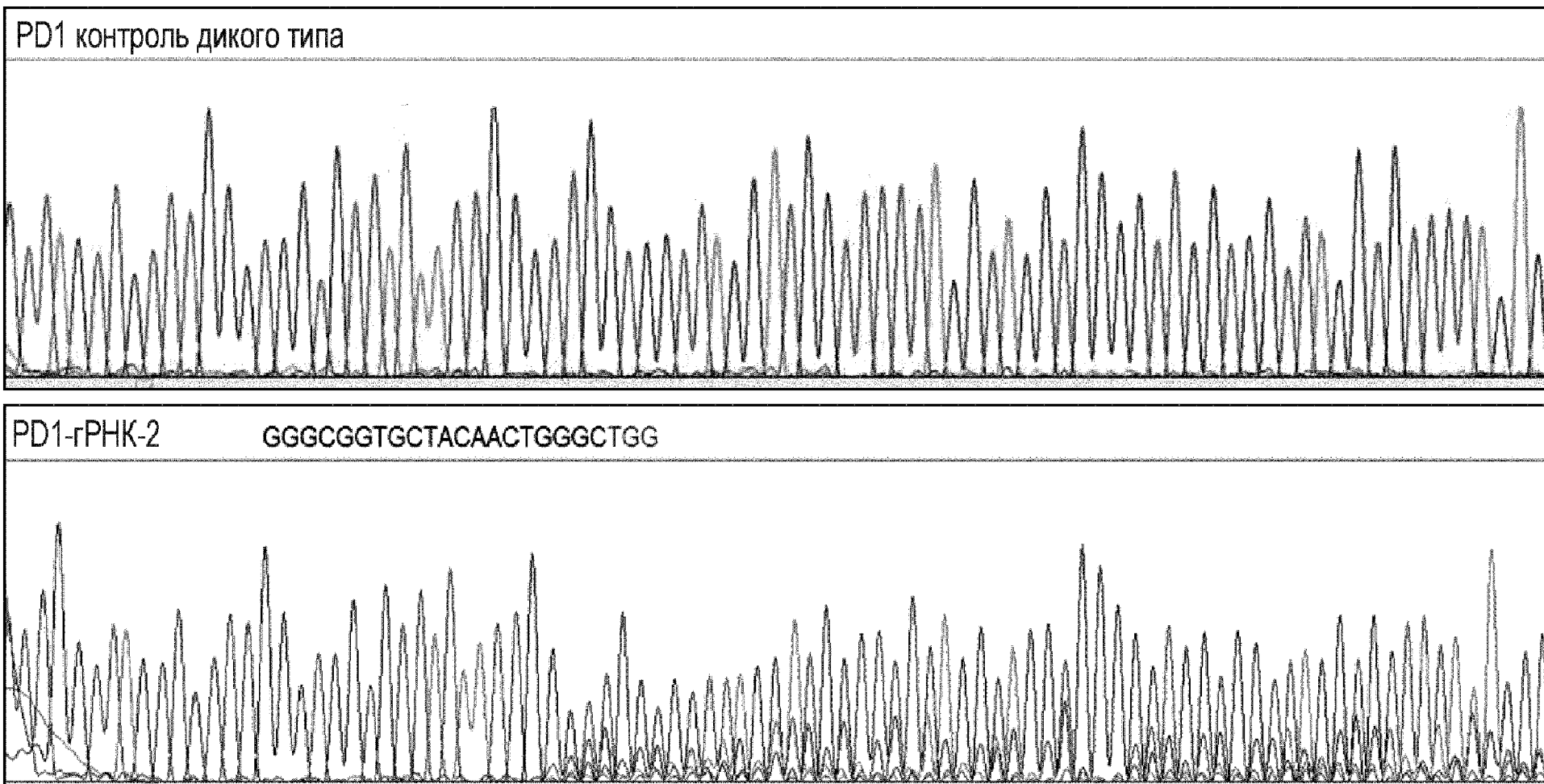
Отношение:



ФИГ.12D

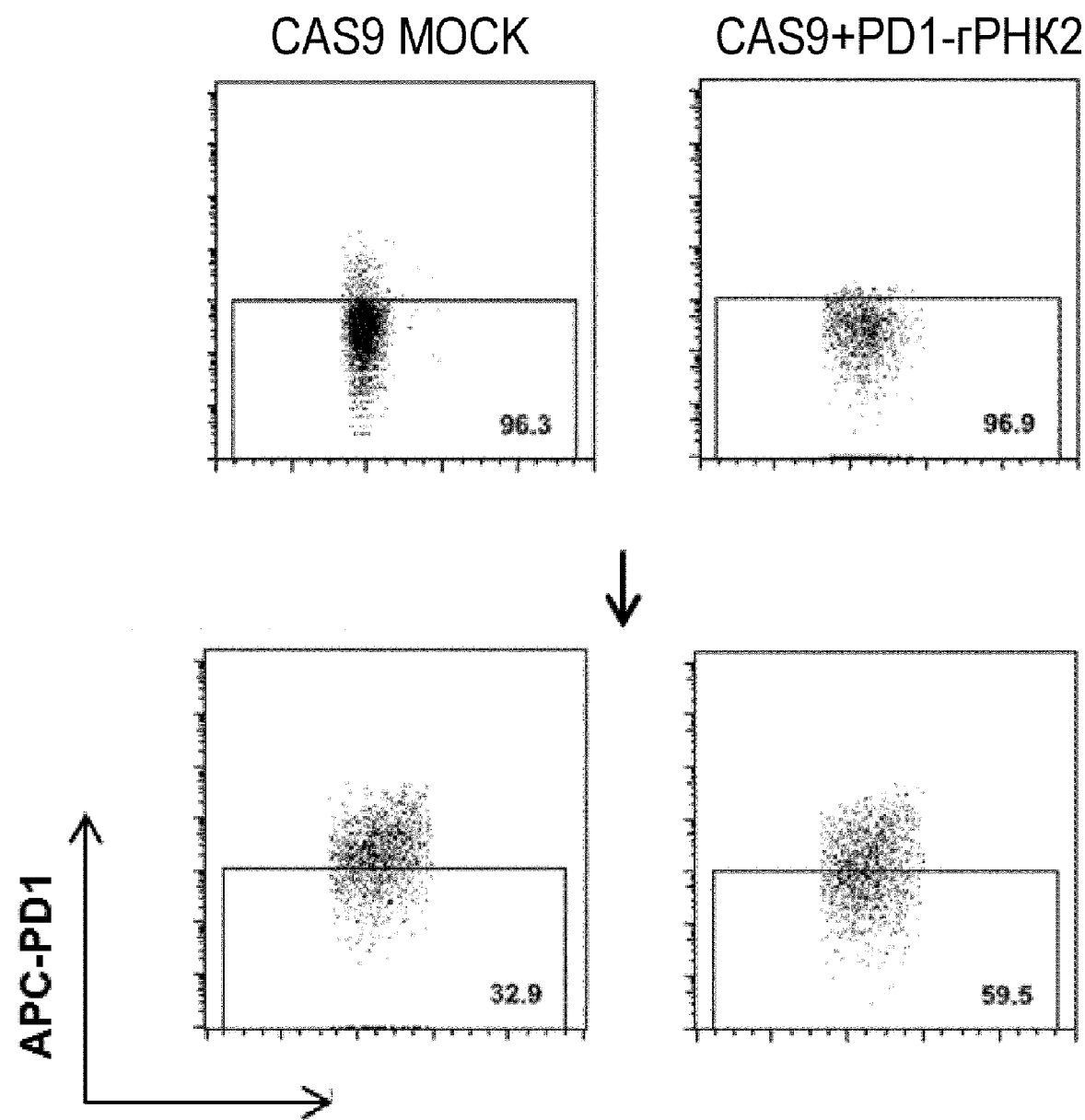


ФИГ.13

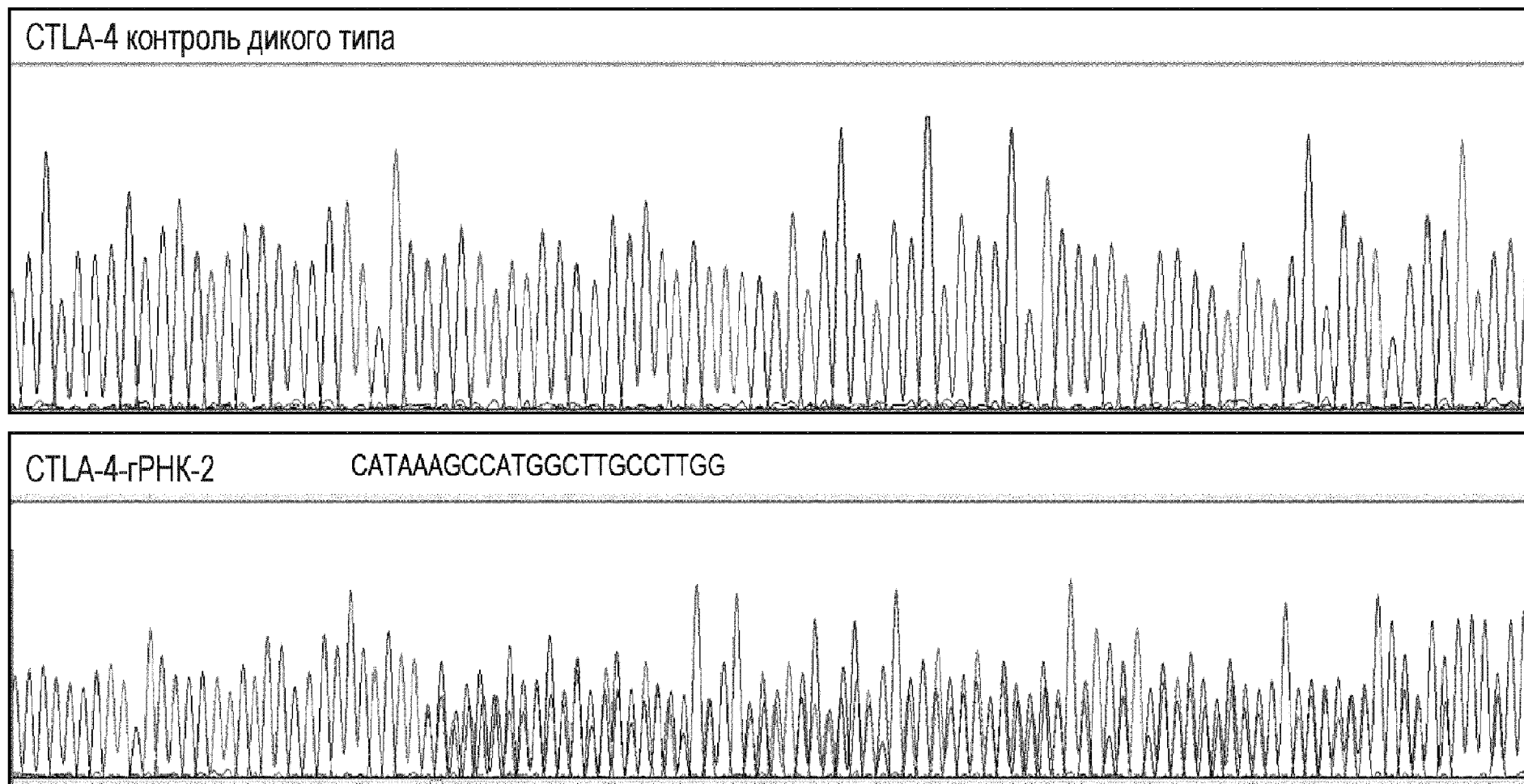


36/142

ФИГ.14А



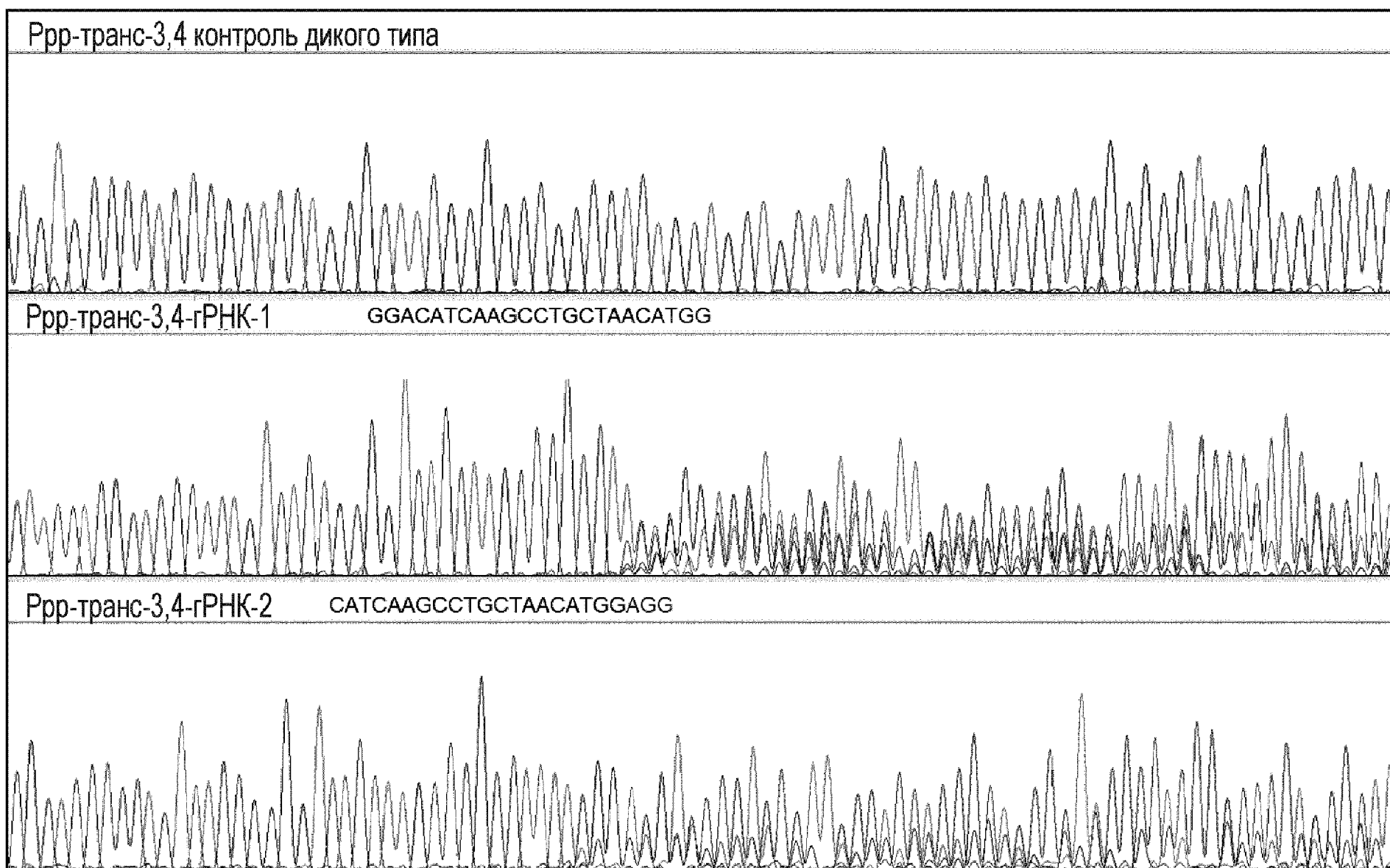
ФИГ.14В



38/142

ФИГ.15А

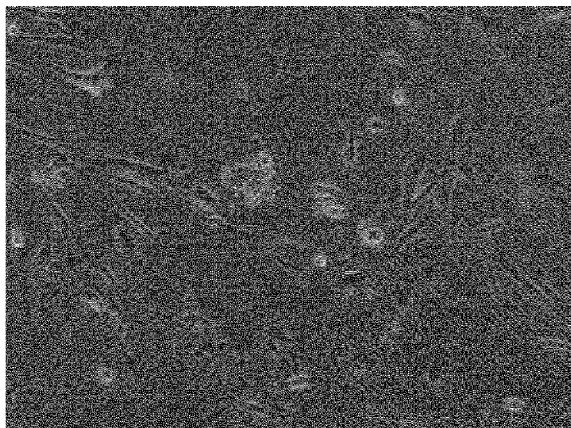
WT		AACACCGCTCCCATAAAGCCATGGCTTGCCTTGGATTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACCT
1	-5	AACACCGCTCCCATAA-----TGGCTTGCCTTGGATTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACCT
1	-2	AACACCGCTCCCATAA--CCATGGCTTGCCTTGGATTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACCT
2	-2	AACACCGCTCCCATAA--CCATGGCTTGCCTTGGATTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACCT
2	+1	AACACCGCTCCCATAAAGTCCATGGCTTGCCTTGGATTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACC
3	-1	AACACCGCTCCCATAAA-CCATGGCTTGCCTTGGATTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACCT
3	-14	AACACCGCTCCCATAAAG-----GGATTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACCT
-7	-5	AACACCGCTCCCATAA-----TGGCTTGCCTTGGATTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACCT
-7	-5	AACACCGCTCCCATAA-----TGGCTTGCCTTGGATTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACCT
10	-1	AACACCGCTCCCATAAA-CCATGGCTTGCCTTGGATTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACCT
10	-3	AACACCGCTCCCATA--CCATGGCTTGCCTTGGATTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACCT
11	-5	AACACCGCTCCCATAA-----TGGCTTGCCTTGGATTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACCT
11	-0	AACACCGCTCCCATAAAGCCATGGCTTGCCTTGGATTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACCT



40/142

ФИГ.16

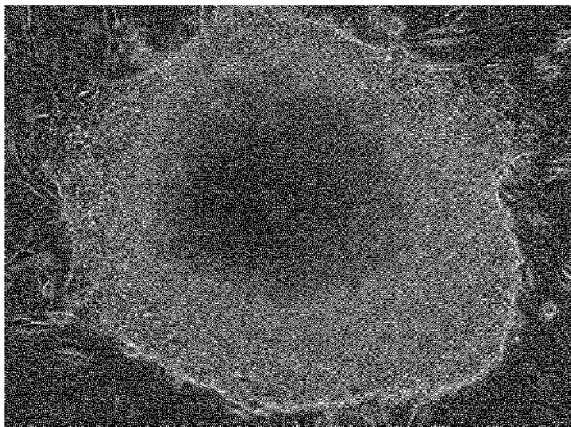
Сутки 4



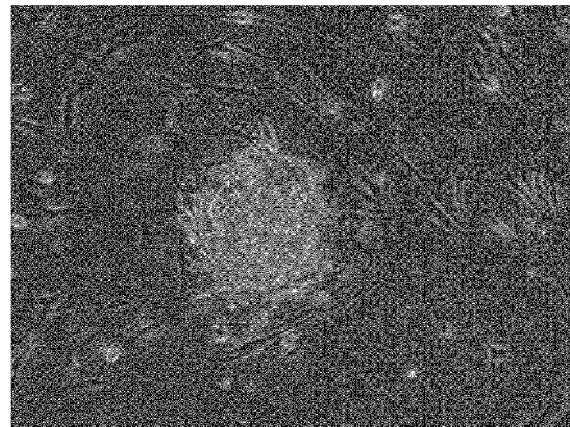
Сутки 12



Сутки 18



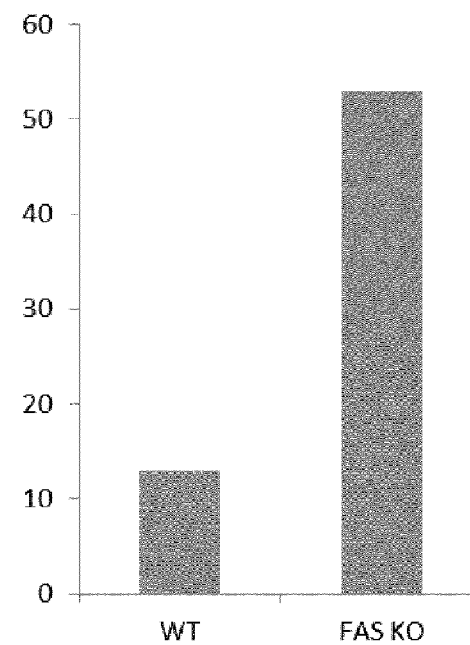
неполное перепрограммирование iPSC сутки 18



Пассаж 0

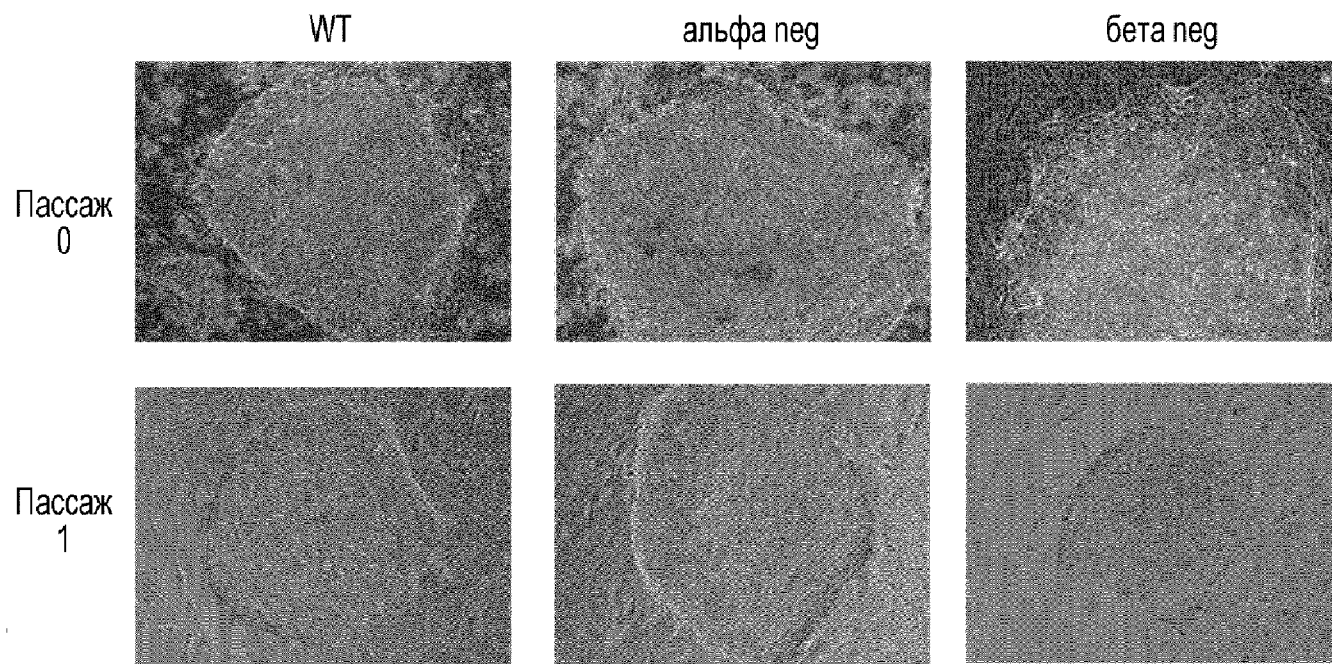
ФИГ.17А

Число колоний

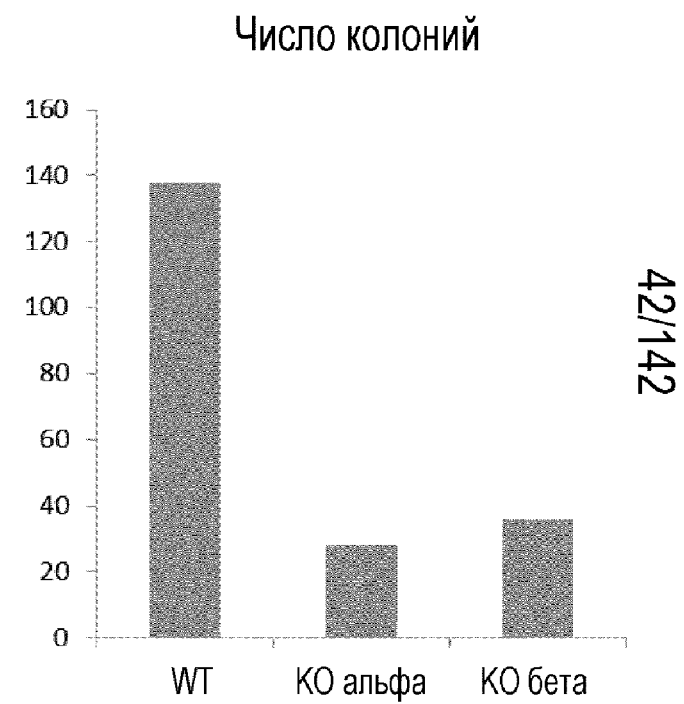


41/142

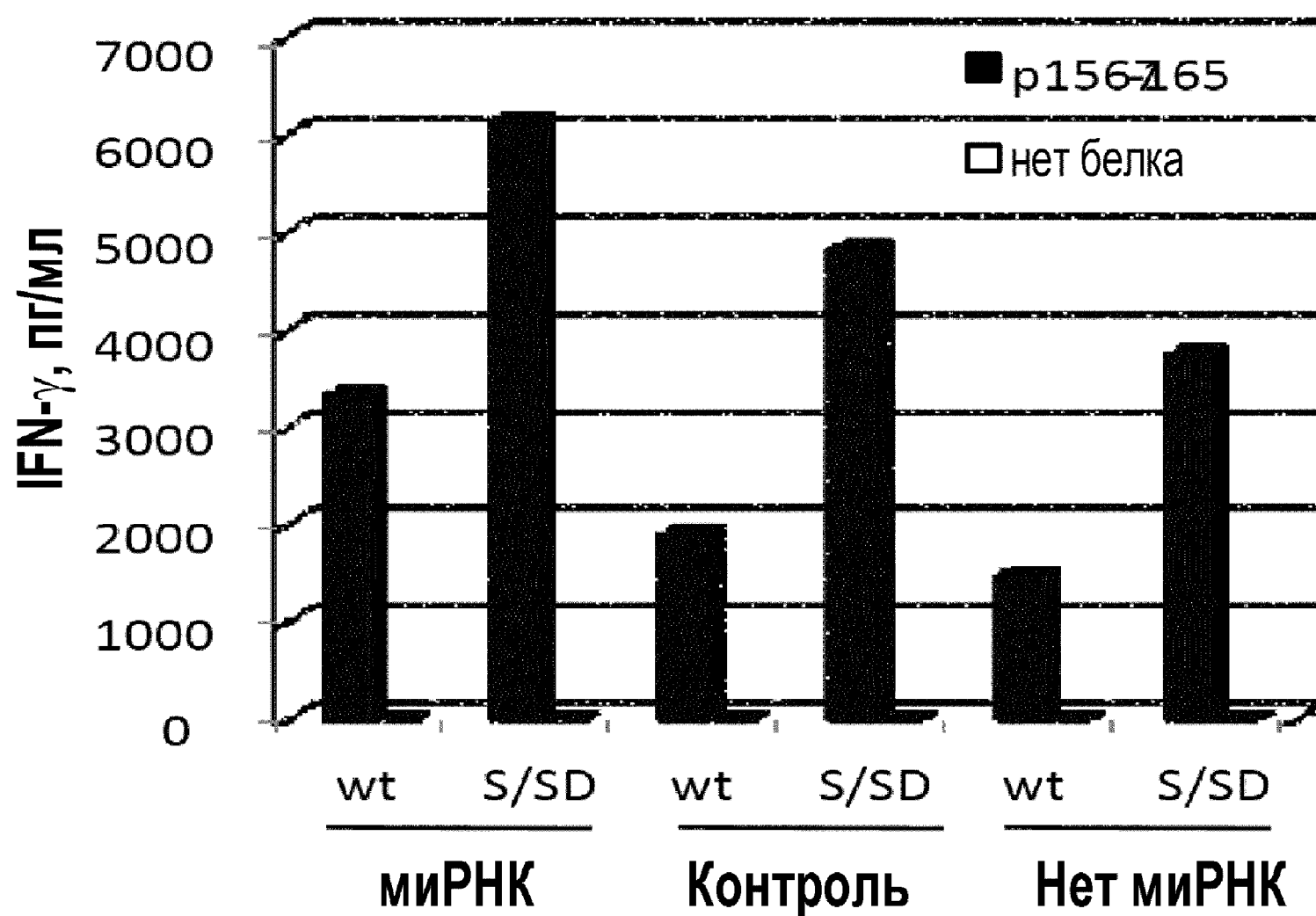
ФИГ.17В



ФИГ.18А



ФИГ.18В



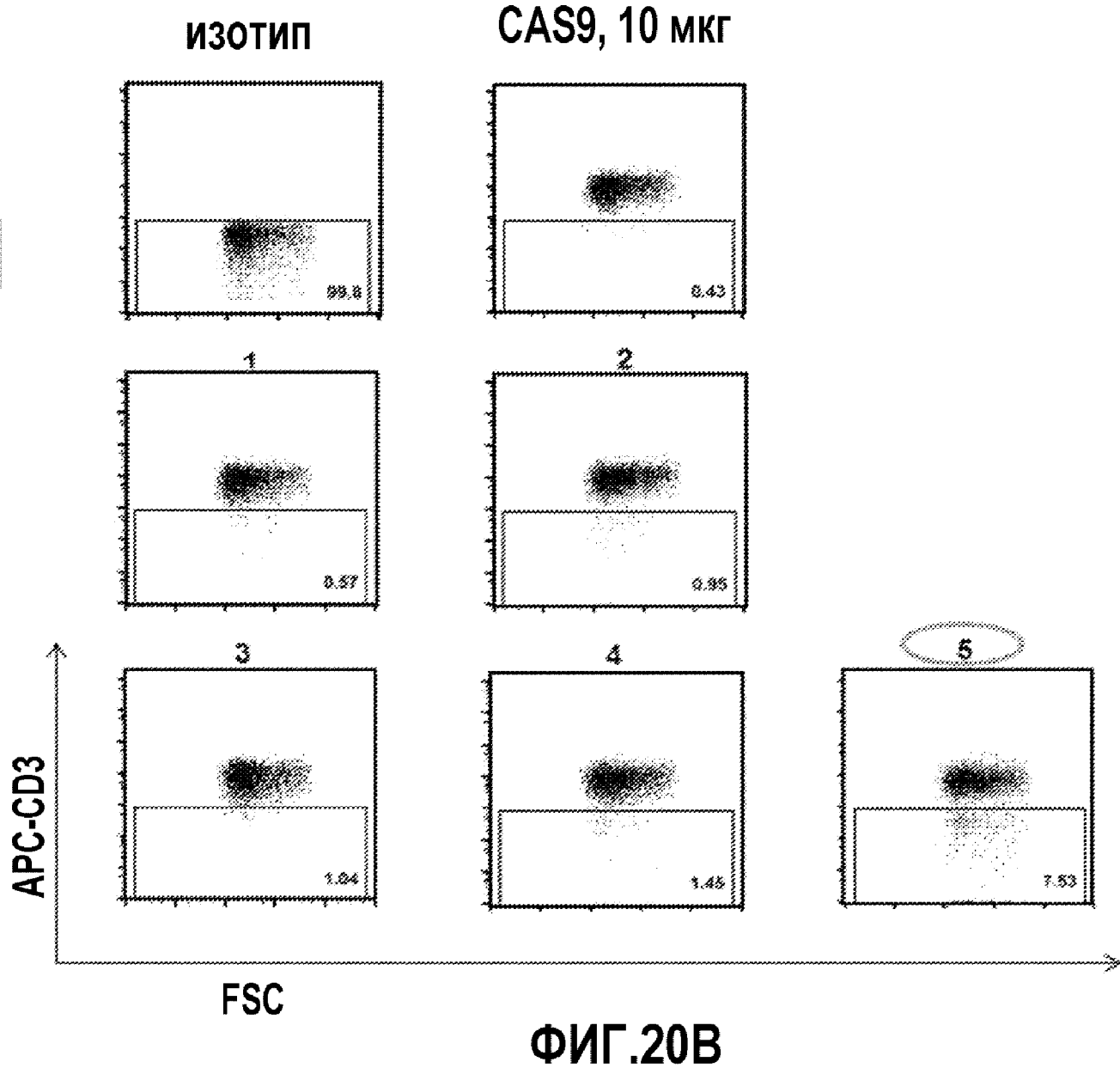
Wt: TCR дикого типа

S/SD: второй дисульфидный мостик альфа/второй дисульфидный мостик + де-N-гликозилирование бета

ФИГ.19

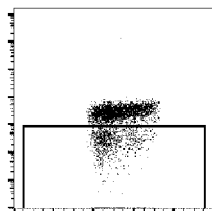
	CAS9	Доза	гРНК	Доза
1	CAS9	2 мкг	TRAC7	1 мкг
2	CAS9	4 мкг	TRAC7	2 мкг
3	CAS9	8 мкг	TRAC7	4 мкг
4	CAS9	10 мкг	TRAC7	5 мкг
5	CAS9	20 мкг	TRAC7	10 мкг

ФИГ.20А

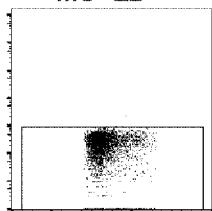


TRAC-5

MS

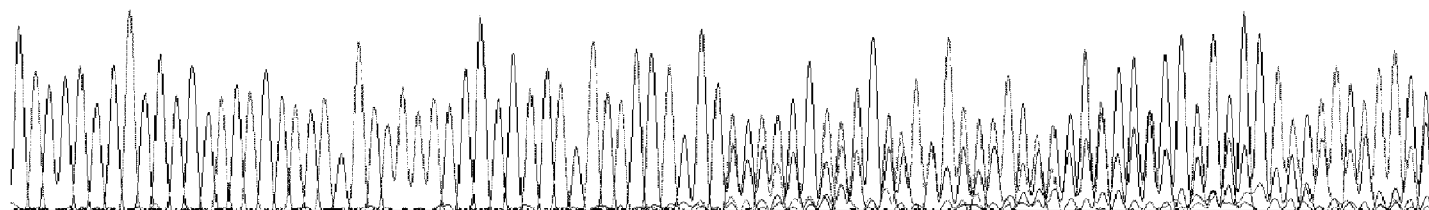
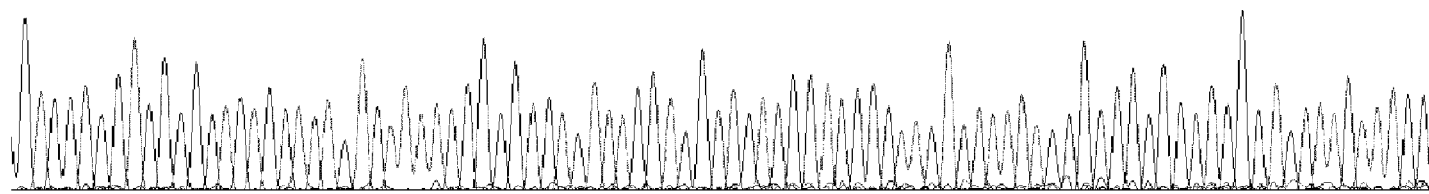


MS+LD



TRAC-rPHK-5

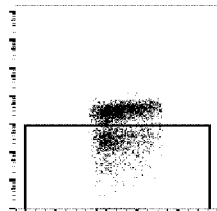
TGTGCTAGACATGAGGTCTATGG



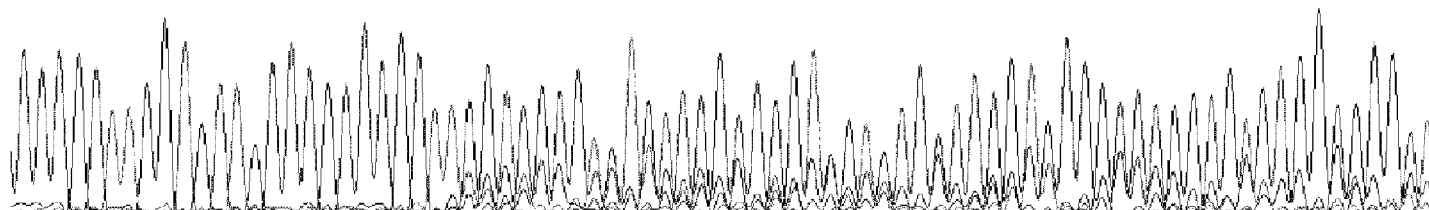
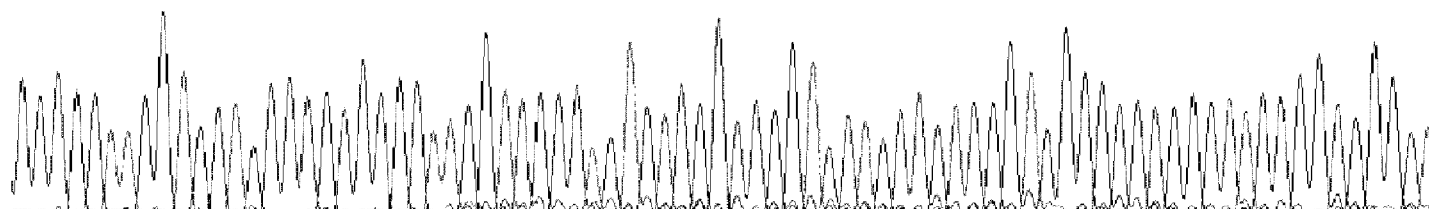
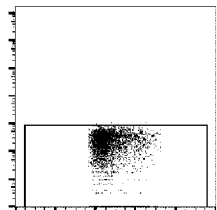
TRBC-rPHK-7

CCCTCAATGACTCCAGATACTGC

MS



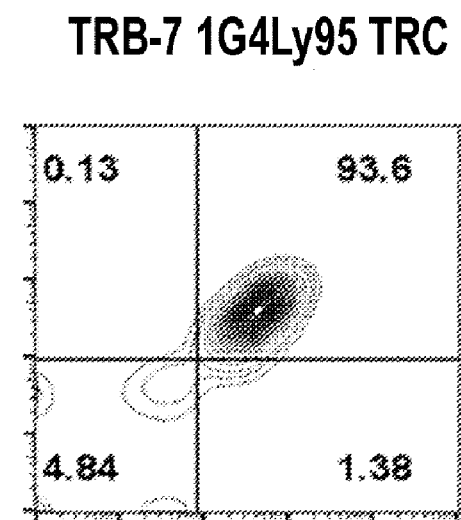
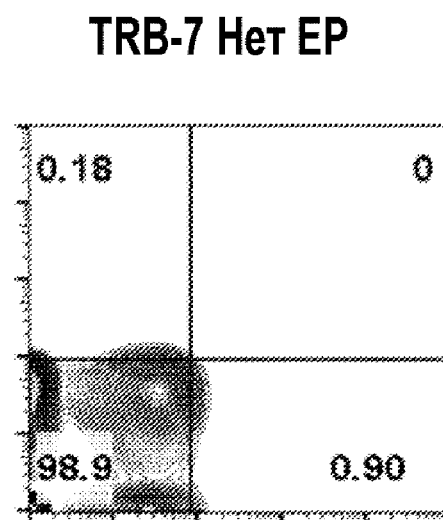
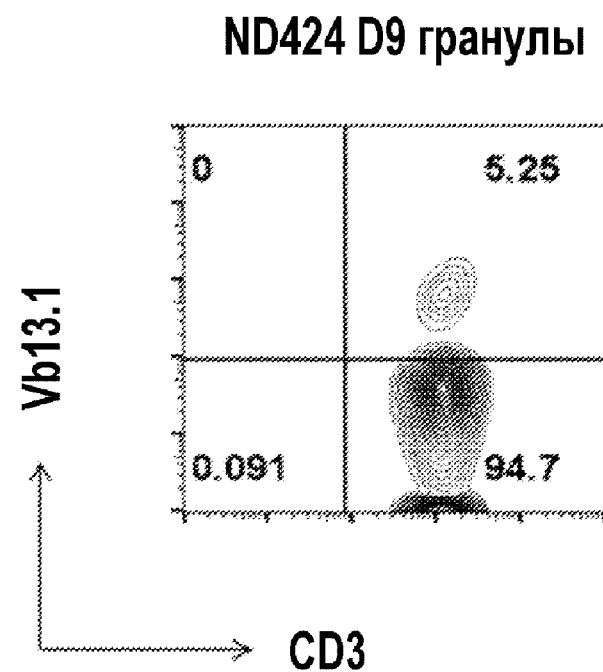
MS+LD



TRBC-7

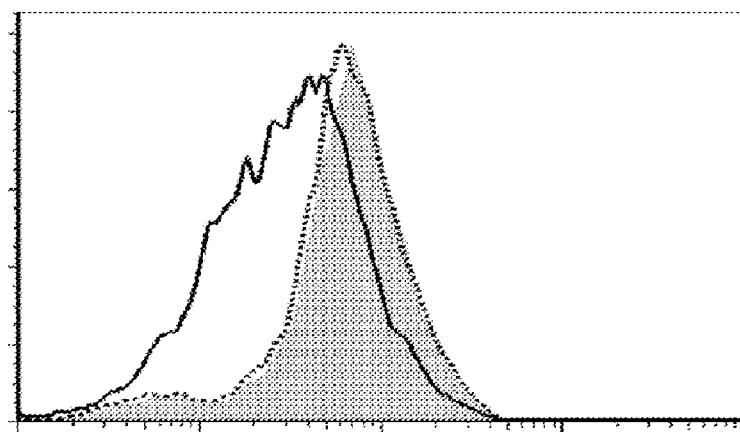
45/142

ФИГ.21



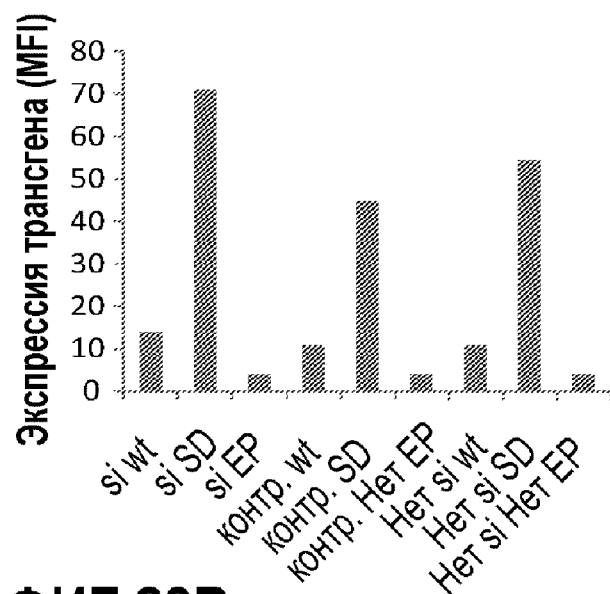
46/142

ФИГ.22

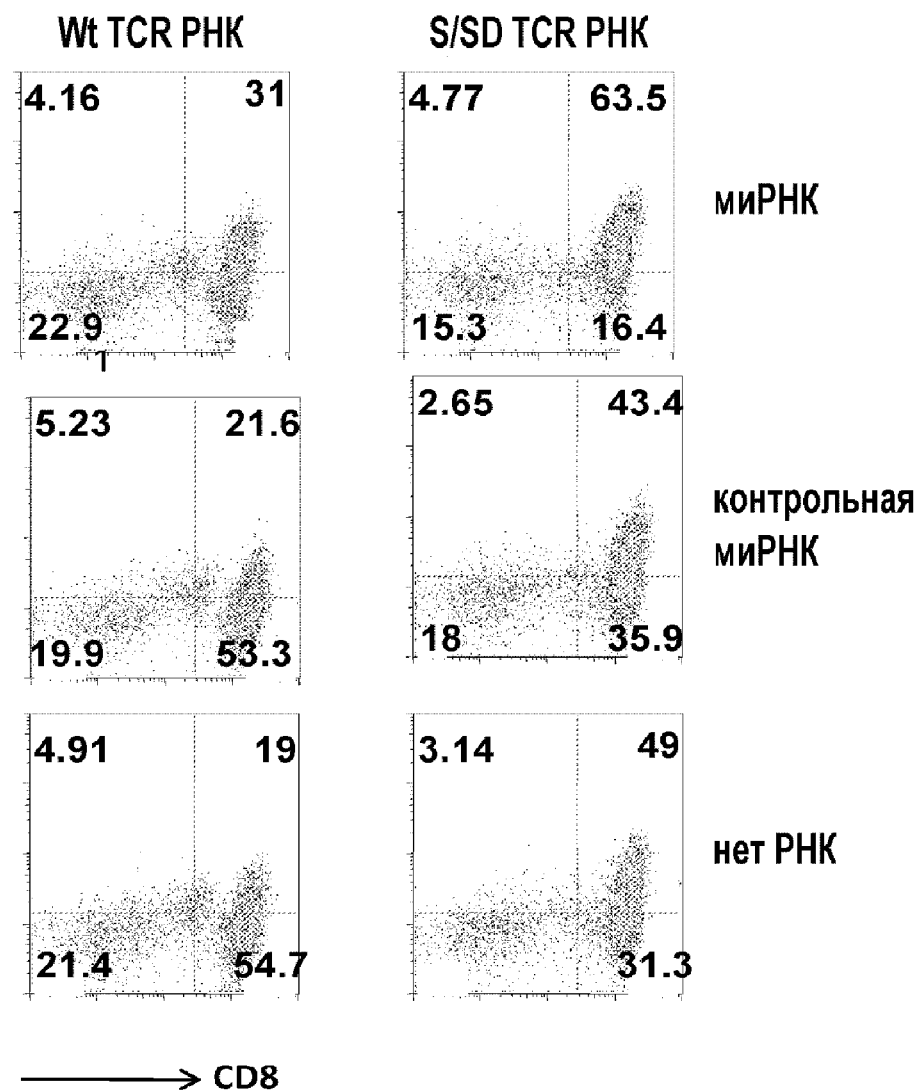


TCR альфа/бета

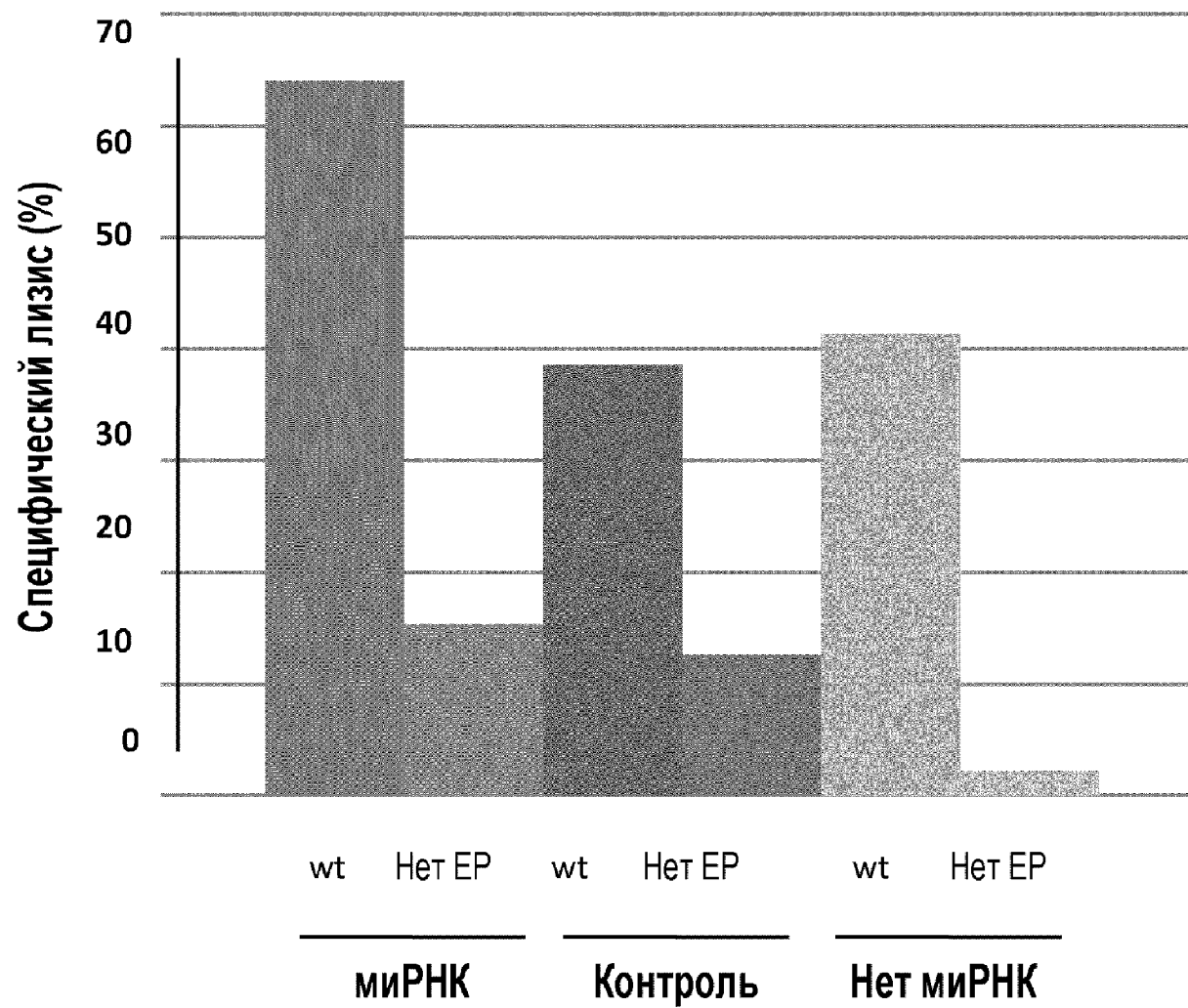
ФИГ.23А



ФИГ.23В



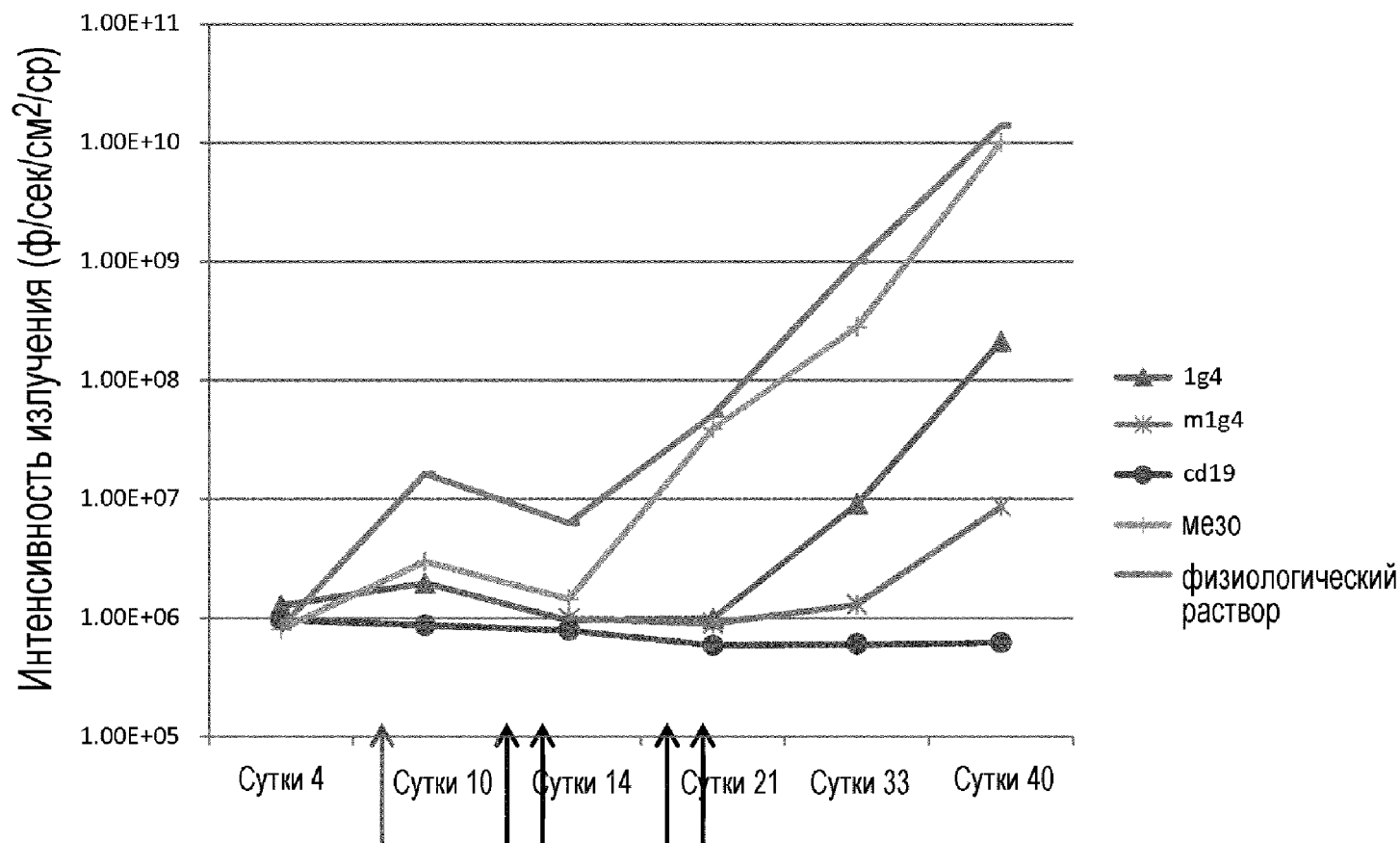
ФИГ.23С



ФИГ.23D

Группы обработки:

1. 1g4: 1G4 TCR дикого типа
2. m1g4: мутантный 1G4 TCR
3. CD19: CD19BBZ CAR
4. мезо: ss1BBZ CAR
5. физиологический раствор



Циклофосфамид
60 мг/кгх1



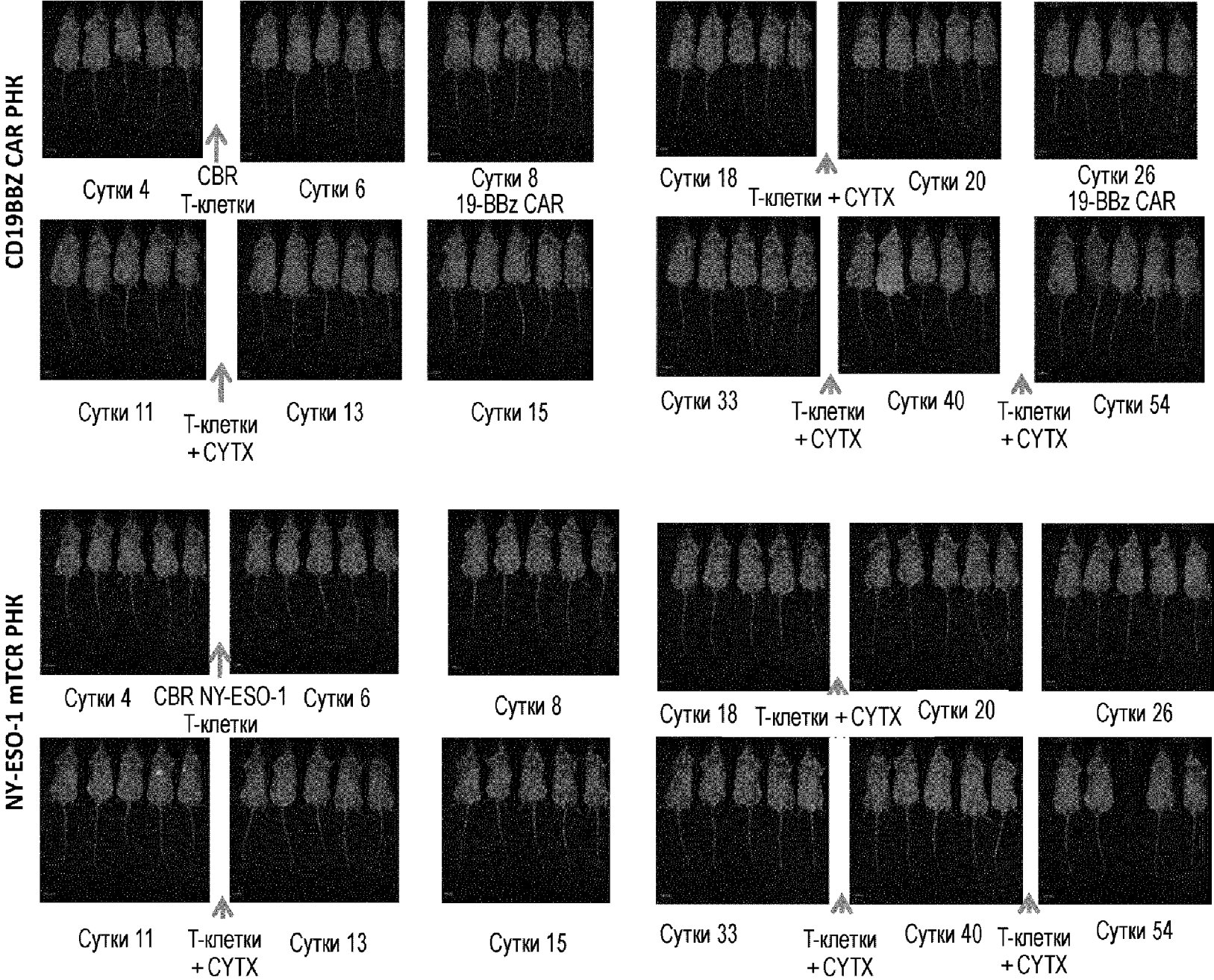
CBR Т-клетки 20х10⁶



не-CBR Т-клетки 5х10⁶

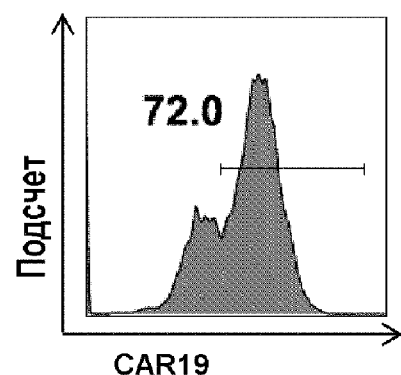
ФИГ.24

ФИГ.25

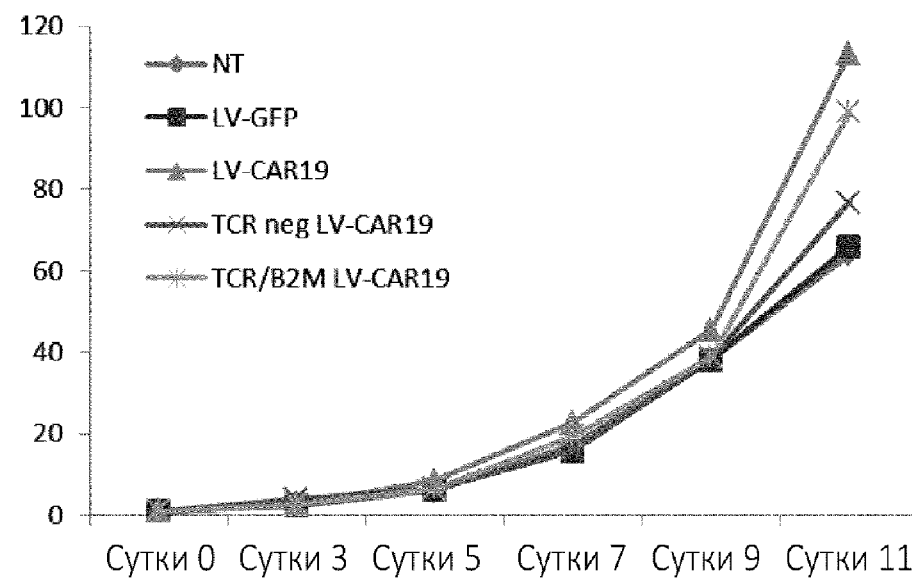


Кратность увеличения	Сутки 0	Сутки 3	Сутки 5	Сутки 7	Сутки 9	Сутки 11	Конечное число
NT	1	2	6	17	38	64	320
LV-GFP	1	3	6	16	38	66	330
LV-CAR19	1	3	8	23	45	113	1700
TCR neg LV-CAR19	1	4	6	16	38	77	2300
TCR/B2M LV-CAR19	1	3	6	19	39	99	1680

NT, LV-GFP, LV-CAR19,
TCR neg LV-CAR19, TCR/B2M neg LV-CAR19

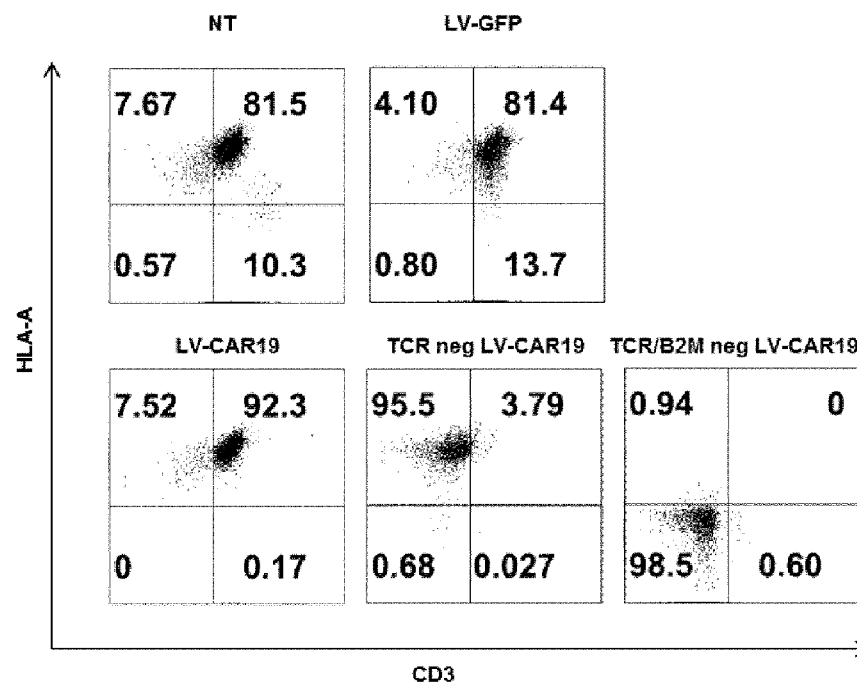


ЕР иРНК CAR19, стимуляция K19/КТ



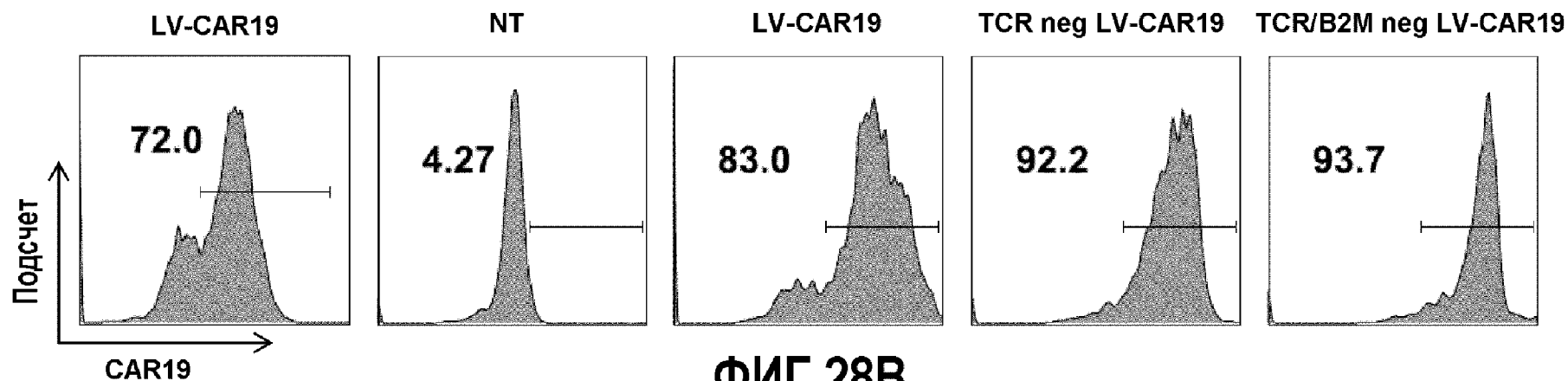
ФИГ.27

ФИГ.28А

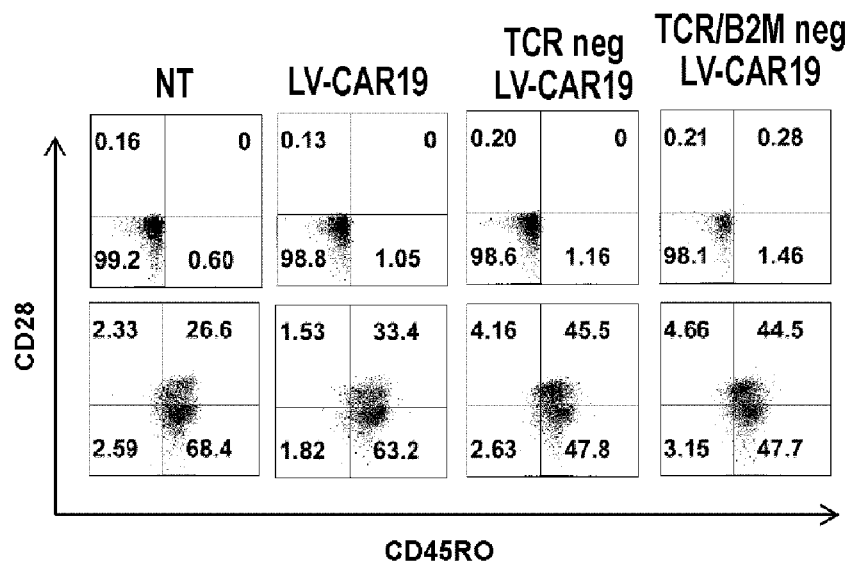


53/142

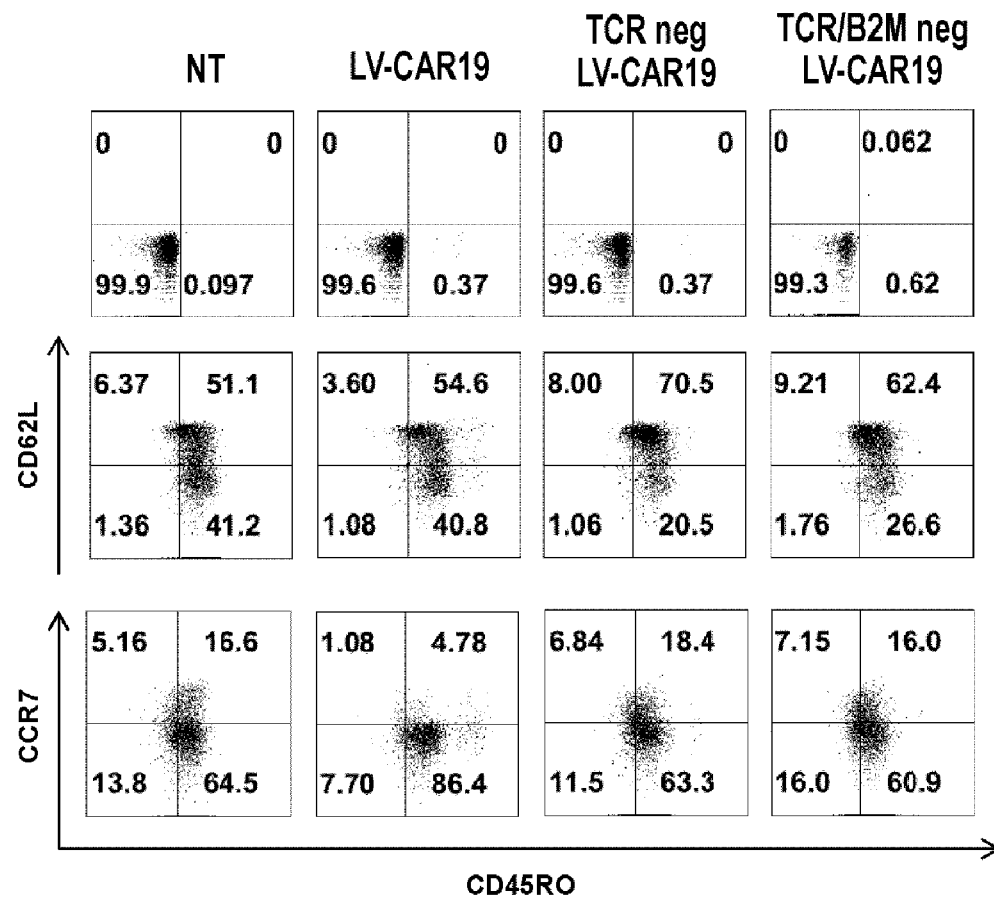
После повторной стимуляции K19/КТ



ФИГ.28В

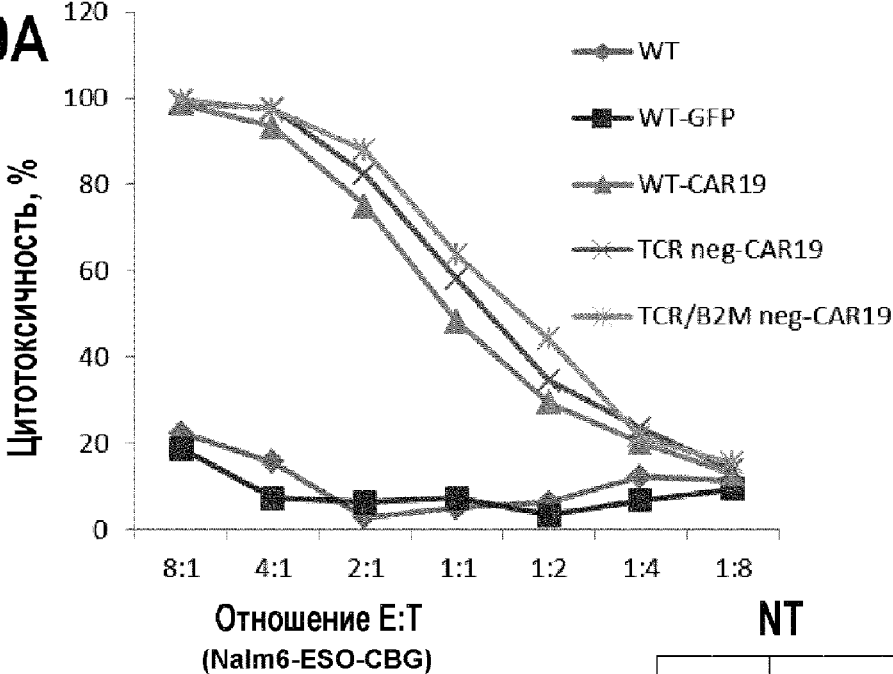


ФИГ.29А

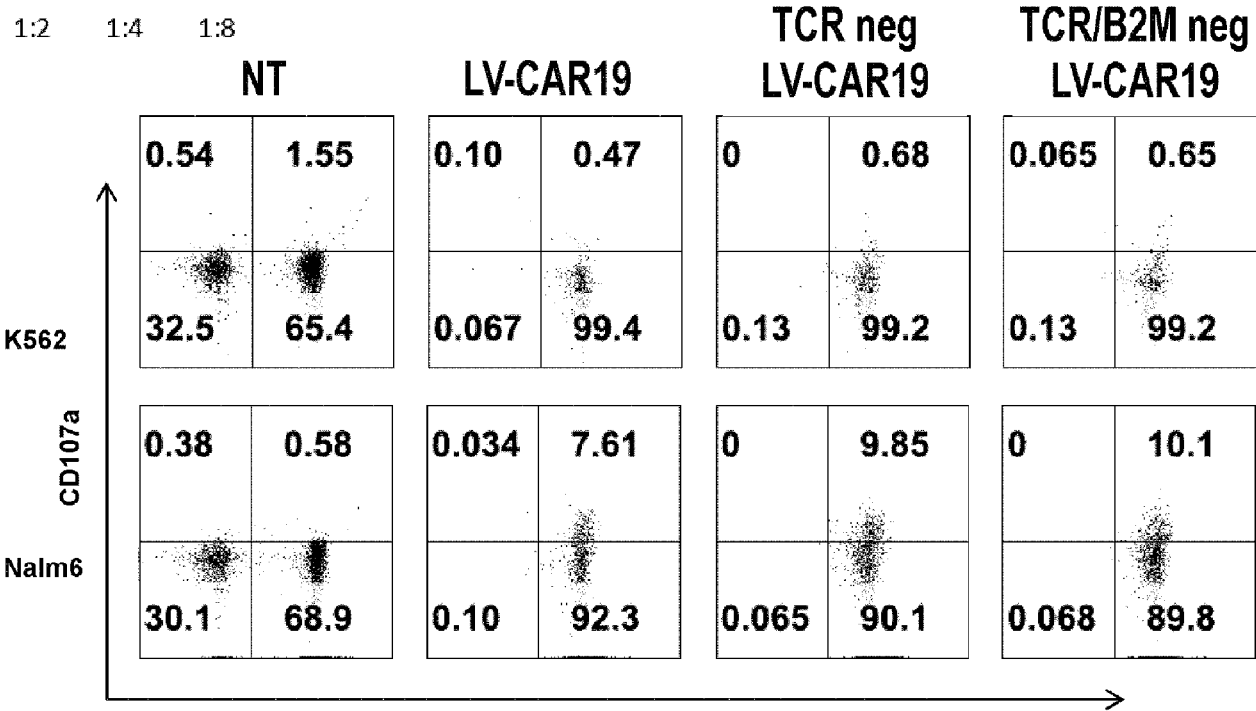


ФИГ.29В

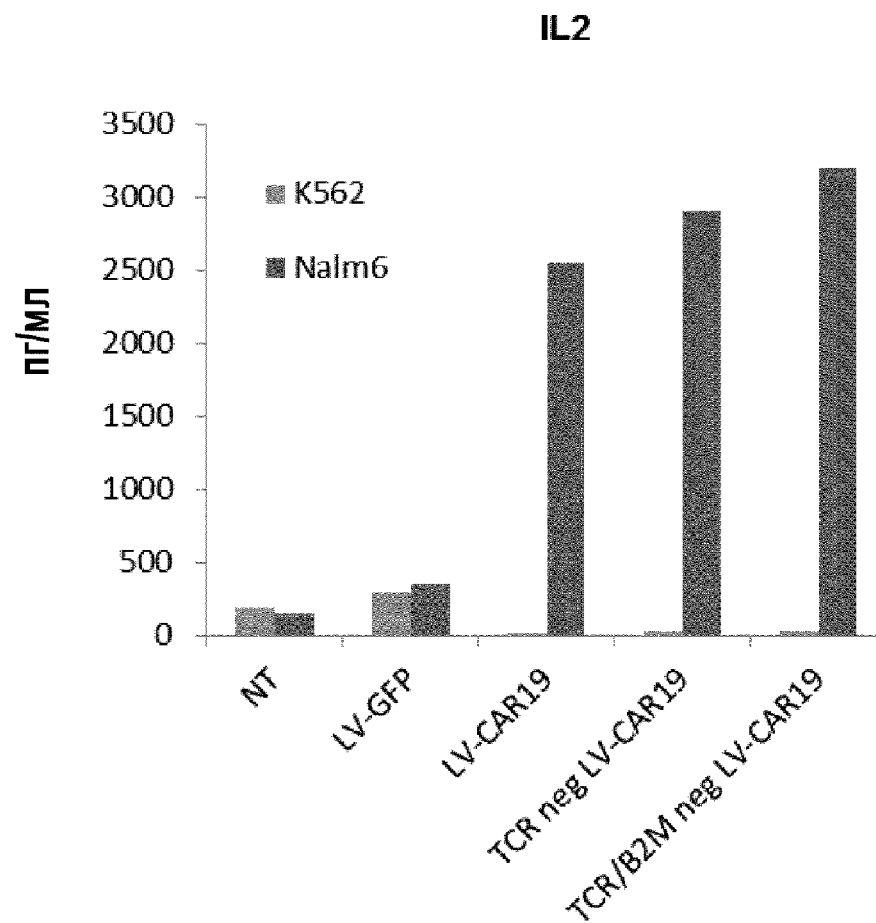
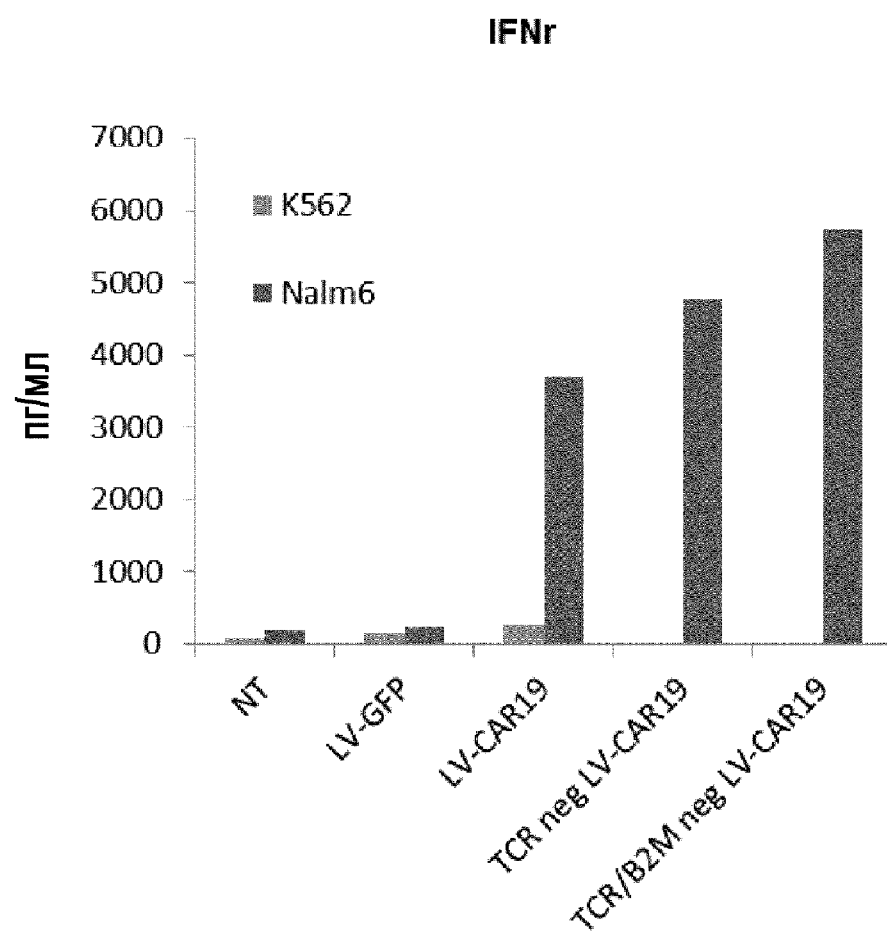
ФИГ.30А



ФИГ.30В

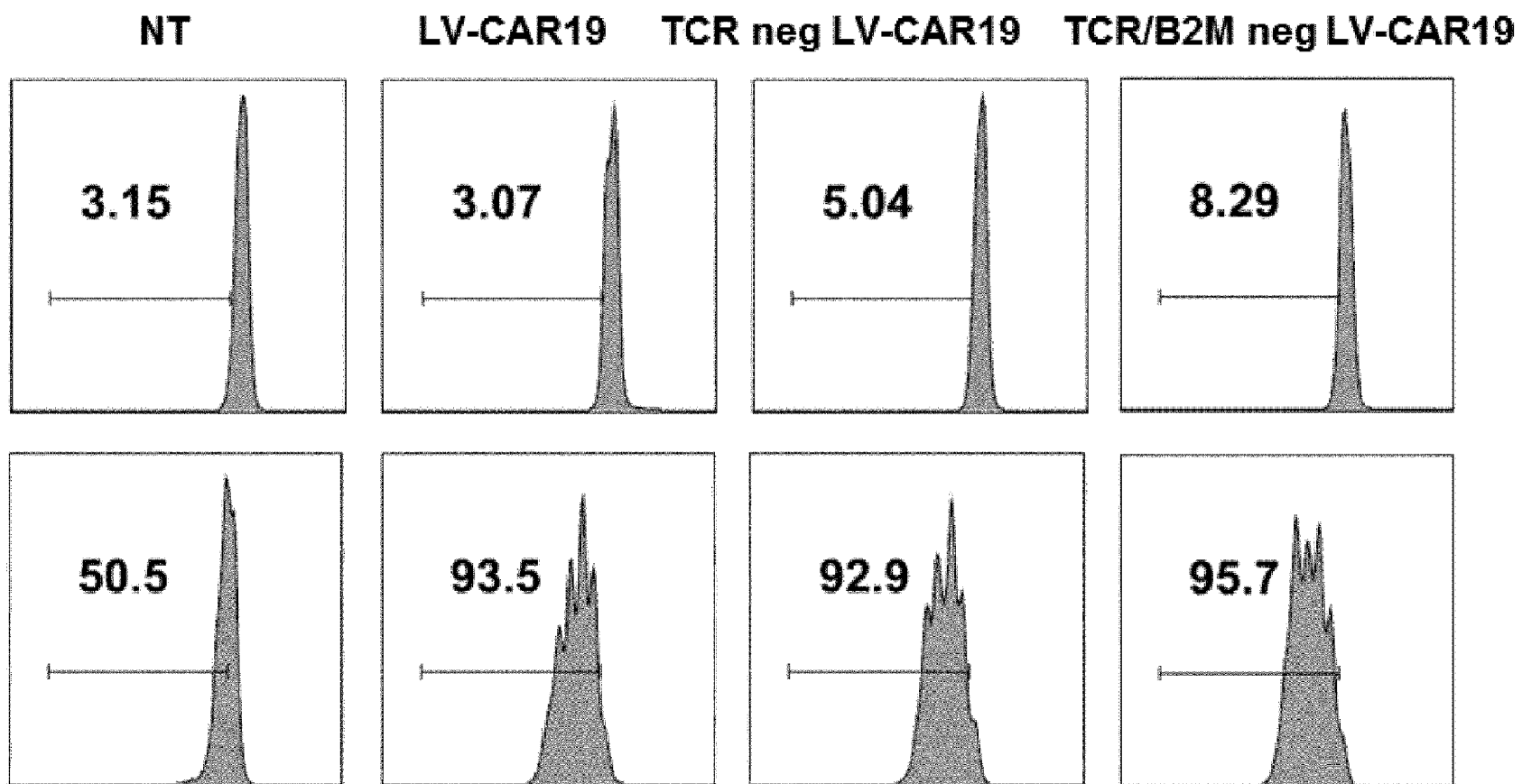


55/142



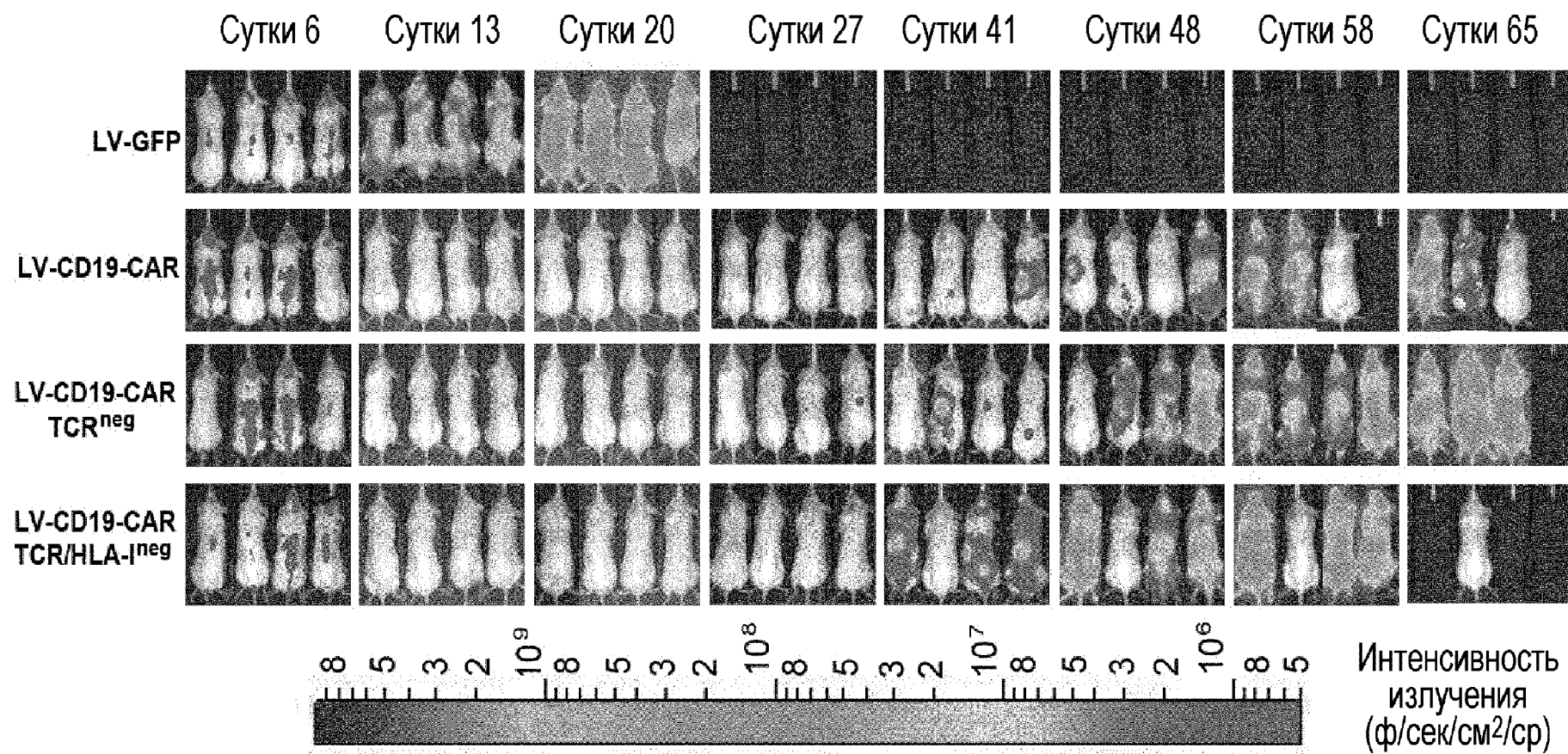
56/142

ФИГ.30С



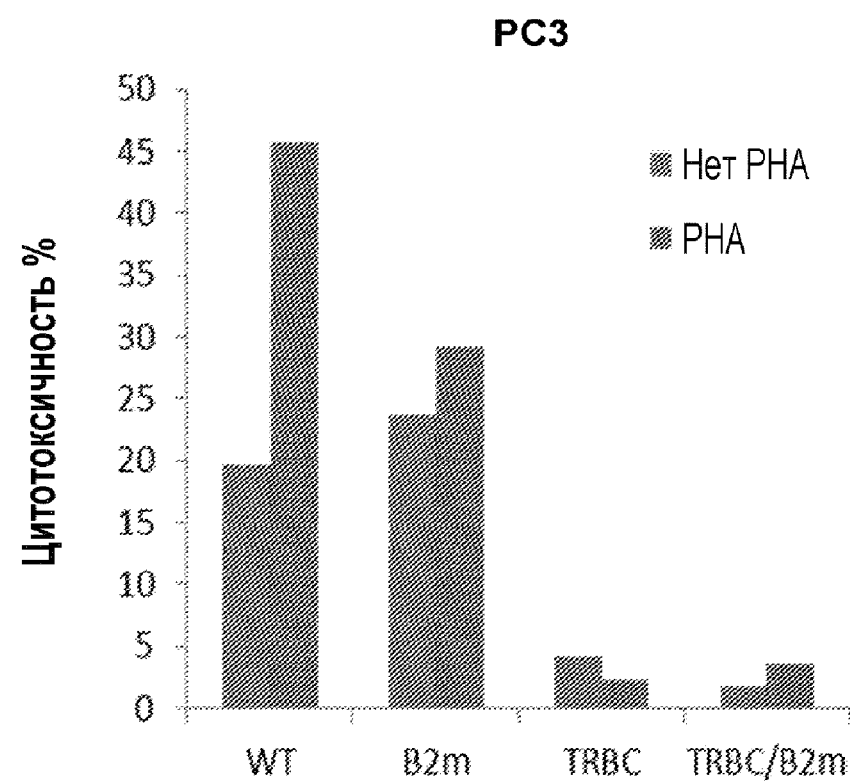
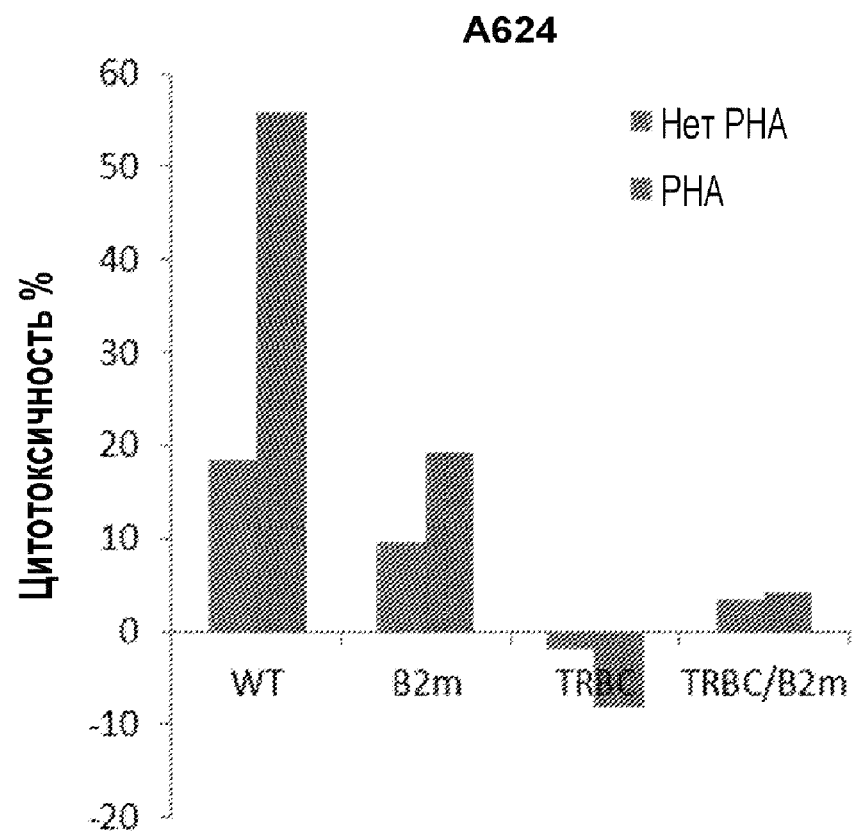
Отношение Е:Т составляет 1:2

ФИГ.30D



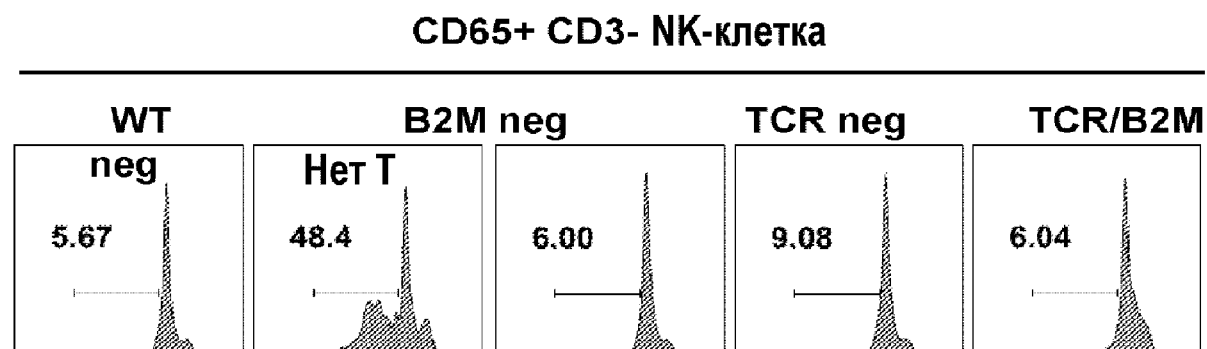
58/142

ФИГ.31

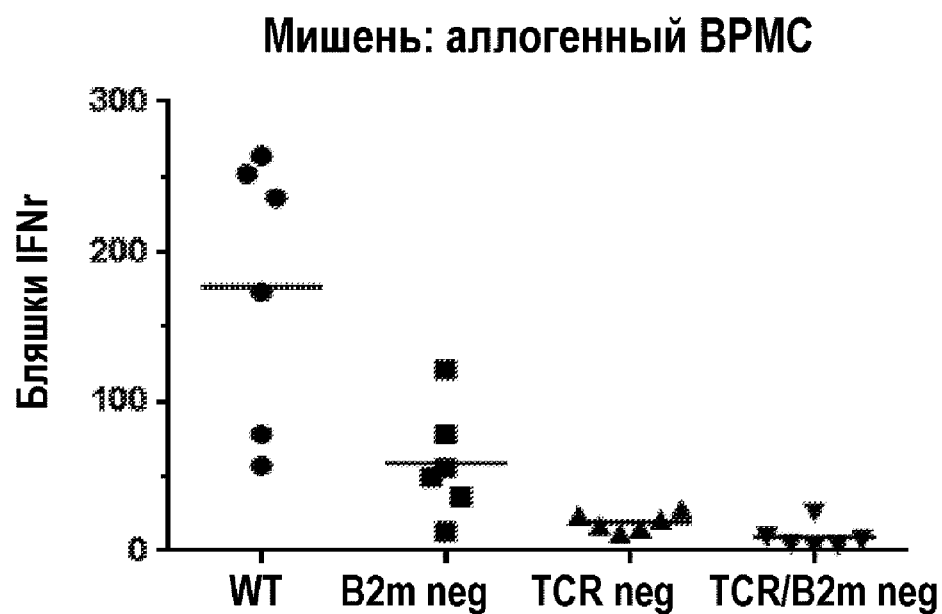


59/142

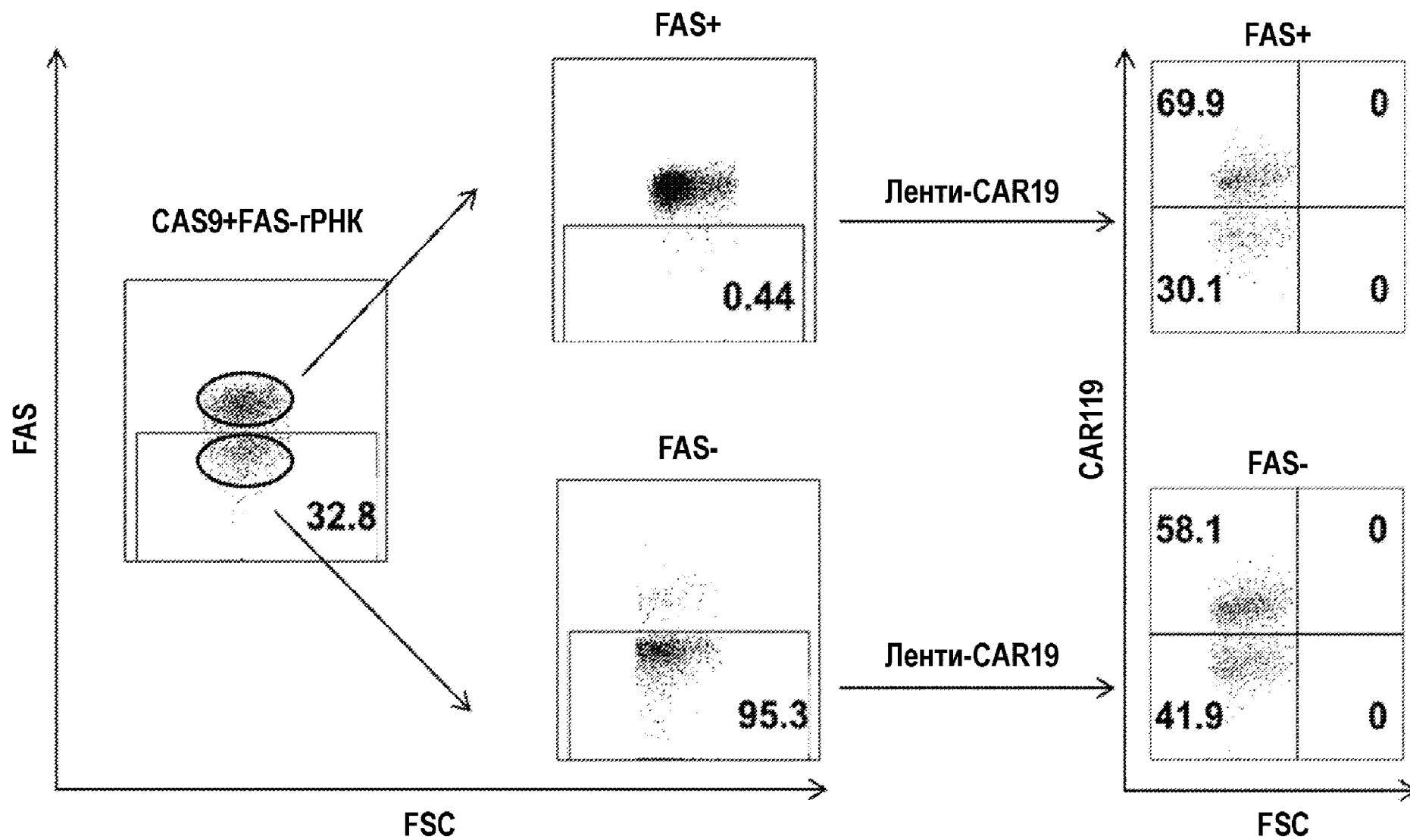
ФИГ.32А



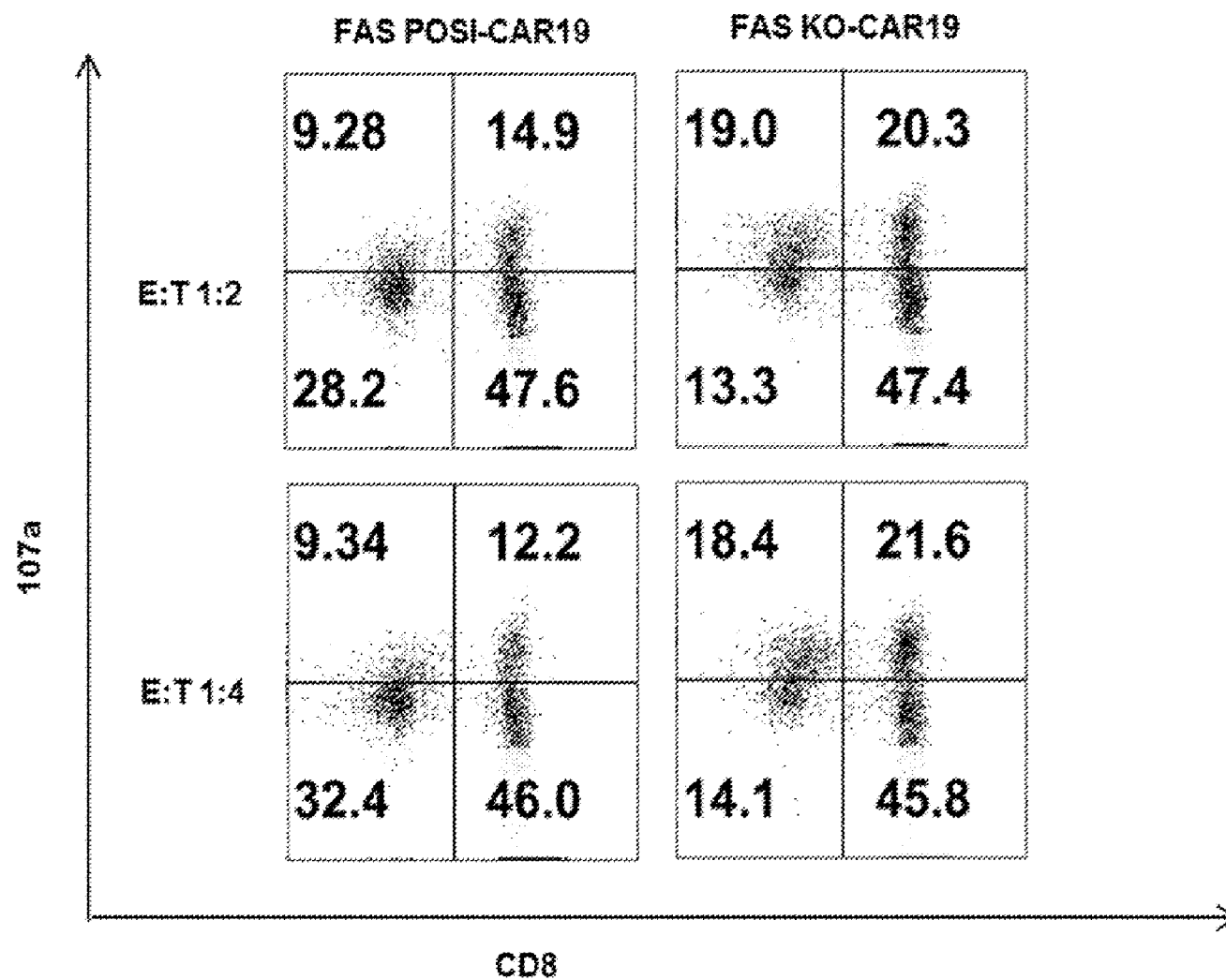
ФИГ.32В



ФИГ.32С

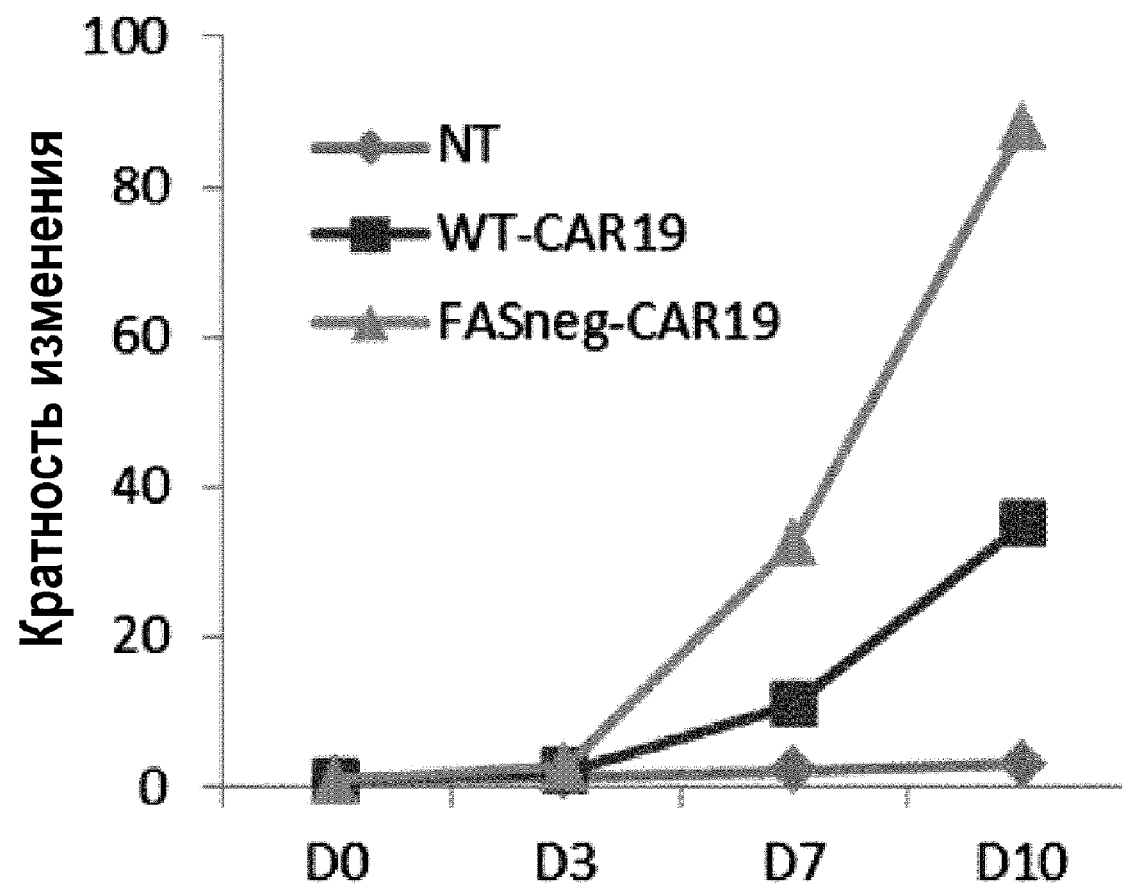


ФИГ.33



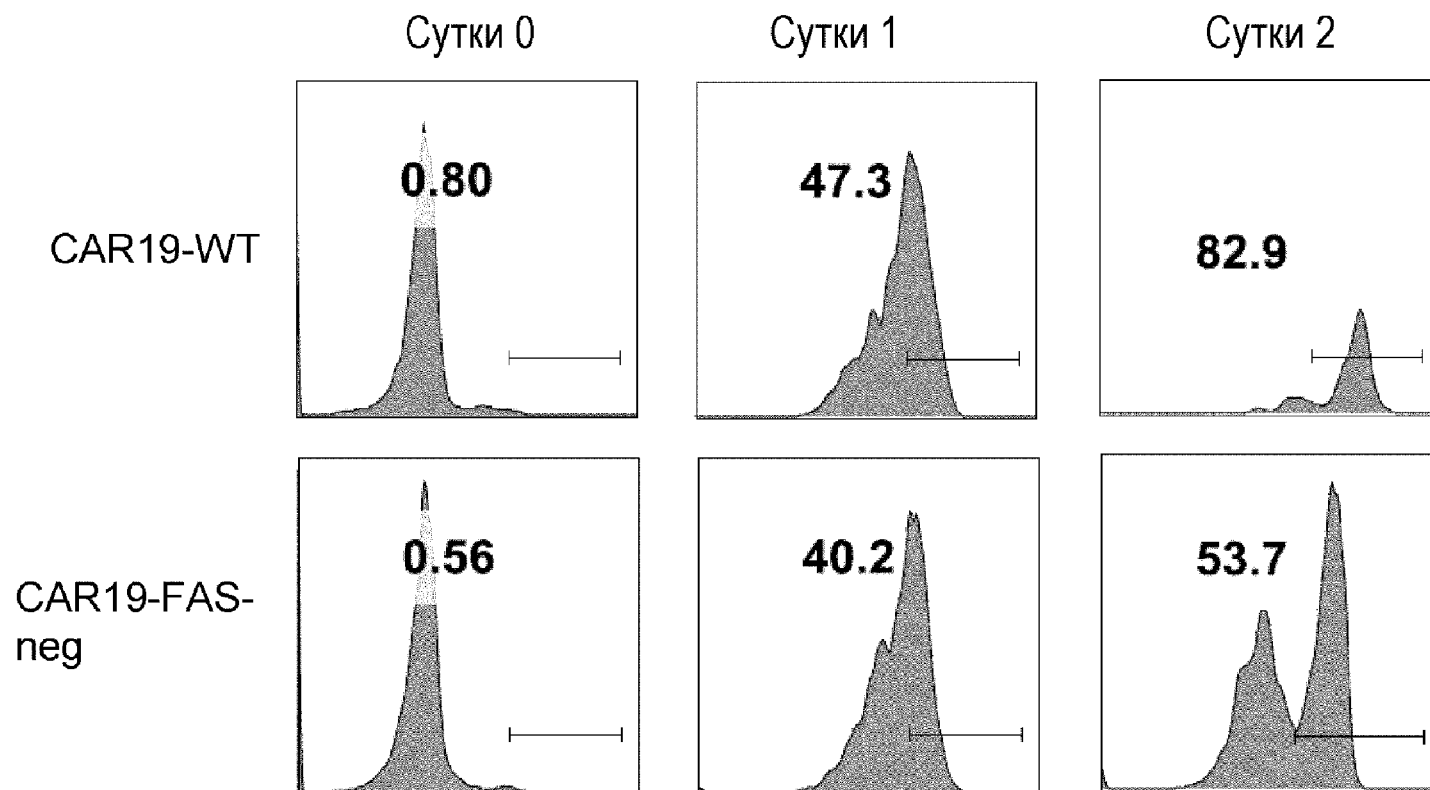
ФИГ.33 продолжение

Кокультивирование с K562-CD19



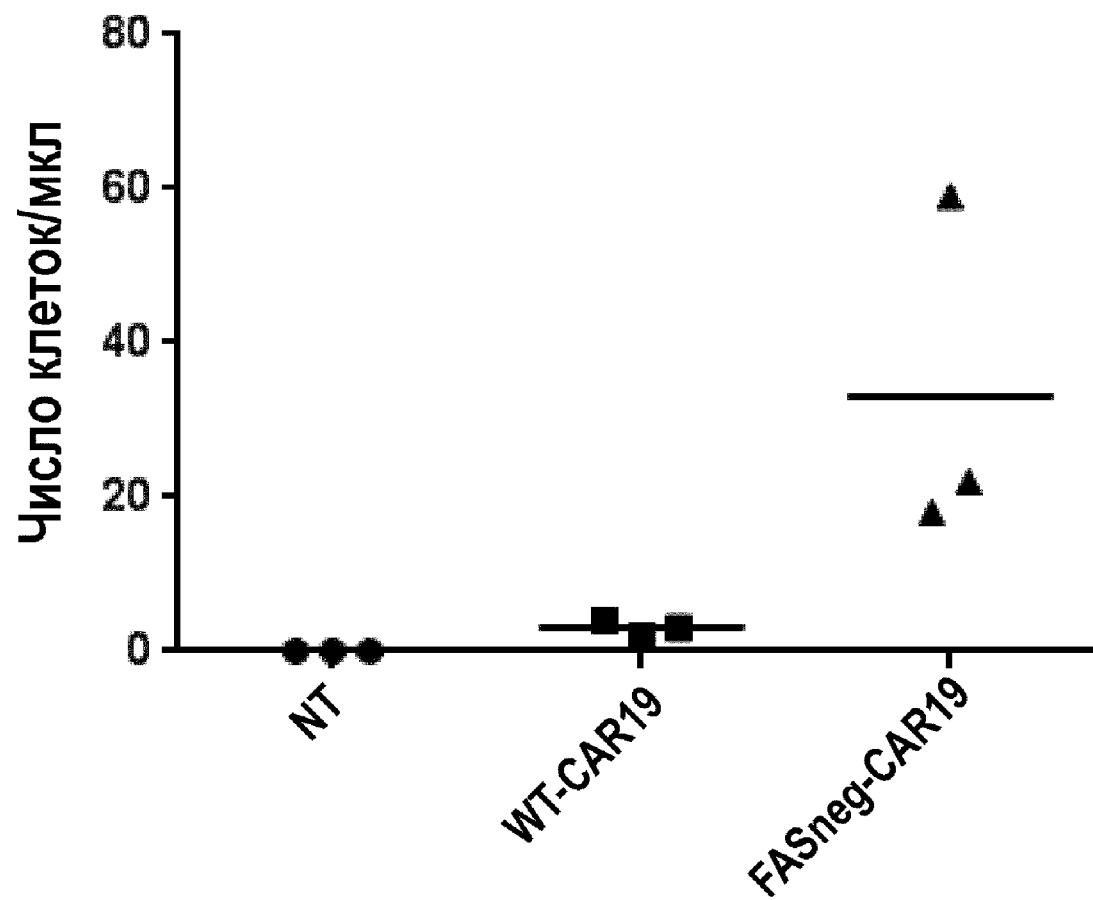
ФИГ.34А

Аннексин V

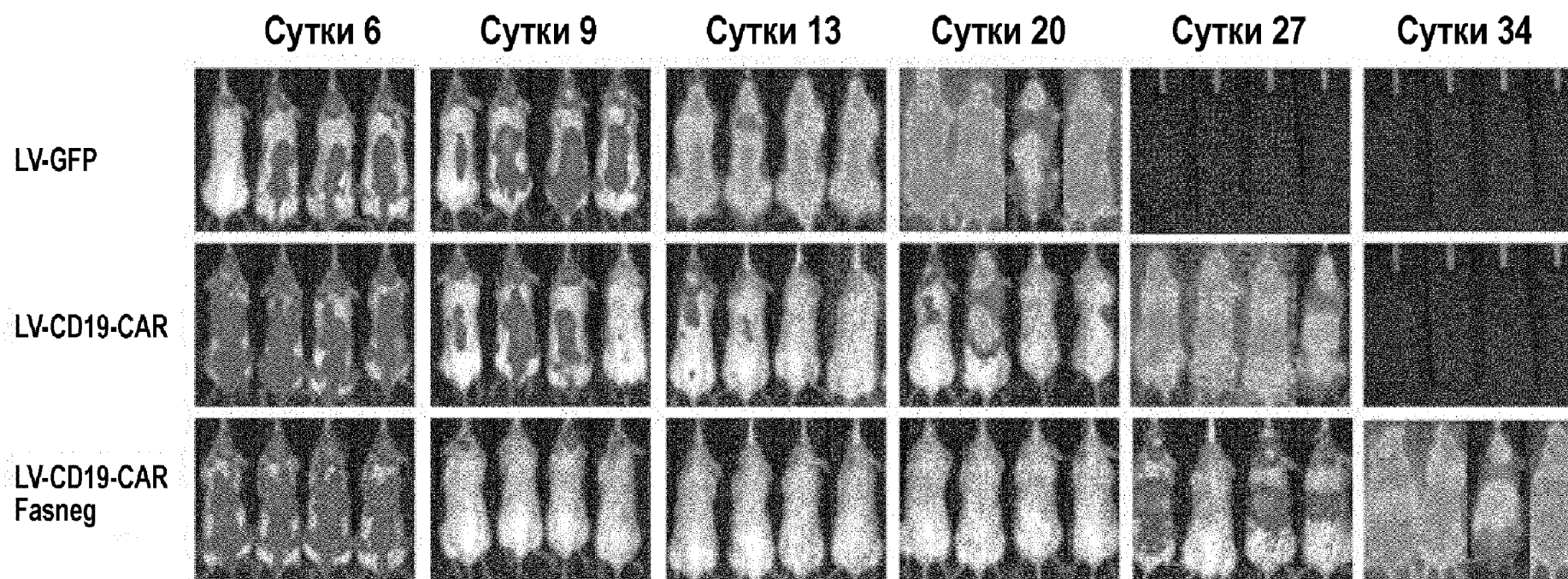


ФИГ.34В

Анализ точного подсчета CD3

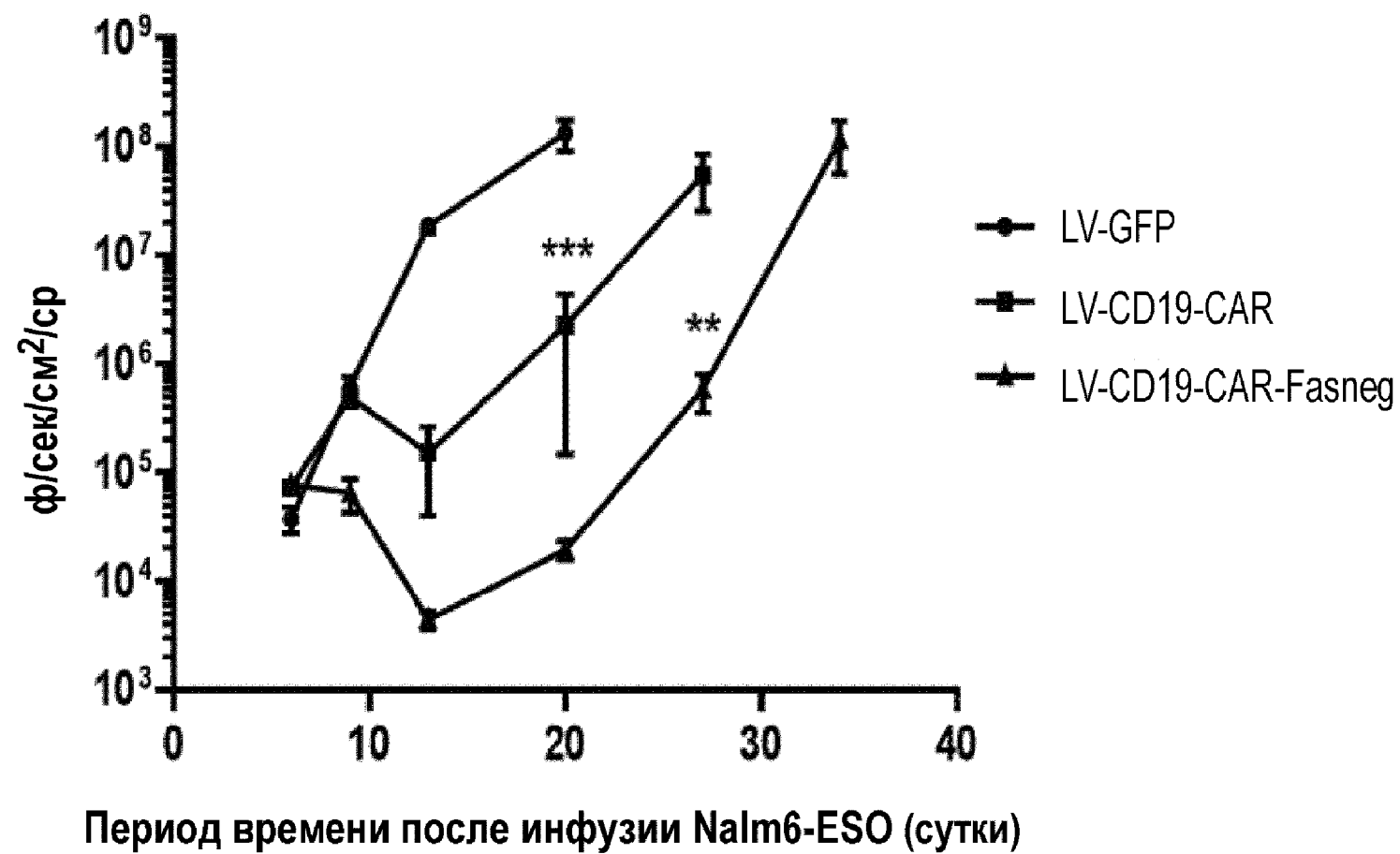


ФИГ.35А

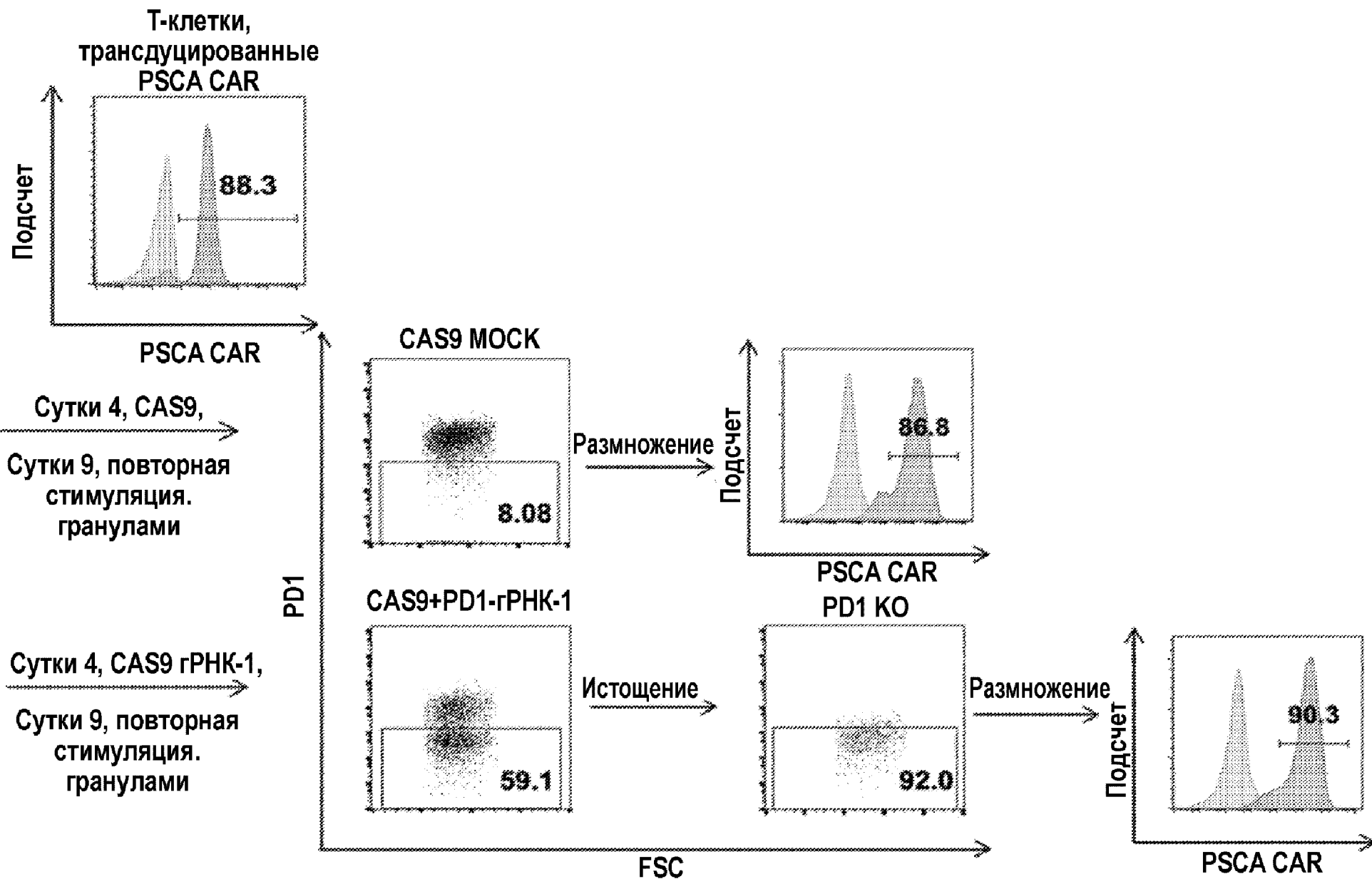


66/142

ФИГ.35В



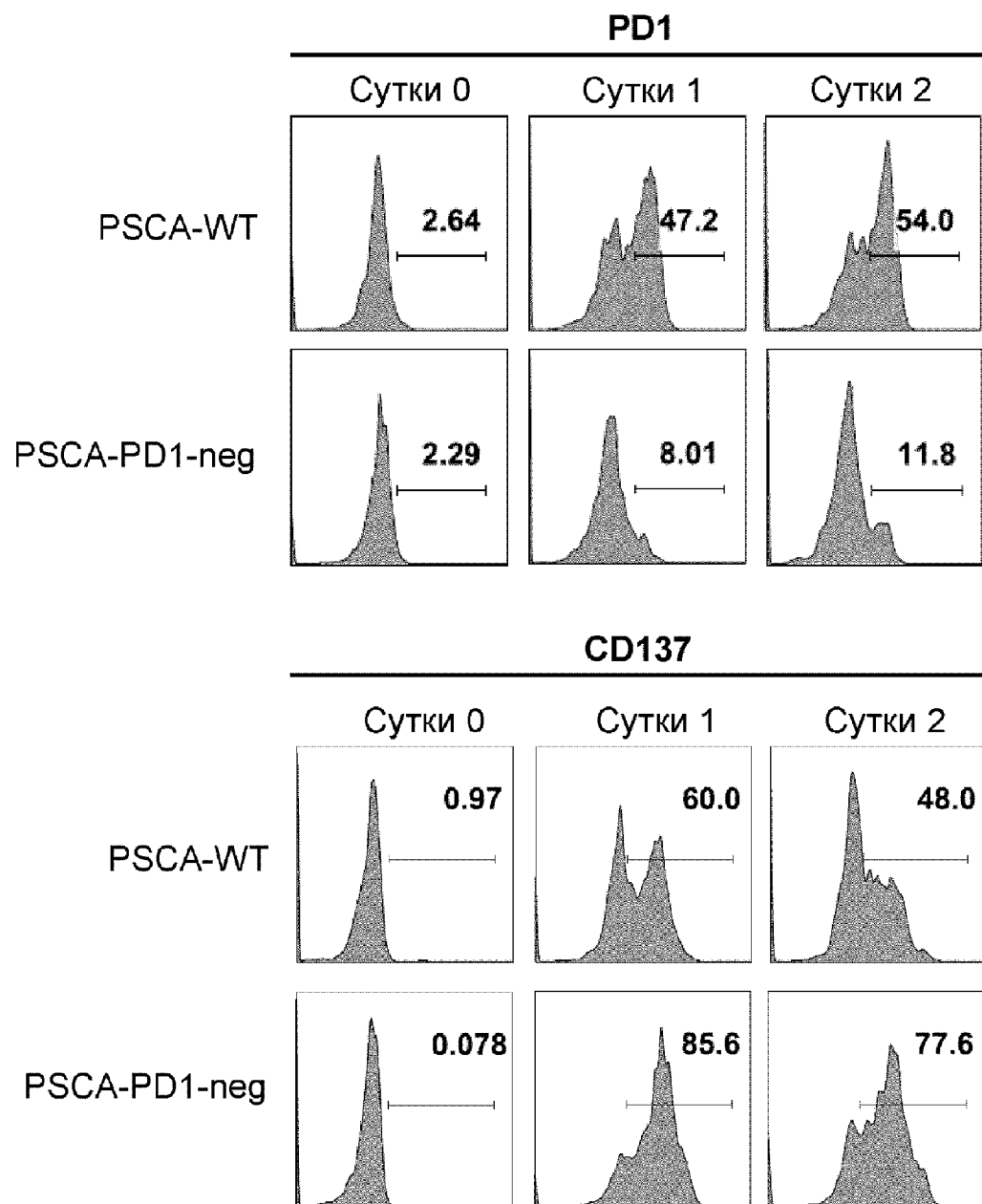
ФИГ.35С

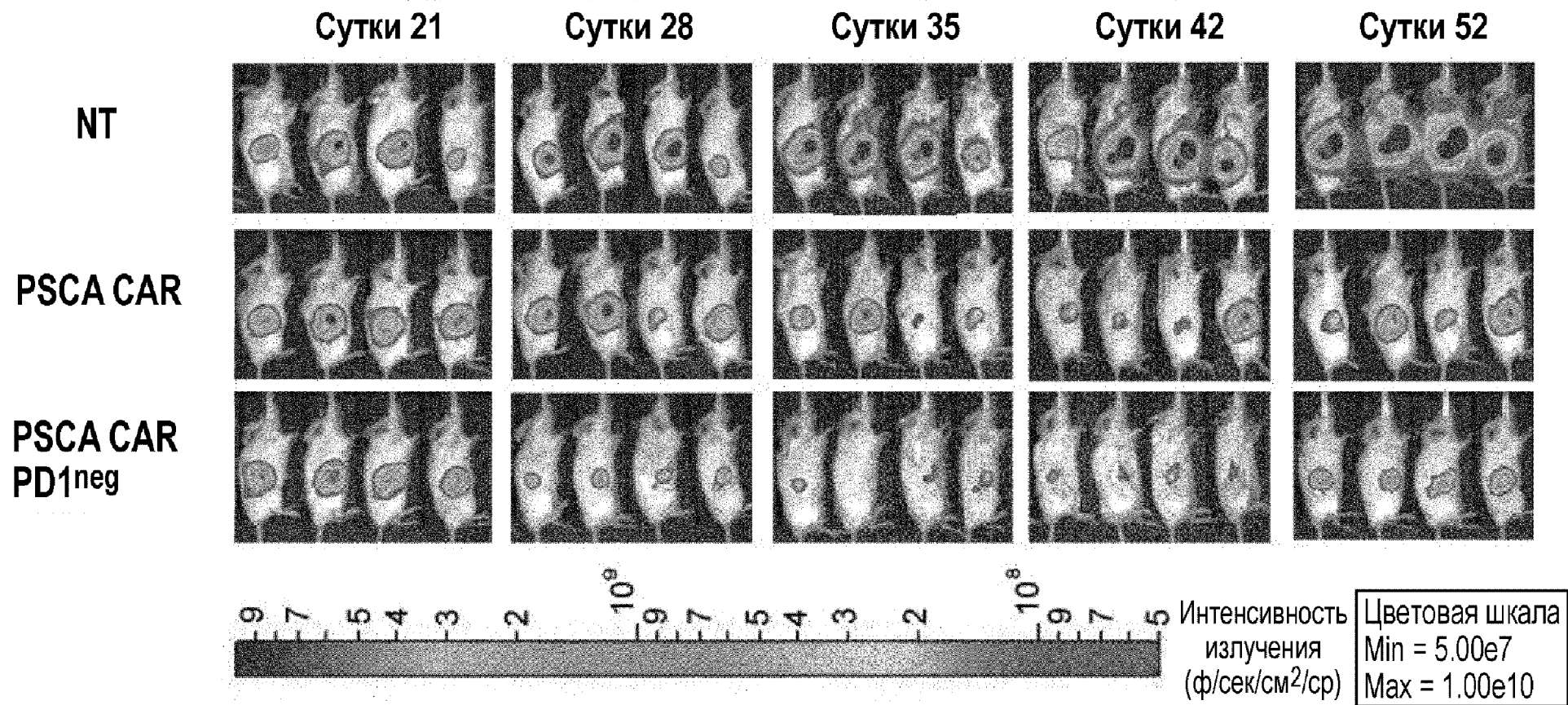


68/142

ФИГ.36

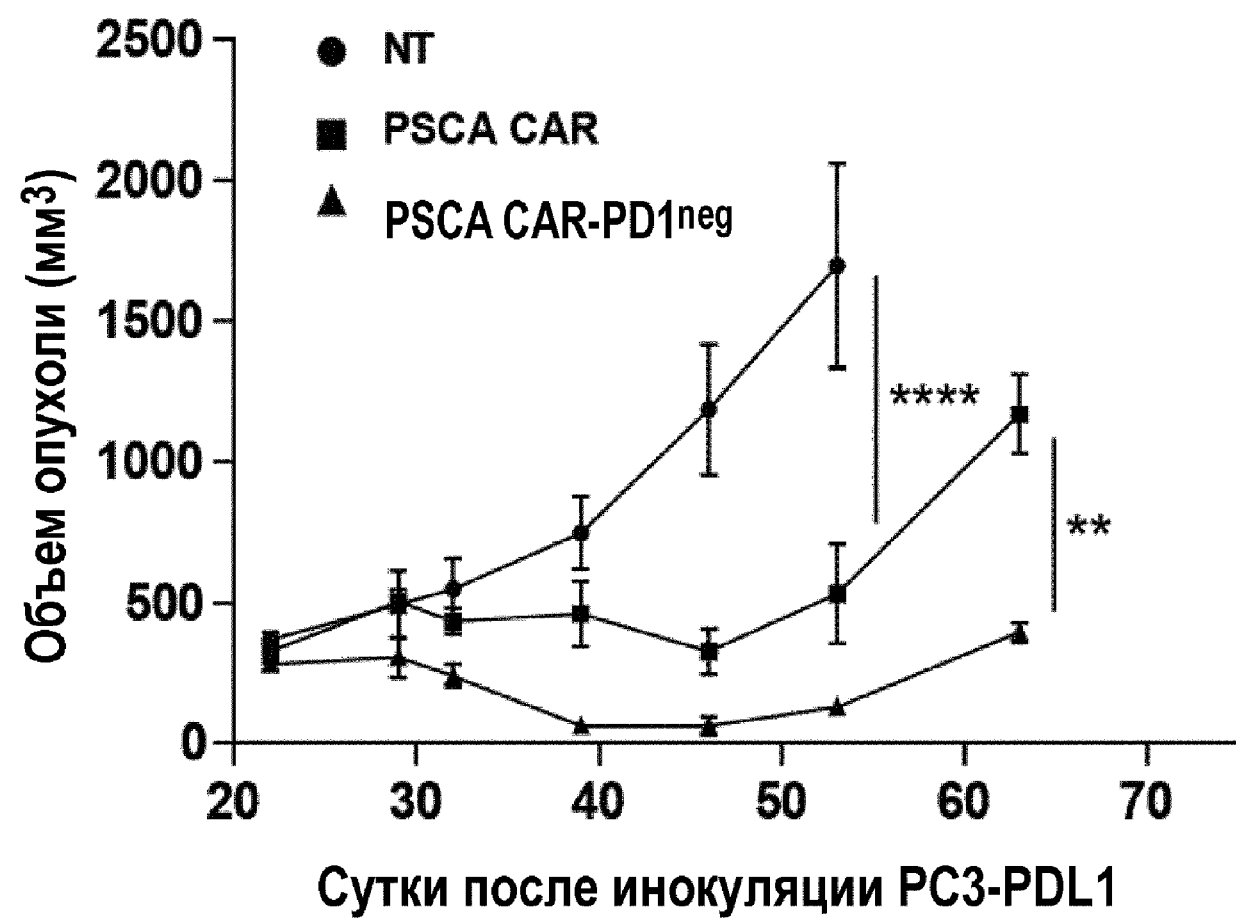
ФИГ.37



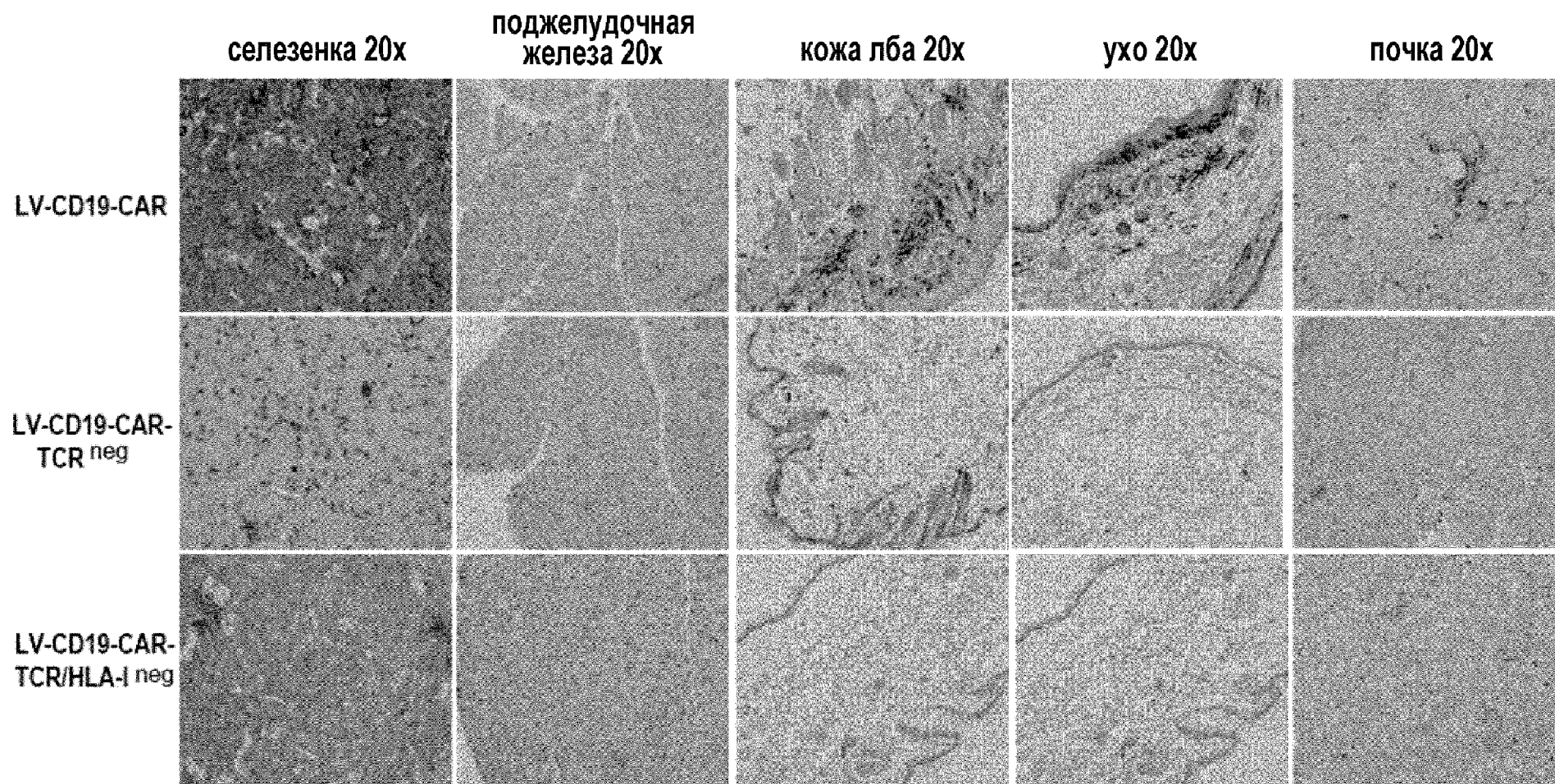


70/142

ФИГ.38А

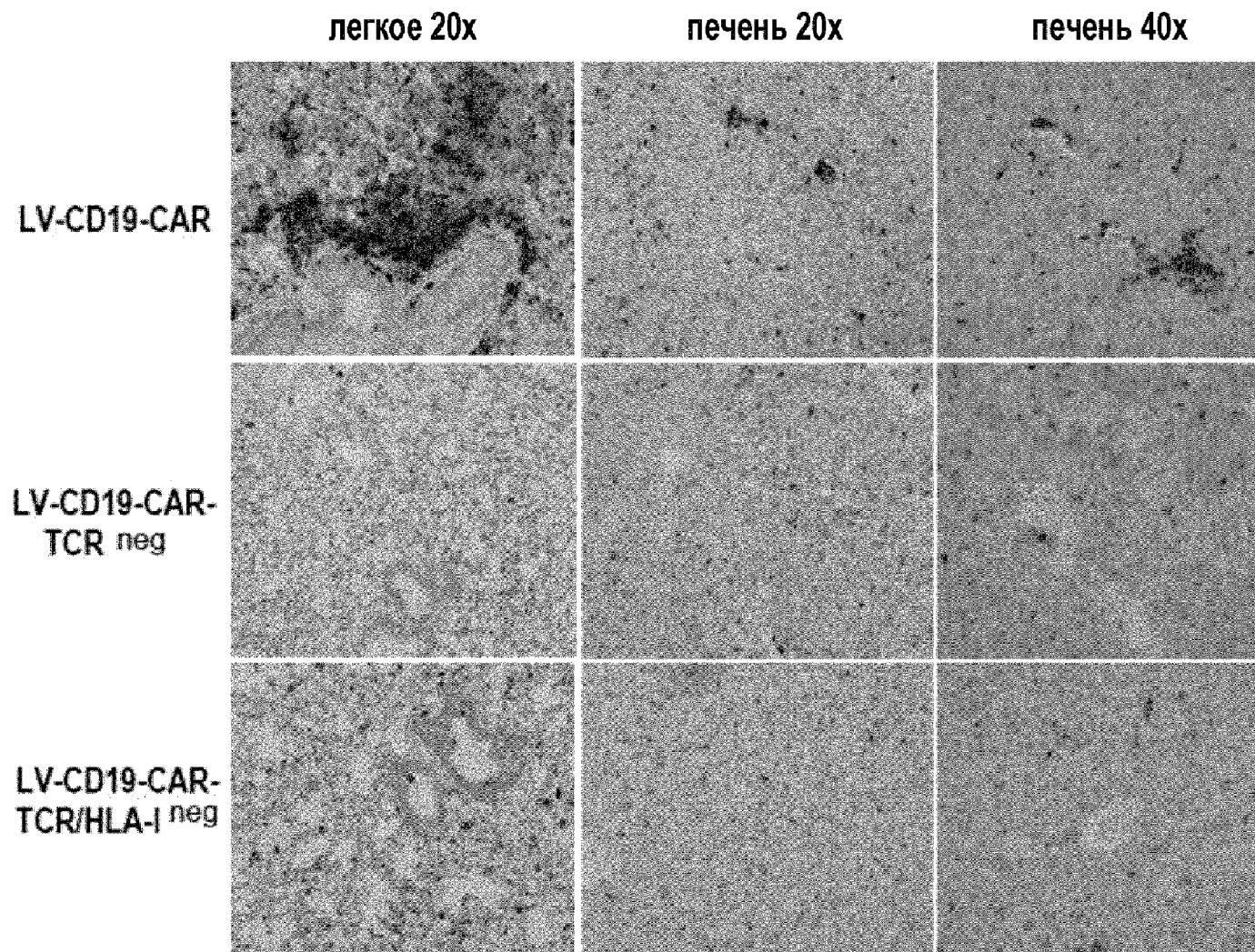


ФИГ.38В

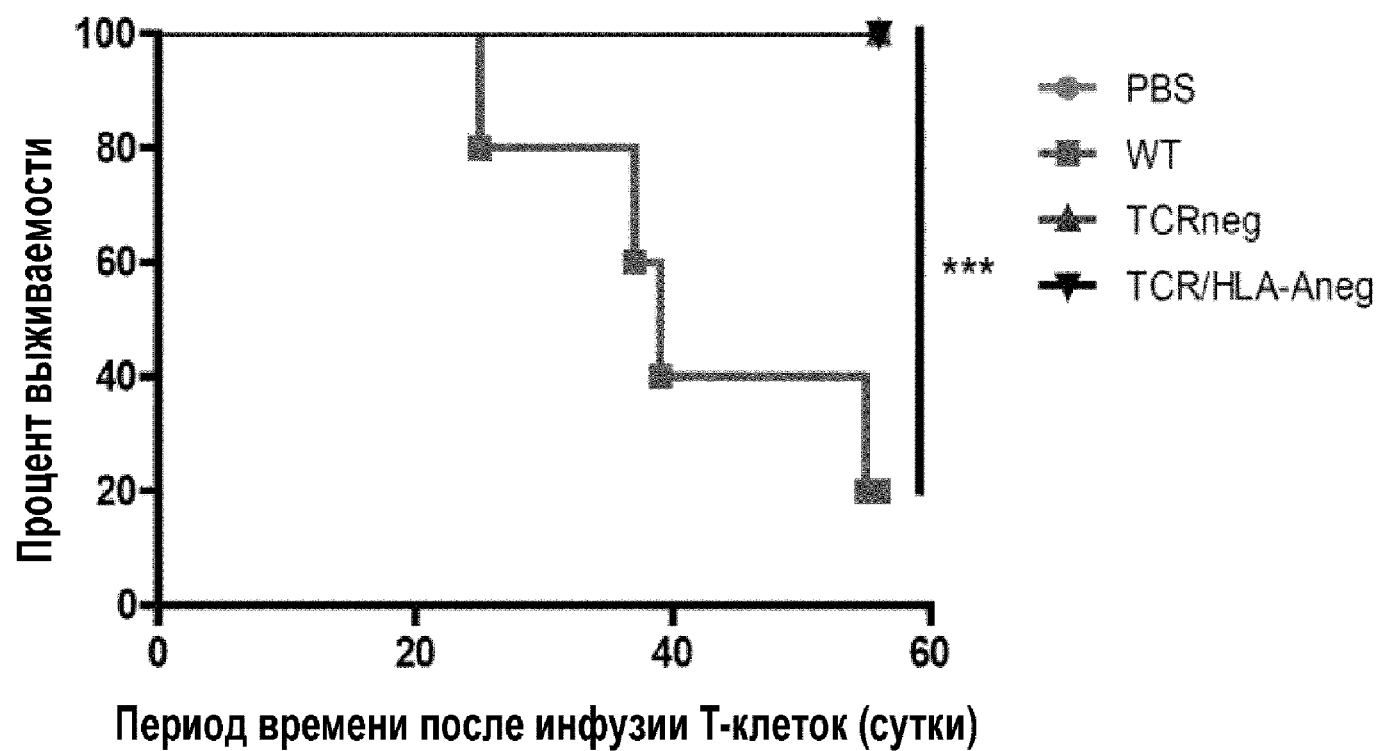


72/142

ФИГ.39

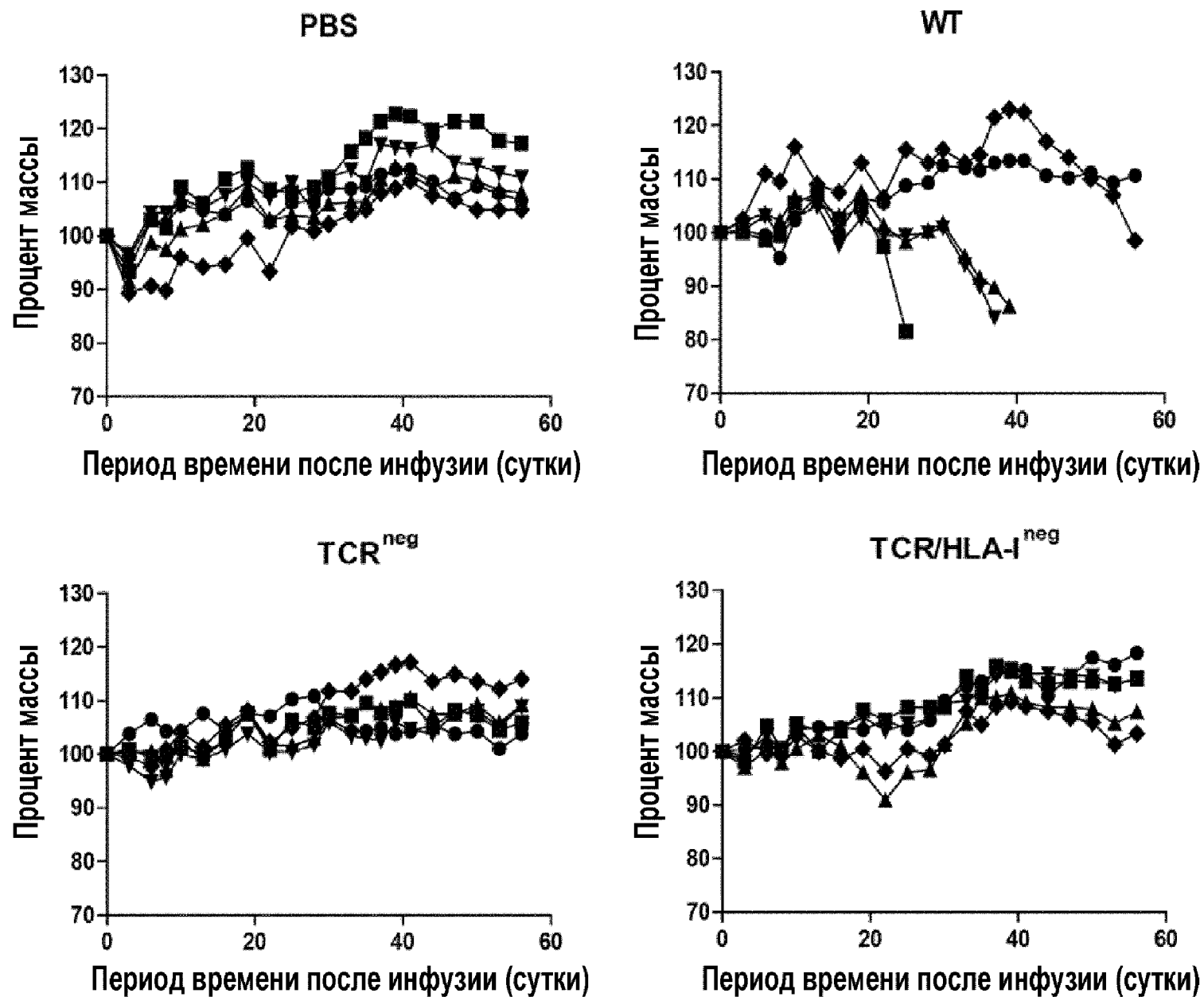


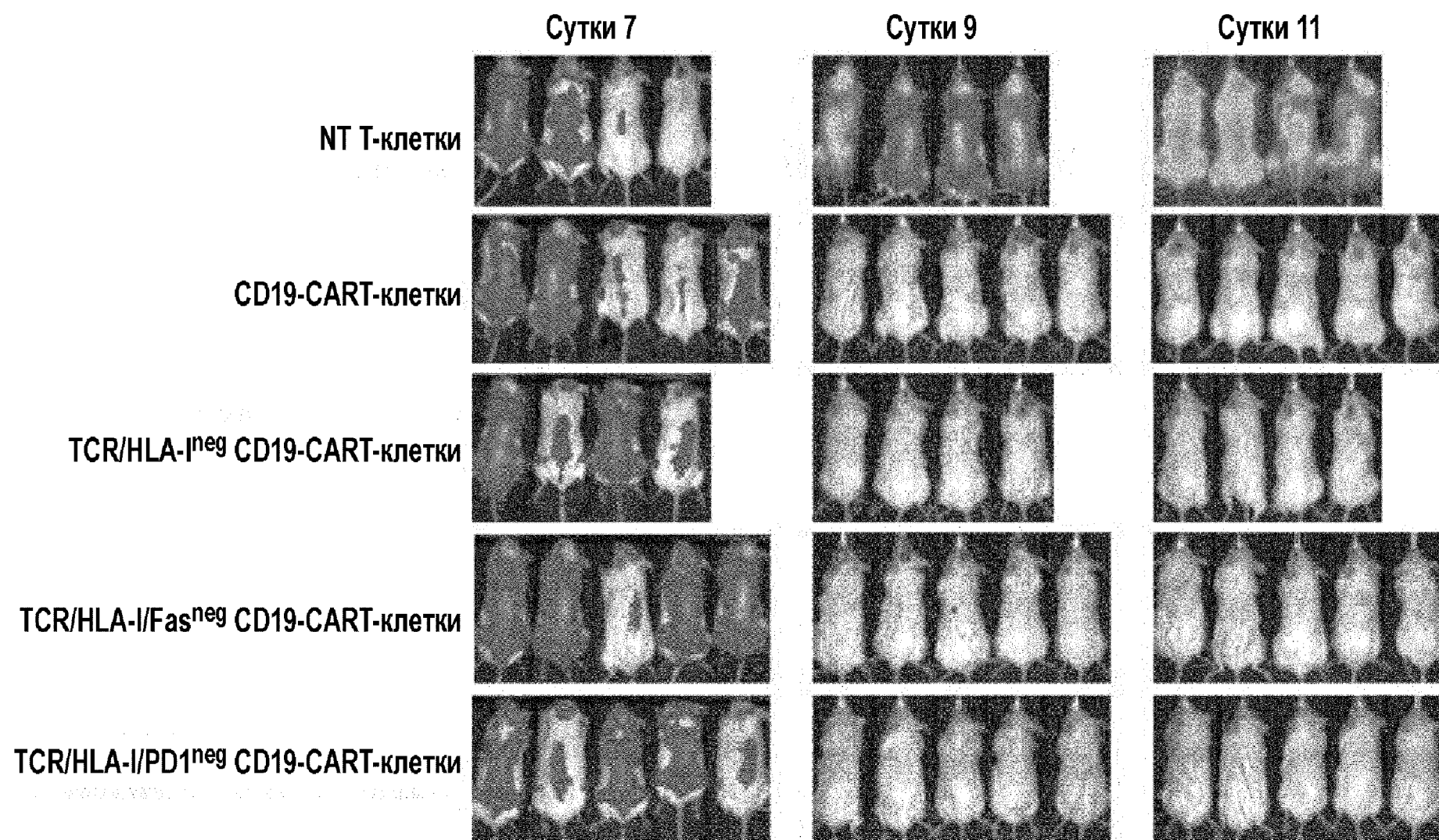
ФИГ.39 продолжение



ФИГ.40А

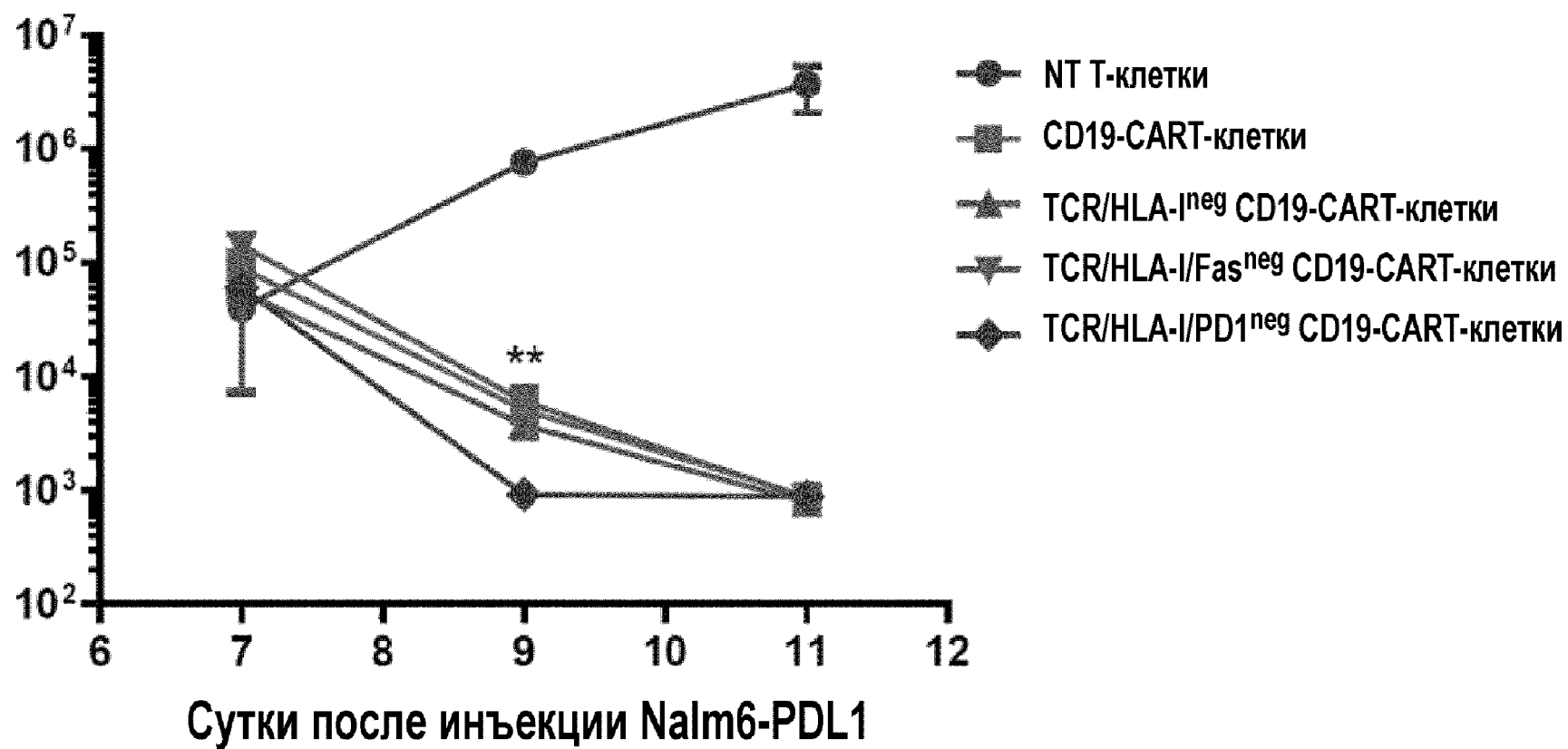
ФИГ.40В



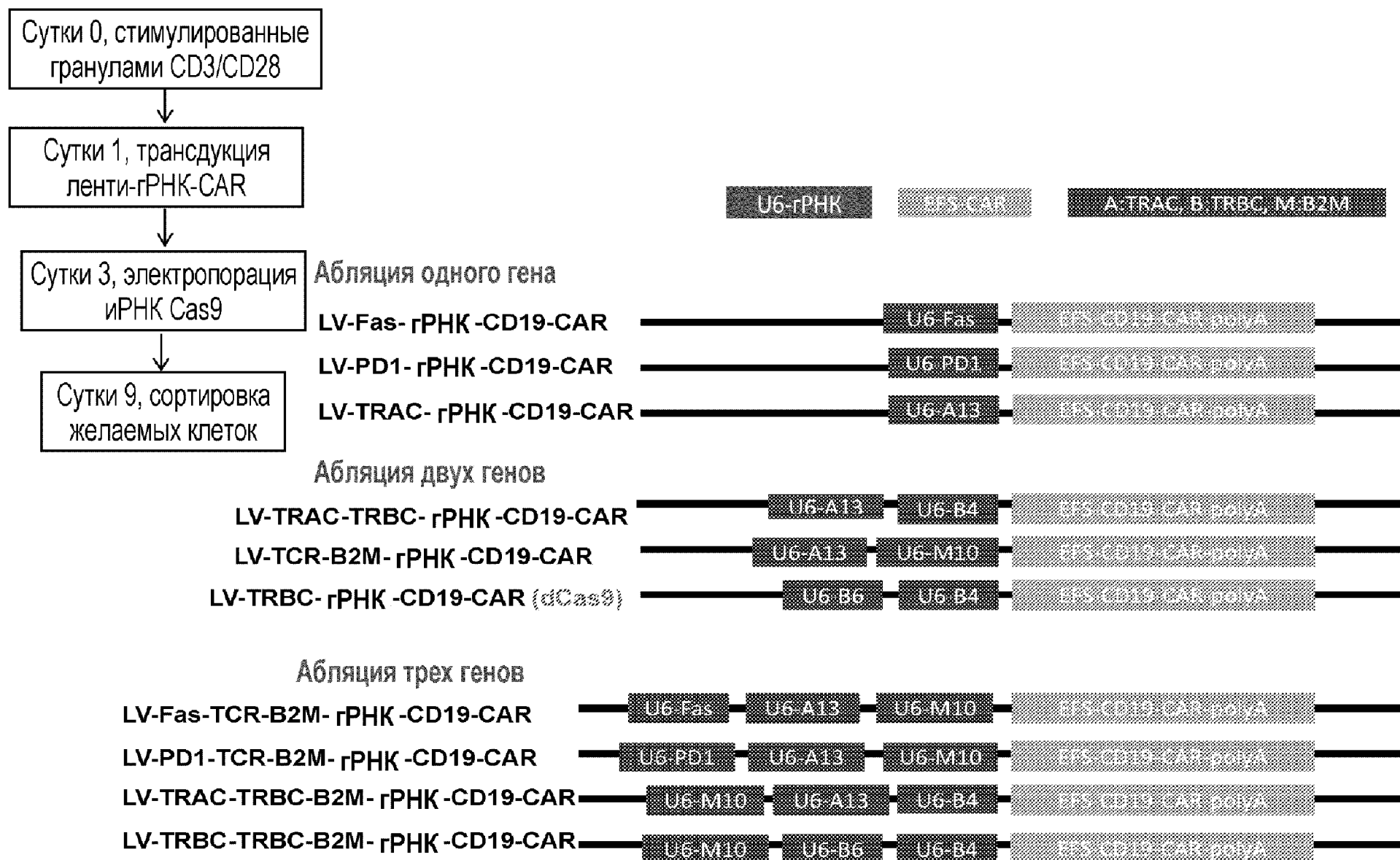


76/142

ФИГ.41А

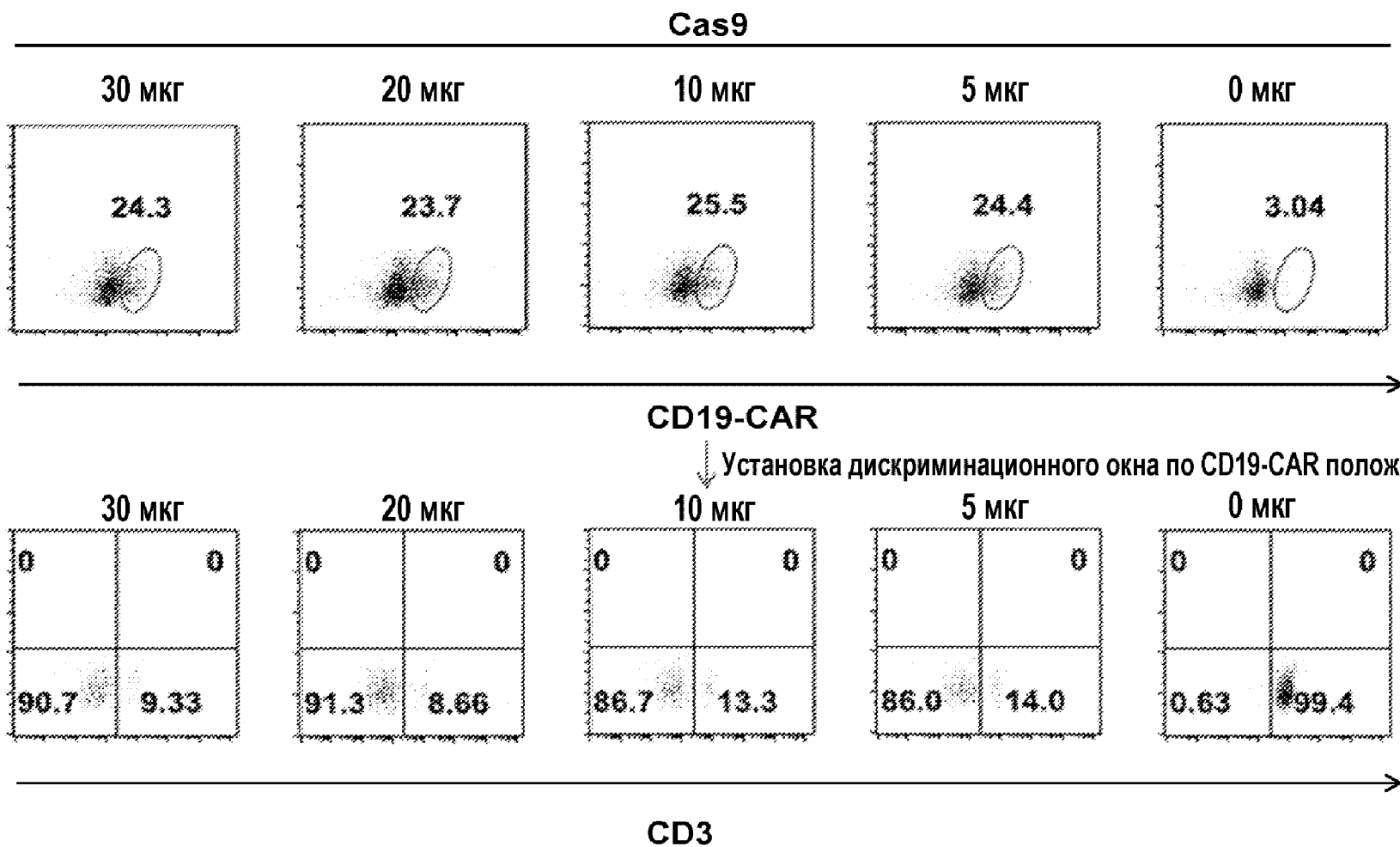


ФИГ.41В



78/142

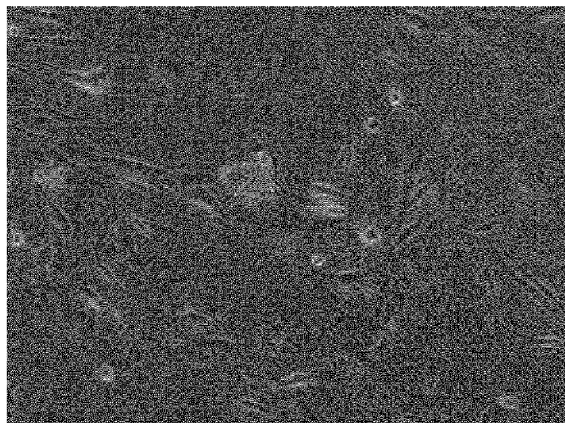
ФИГ.42



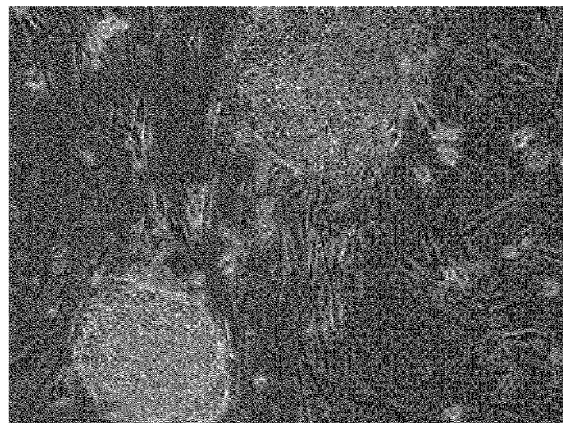
79/142

ФИГ.43

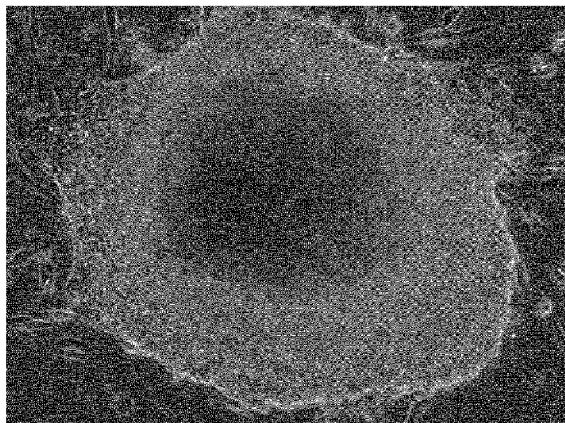
Сутки 4



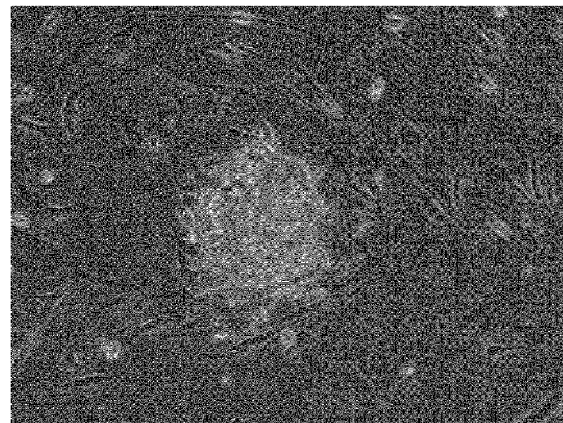
Сутки 12



Сутки 18



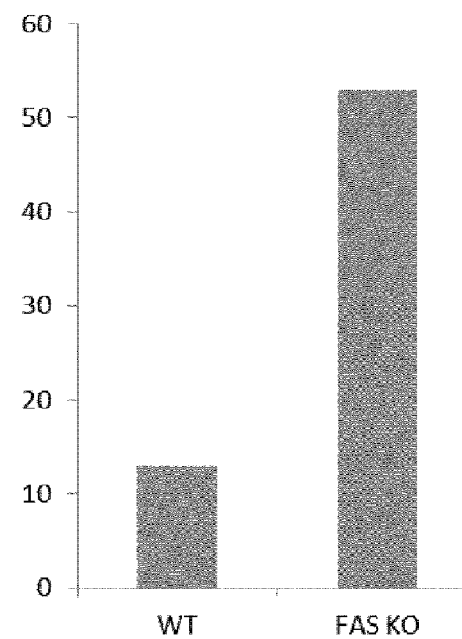
Неполное перепрограммирование iPSC сутки 18



Пассаж 0

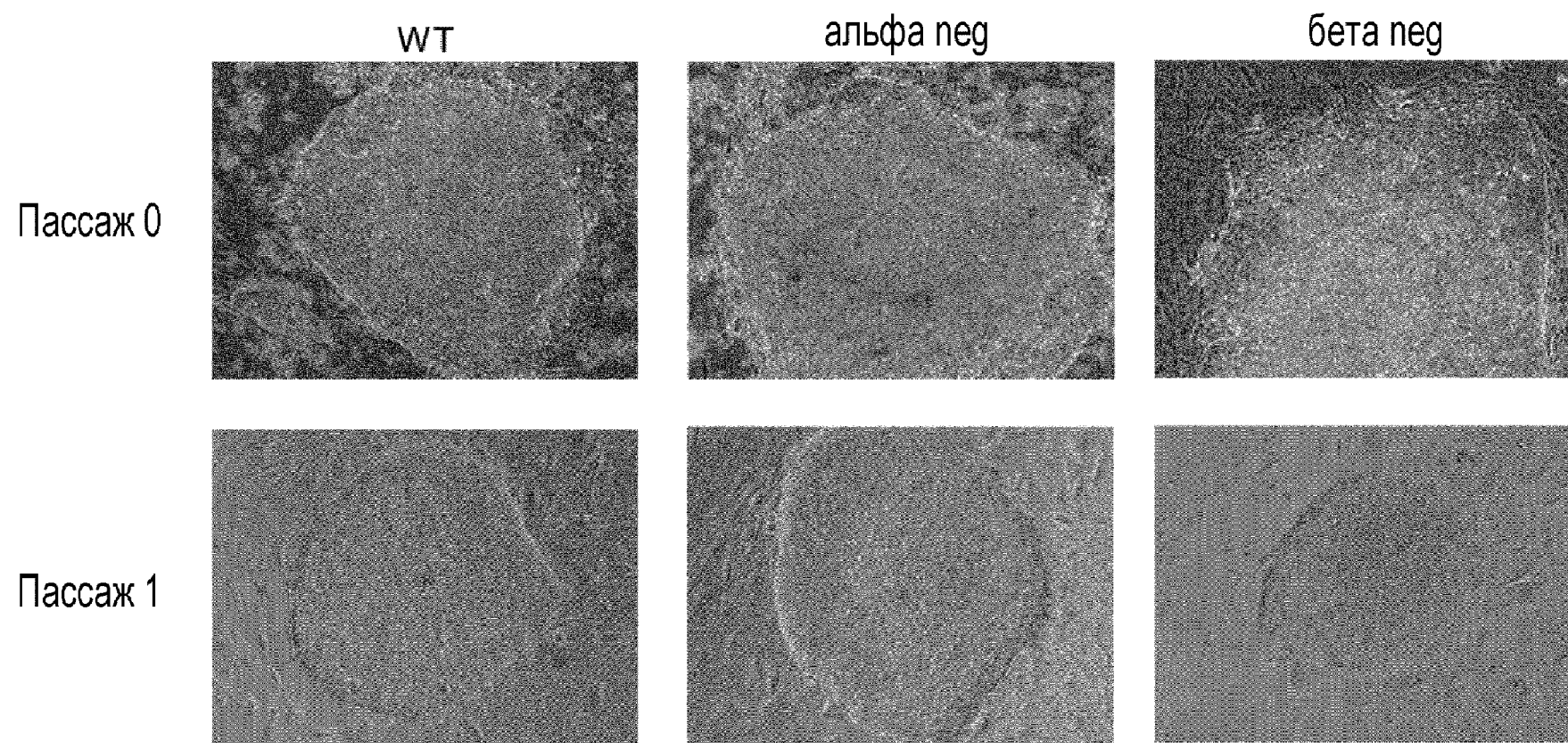
ФИГ.44А

Число колоний

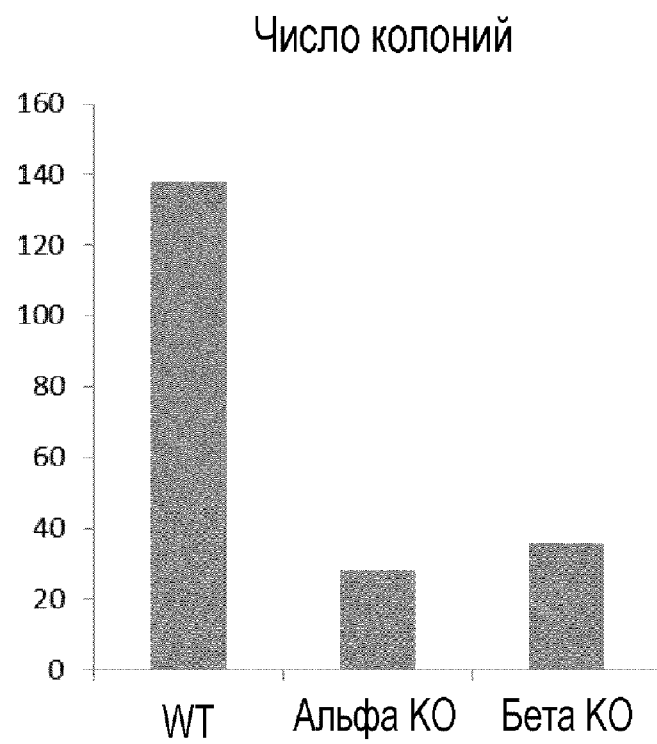


80/142

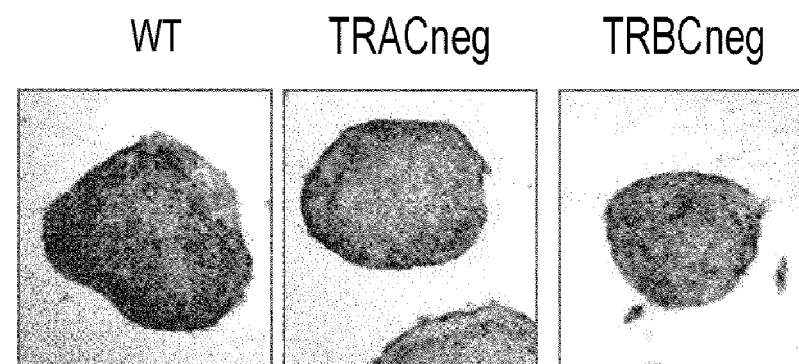
ФИГ.44В



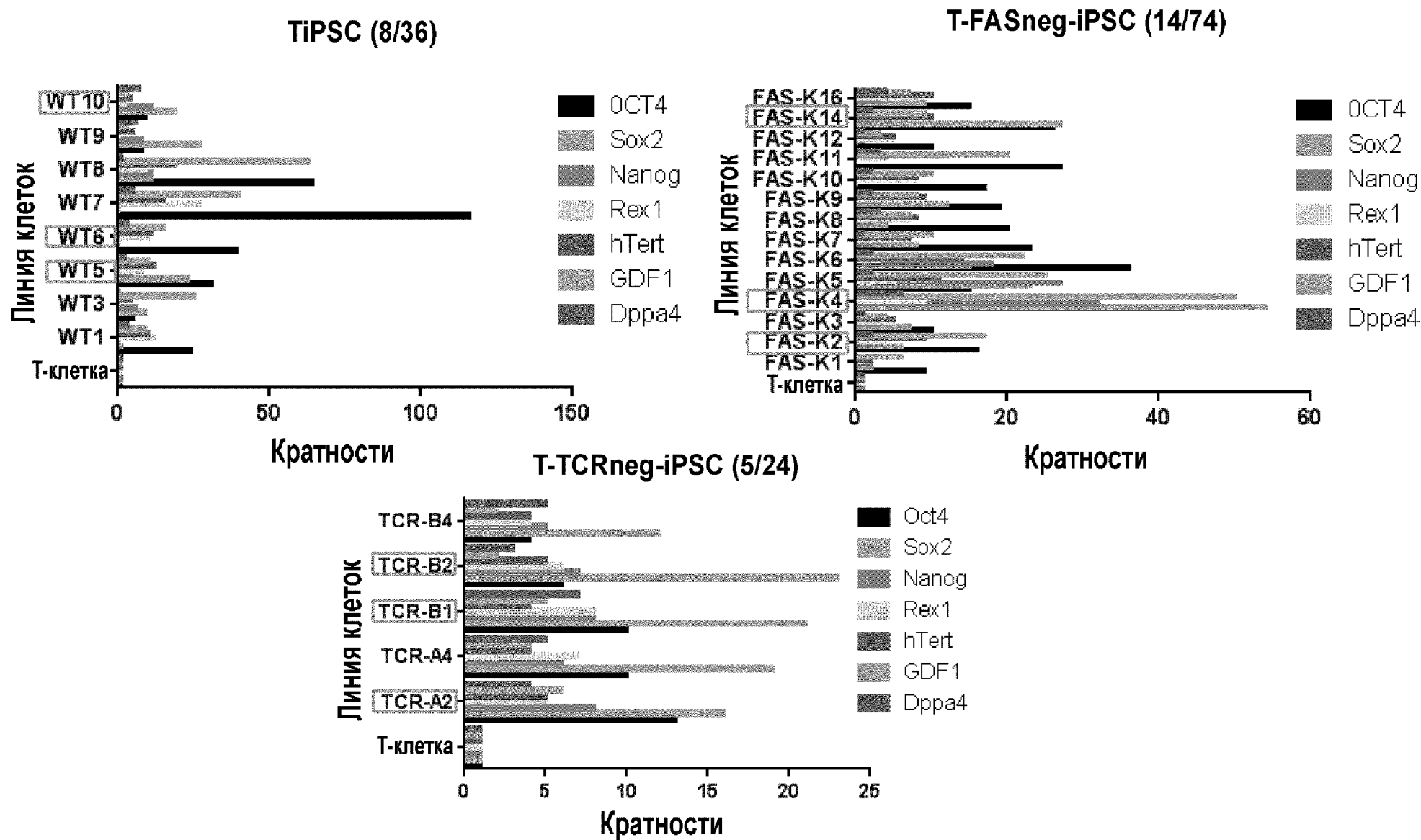
ФИГ.45А



ФИГ.45В

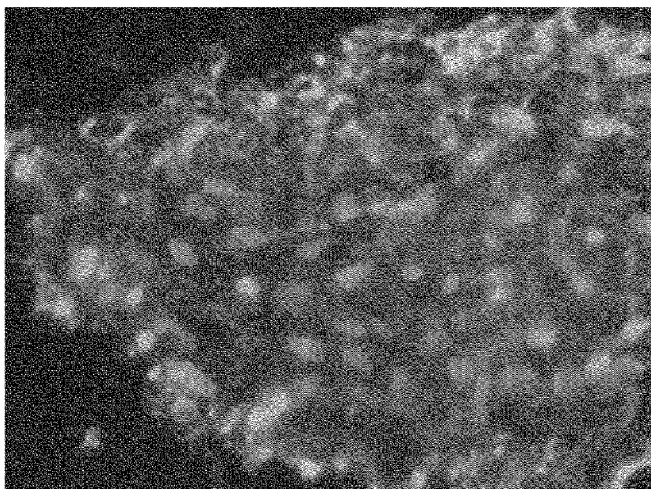


ФИГ.45С

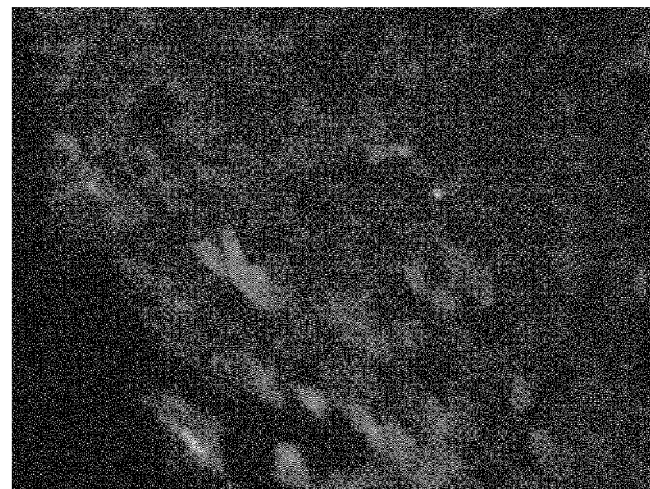


ФИГ.46

Tra-1-60



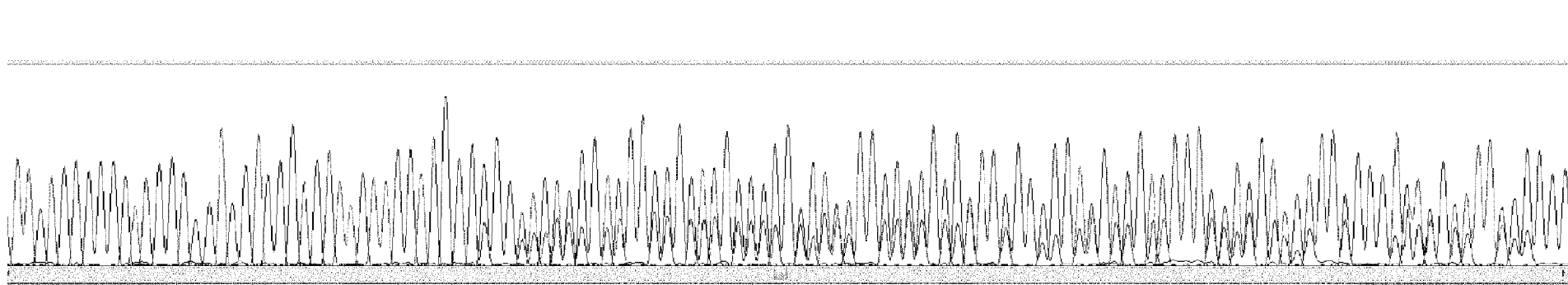
SSEA4



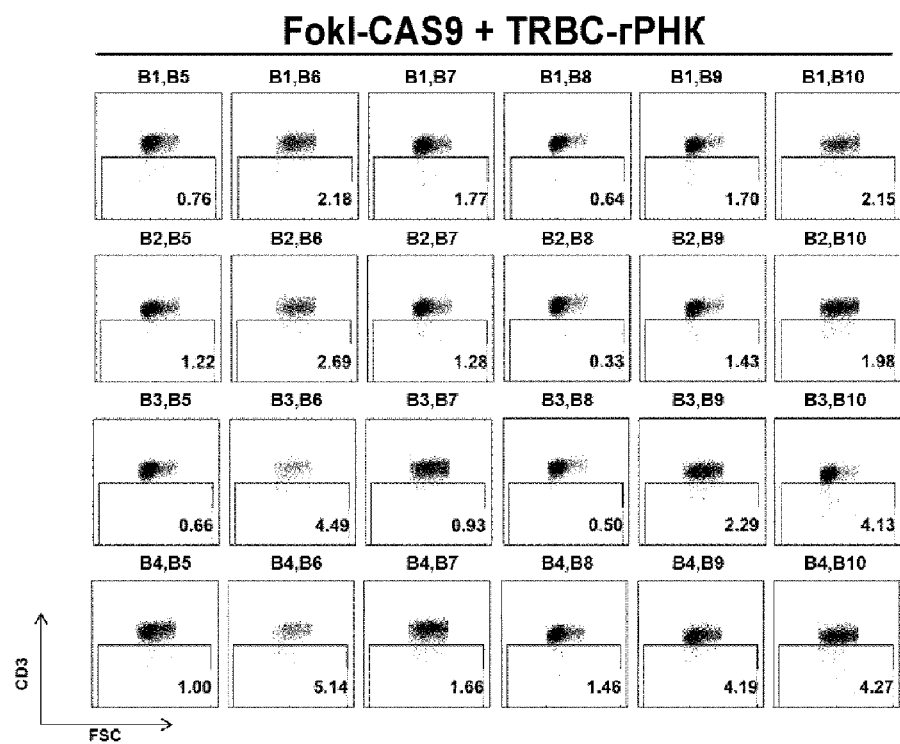
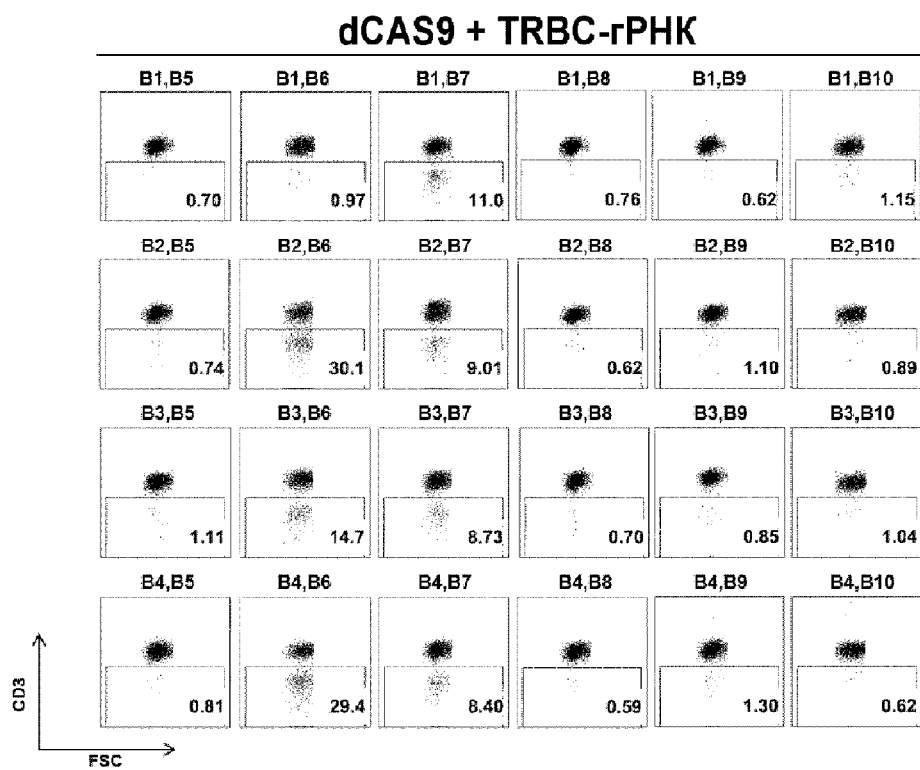
ФИГ.47А

84/142

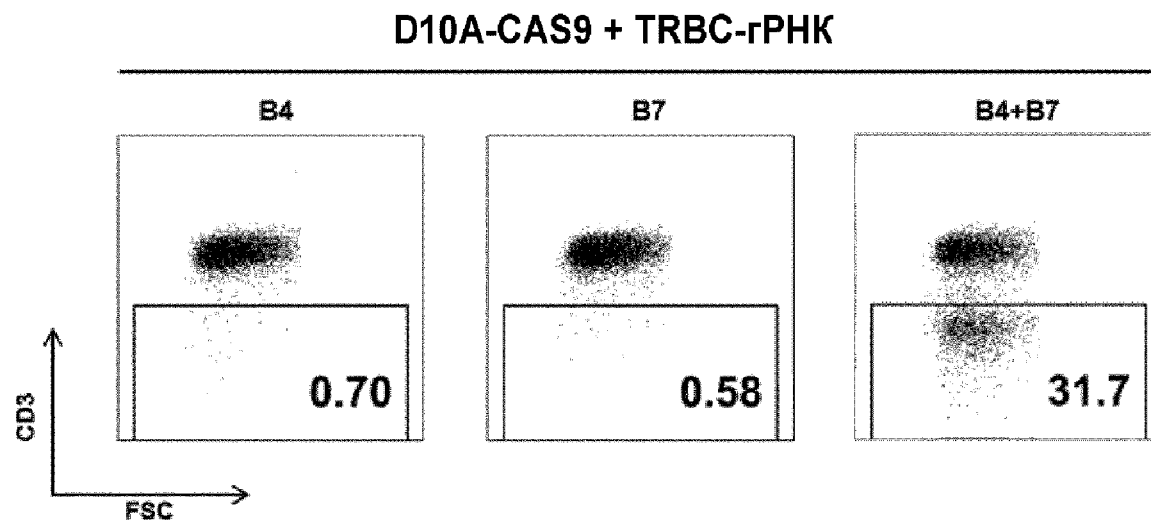
T-FasKO-iPSC



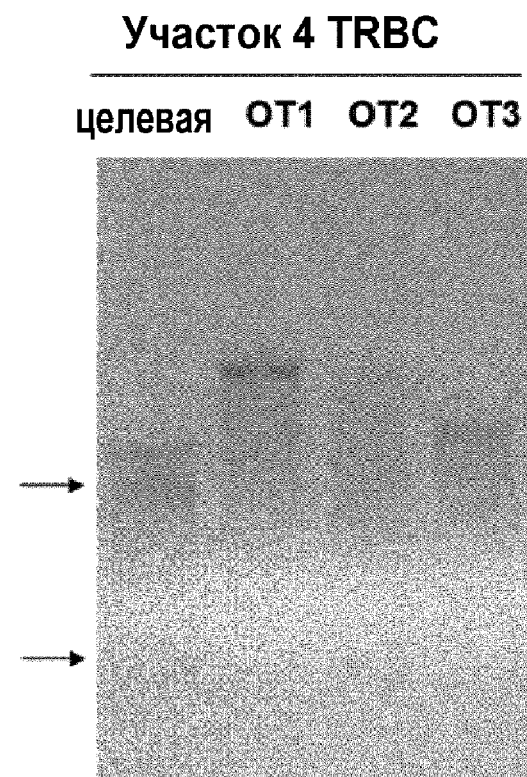
ФИГ.47В



ФИГ.48А



ФИГ.48В



ФИГ.48С

промотор T7 + целевая РНК + каркас гидовой РНК

TAATACGACTCACTATAGNNNNNNNNNNNNNNNN

NNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA

AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGT

GGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT

ФИГ.49

Стимулированные гранулами
CD3/CD28, 3 суток



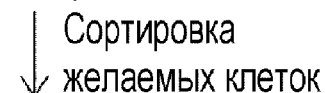
Электропорация иРНК CAS9
и гРНК



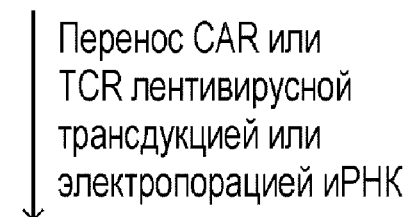
32°C 24 ч



34°C 4 суток

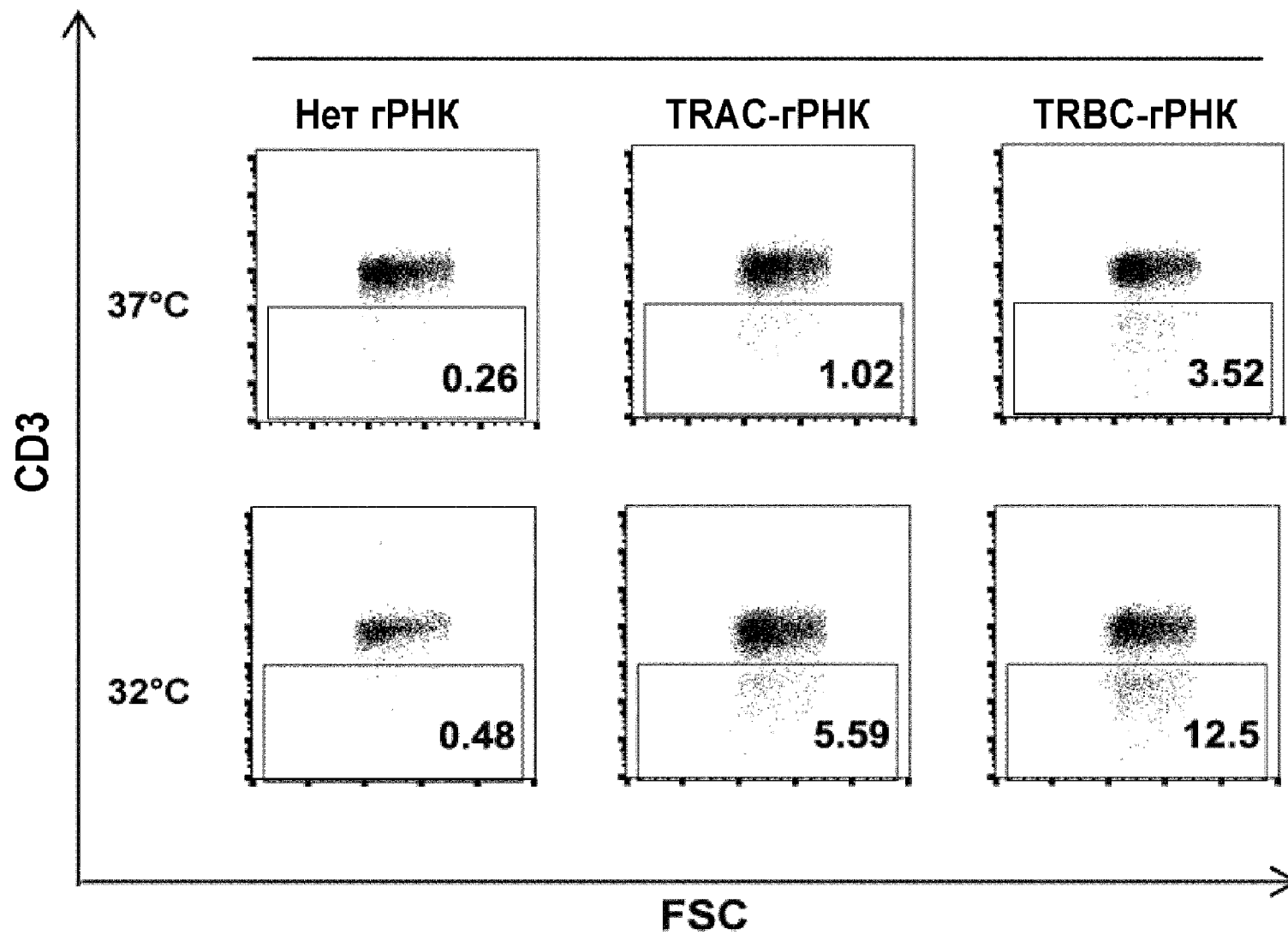


Т-клетки с КО гена

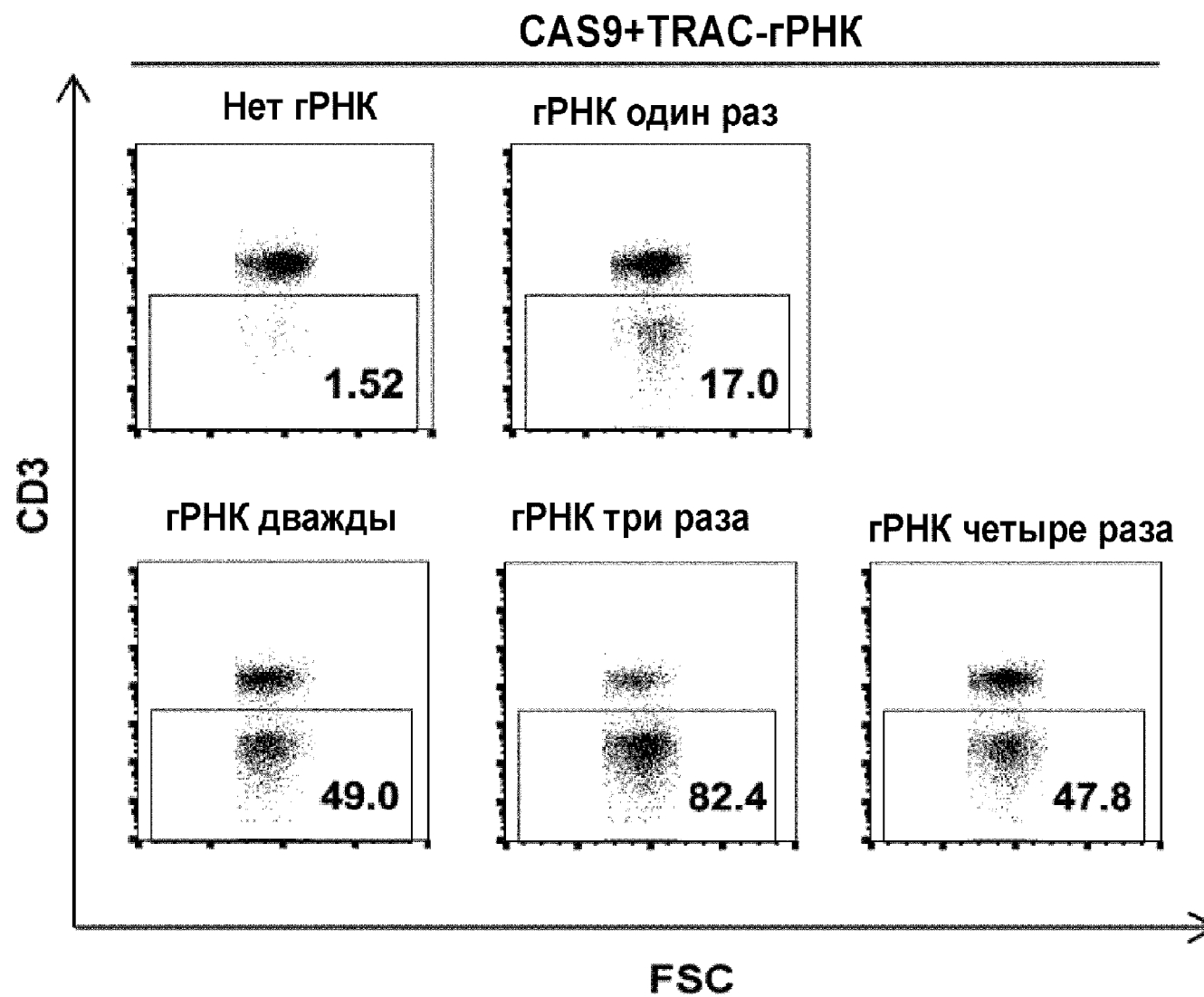


Антигенспецифическая Т-клетка

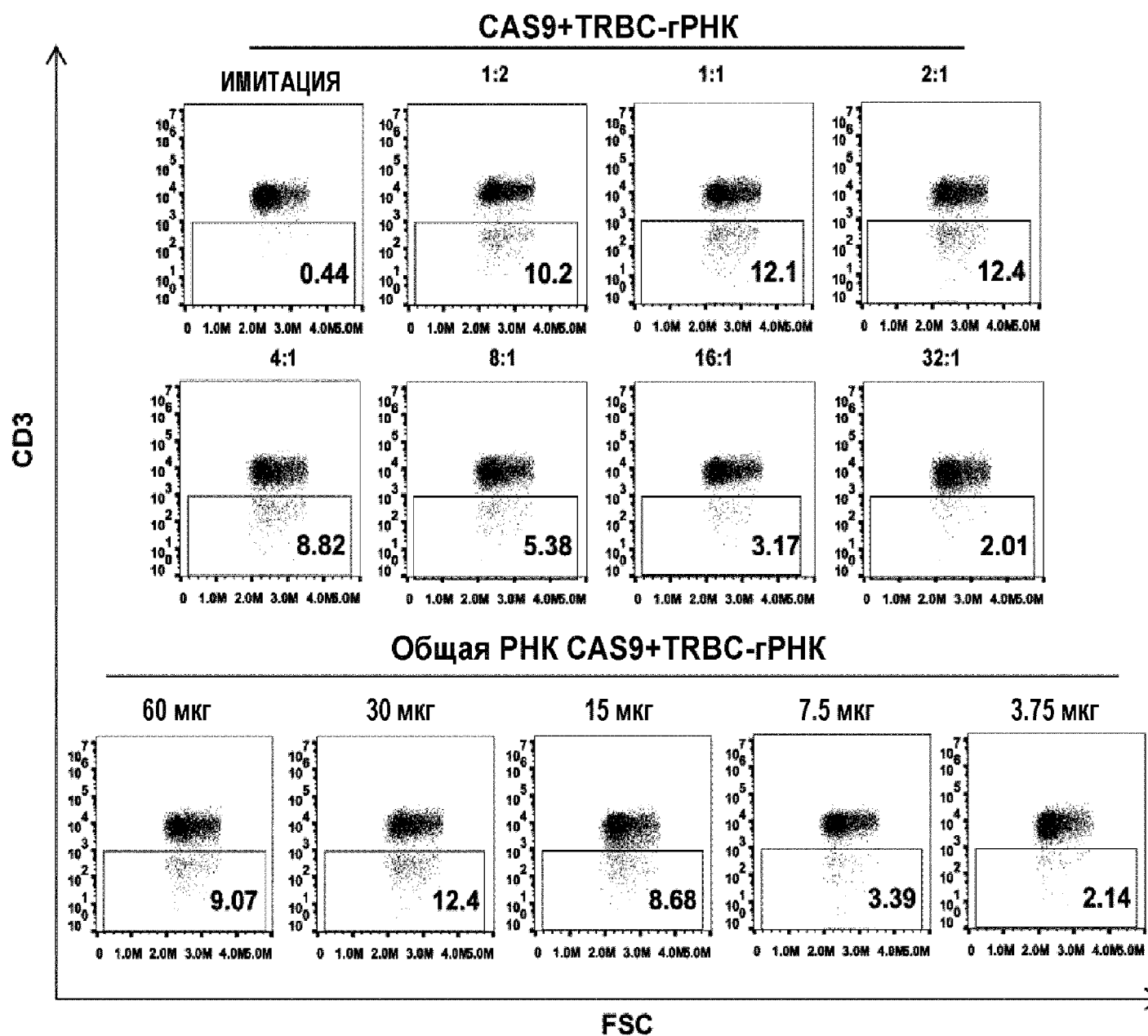
ФИГ.50А



ФИГ.50В



ФИГ.51А

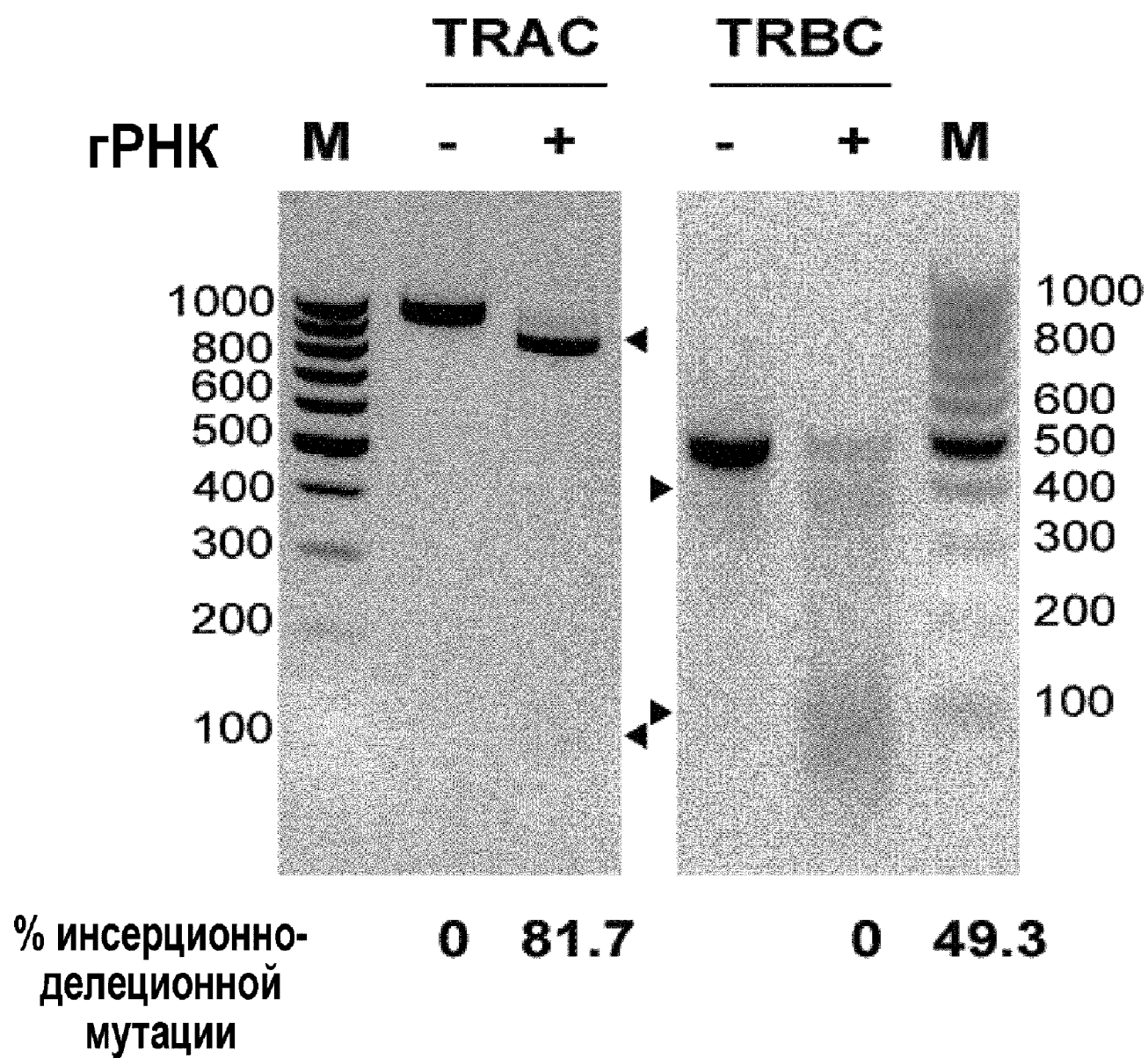


90/142

CAS9/ раз	гРНК/ раз	Белок %	Геном %
1	0	0	0
1	1	17	27.7 (5/18)
1	2	49	60 (12/20)
1	3	82.4	89.4(17/19)
1	4	47.8	55 (11/20)

ФИГ.51В

ФИГ.52

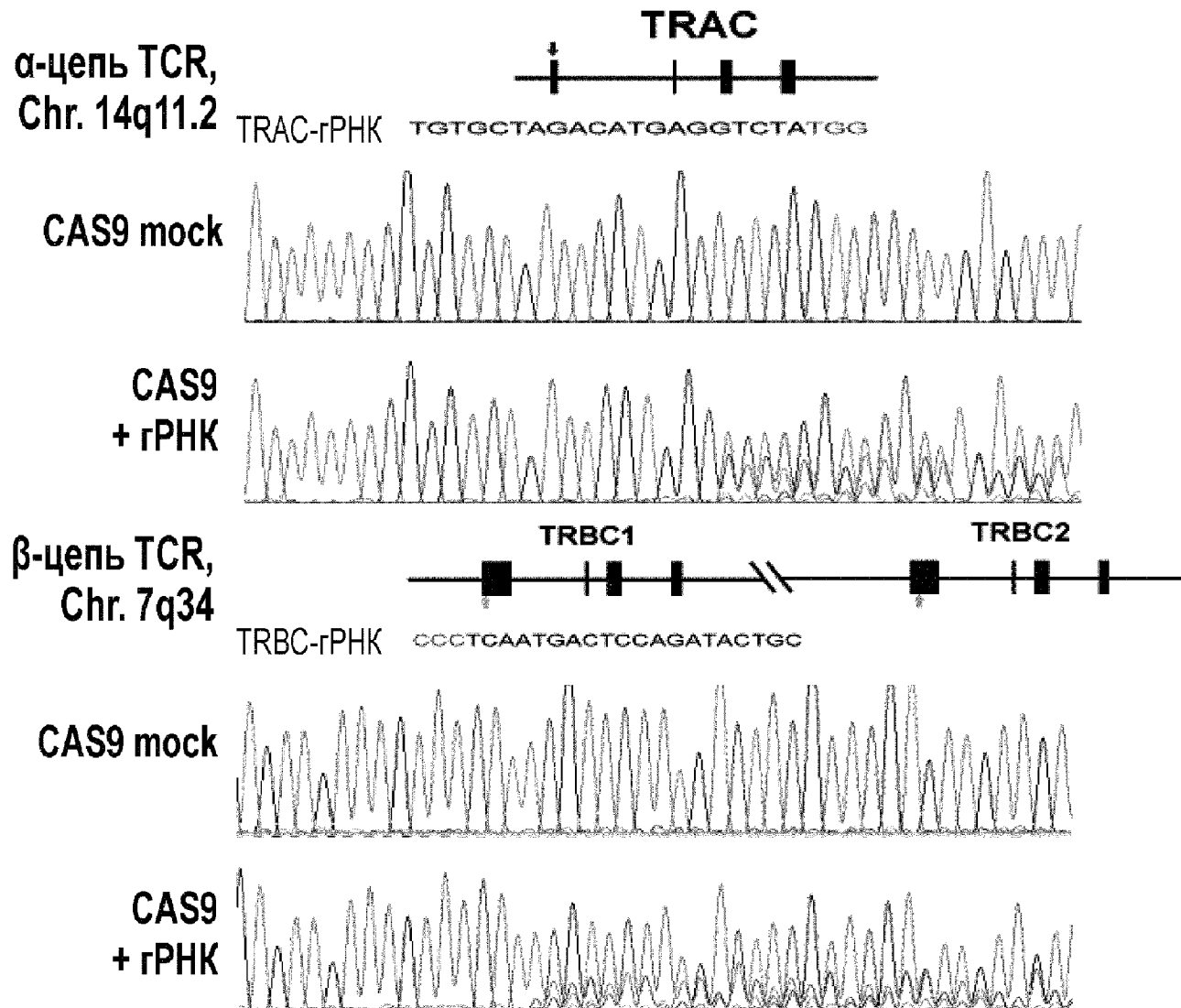


TRAC WT TATATCACAGACAAAAC TGTGCTAGACATGAGGTTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT
(X4) TATATCACAGACAAAAC TGTGCTAGACATGAG - TCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT
(X3) TATATCACAGACAAAAC TGTGCTAGACATG - - GTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT
(X1) TATATCACAGACAAAAC TGTGCTAGACATGA - GTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT
(X1) TATATCACAGACAAAAC TGTGCTAGACATG - - - TCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT
(X1) TATATCACAGACAAAAC TGTGCTAGAC - TGAGGTTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT
(X1) TATATCACAGACAAAAC TGTGCTAG - - - TGAGGTTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT
(X1) TATATCACAGACAAAAC TGTGCT - - - - TGAGGTTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCT
(X1) TATATCACAGACAAAAC TGTGCTAGACATGAGGTTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCC
(X1) TATATCACAGACAAAAC TGTGCTAGACATGAGGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCC

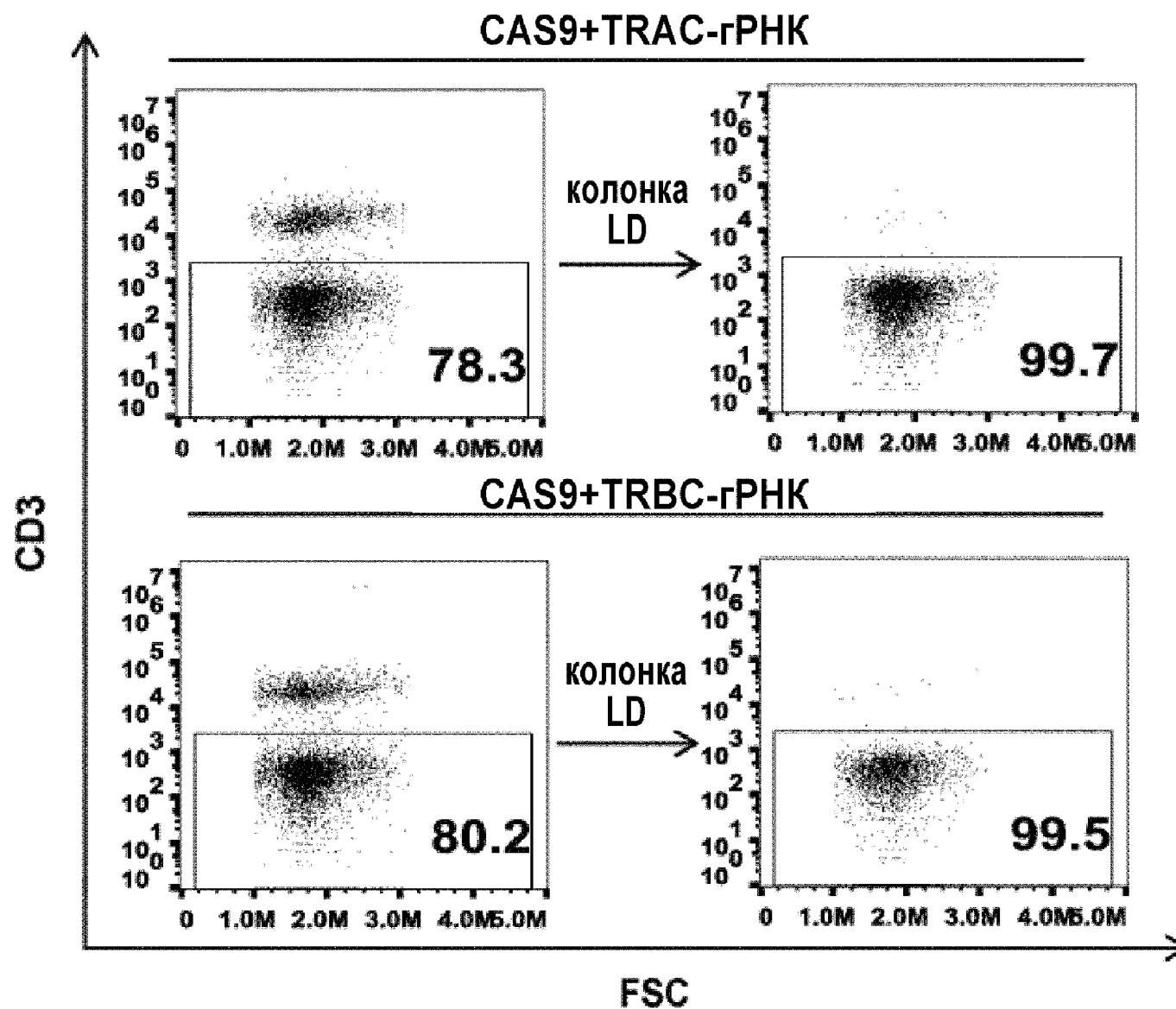
TRBC1 WT AGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
(X2) AGCAGCCCGCCCTC - ATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
(X2) AGCAGCCCGCC - TCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
(X1) AGCAGCCCGCCCTCAATGACTC - AGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
(X1) AGCAGCCCGCCCTCAATGACT - - AGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
(X1) AGCAGCCCGCCC - - - - GACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
(X1) AGCAGCCCGCCCTCAAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCT
(X1) AGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCT

TRBC2 WT AGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
(X3) AGCAGCCCGCCCTCAATGAC -- AGATACTGCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
(X2) AGCAGCCCGCCCTCAATGACTC - AGATACTGCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
(X1) AGCAGCCCGCCCTCA - - - - - ACTGCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
(X1) AGCAGCCCGCC - TCA-TGACT - CAGATACTG - CTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCT
(X1) AGCAGCC - - - - - ACTG - - - - - C - G - - - - - TGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCT
(X1) AGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCT

ФИГ. 53А

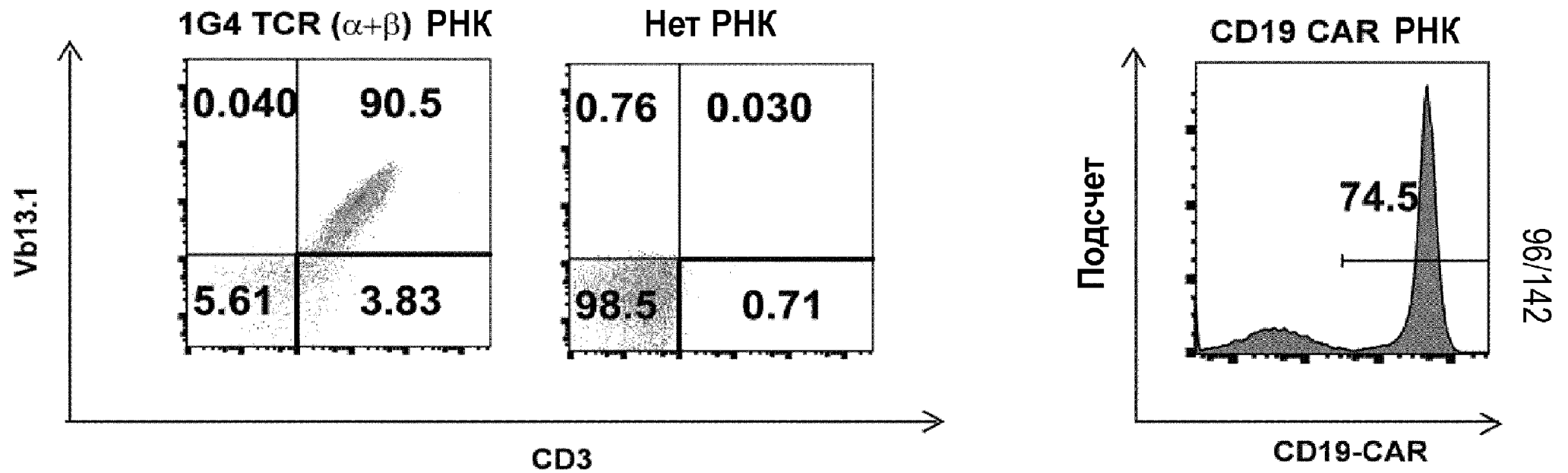


ФИГ.53В

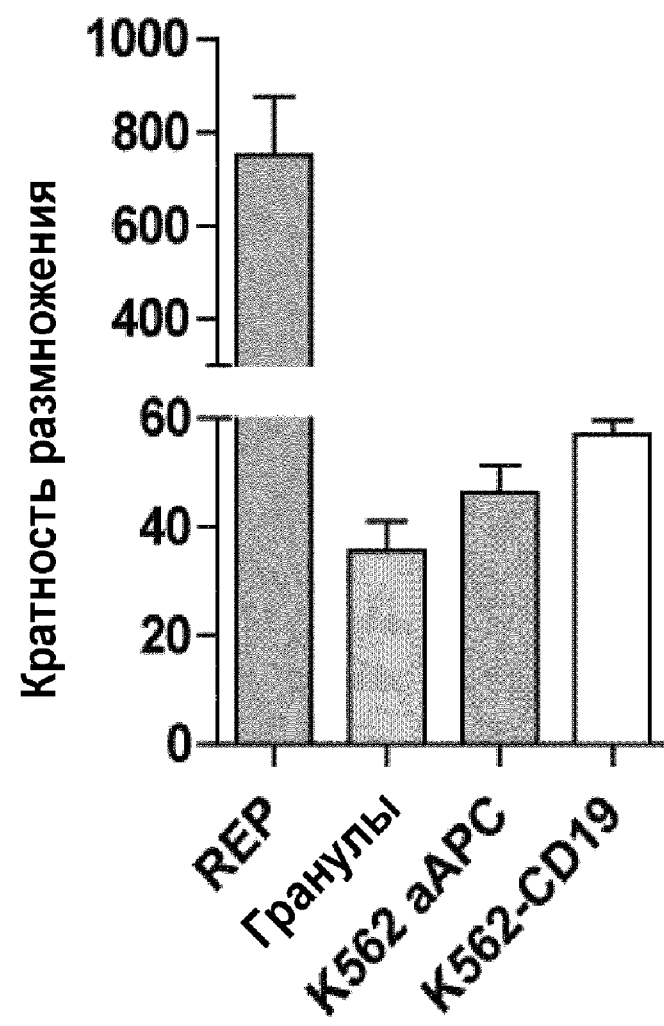


ФИГ.54

TCR/CD3-отрицательные Т-клетки

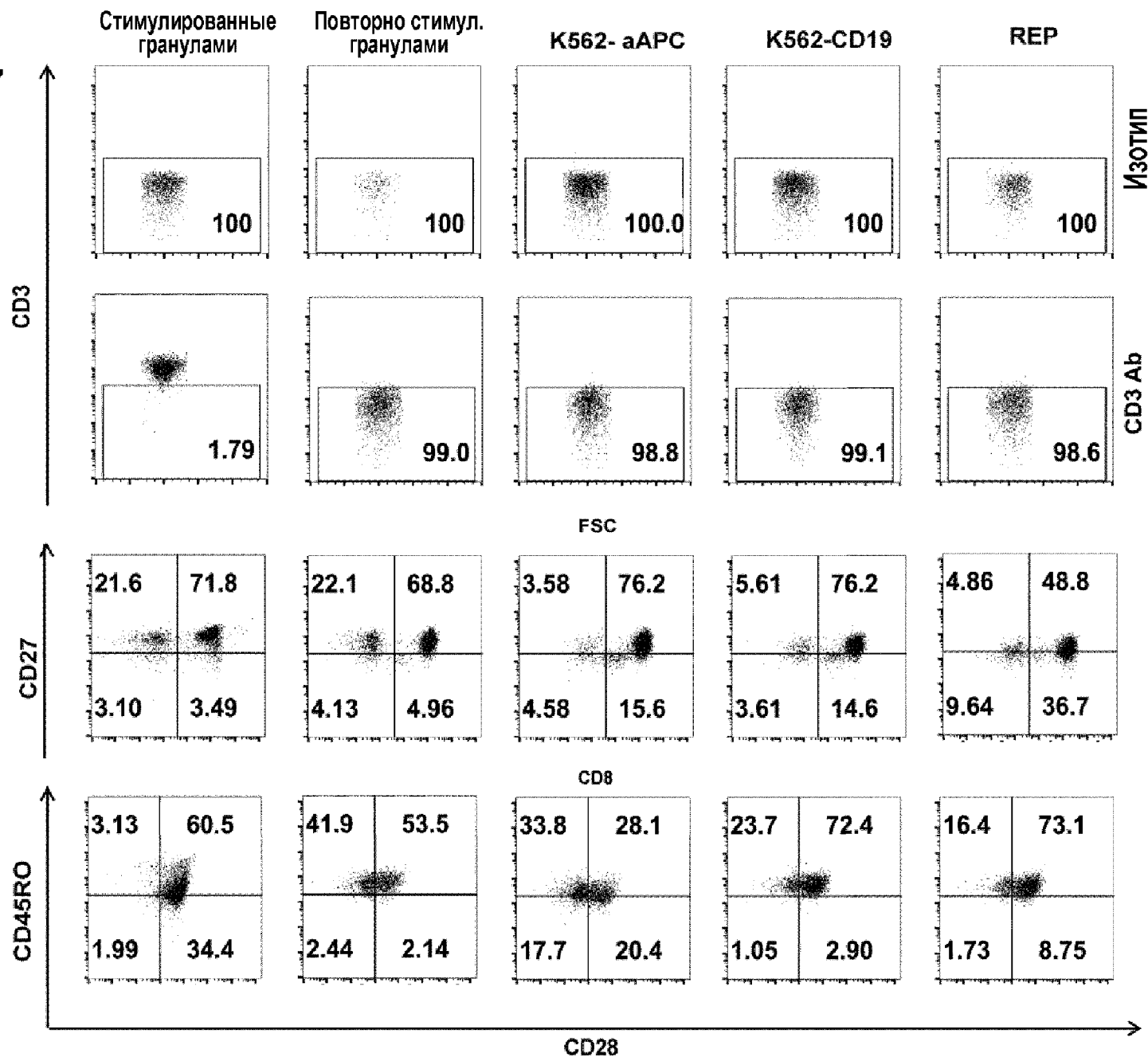


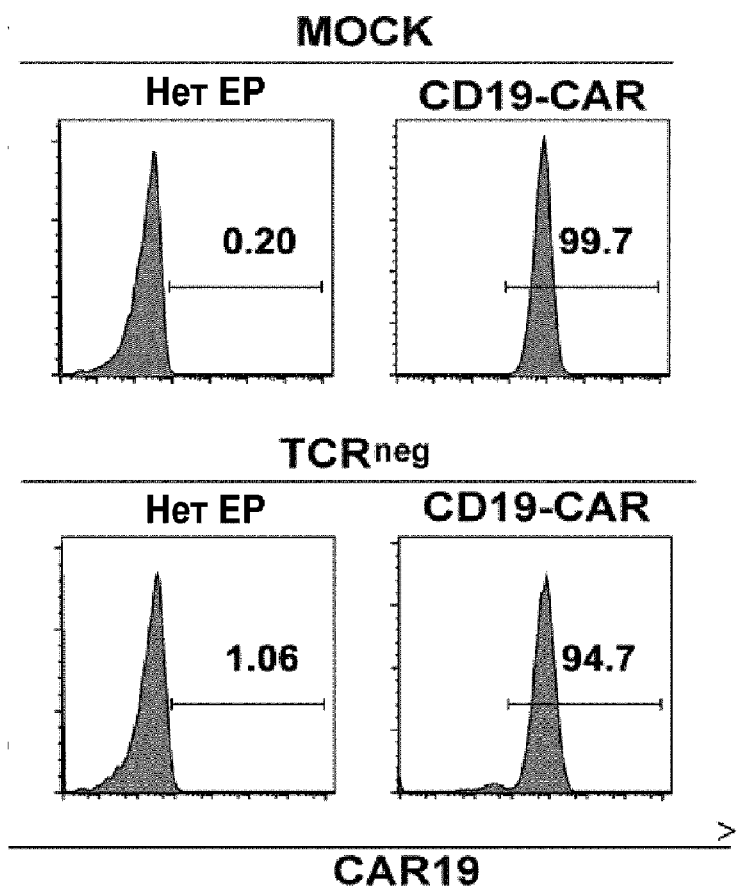
ФИГ.55



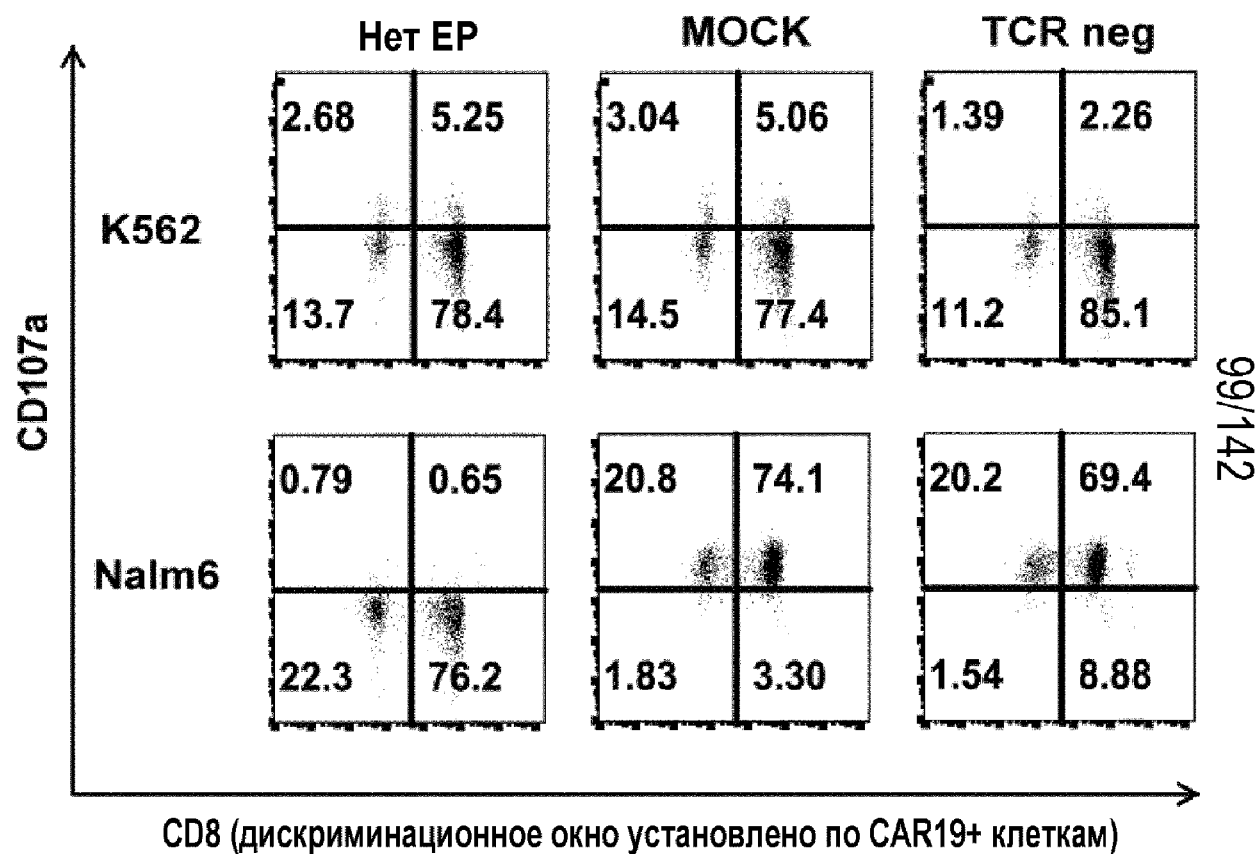
ФИГ.56

ФИГ.57

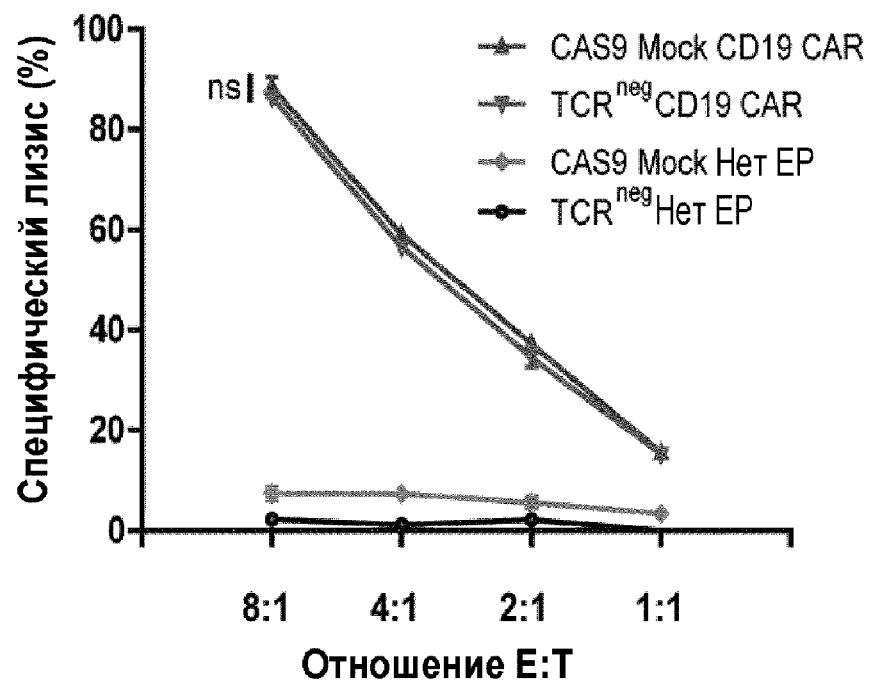




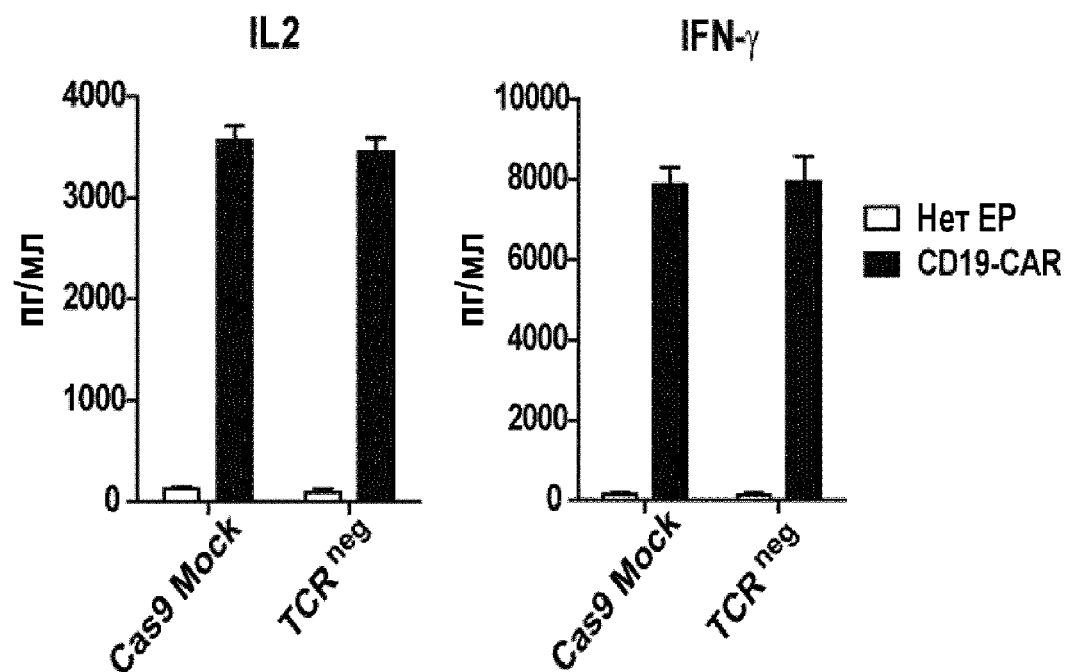
ФИГ.58



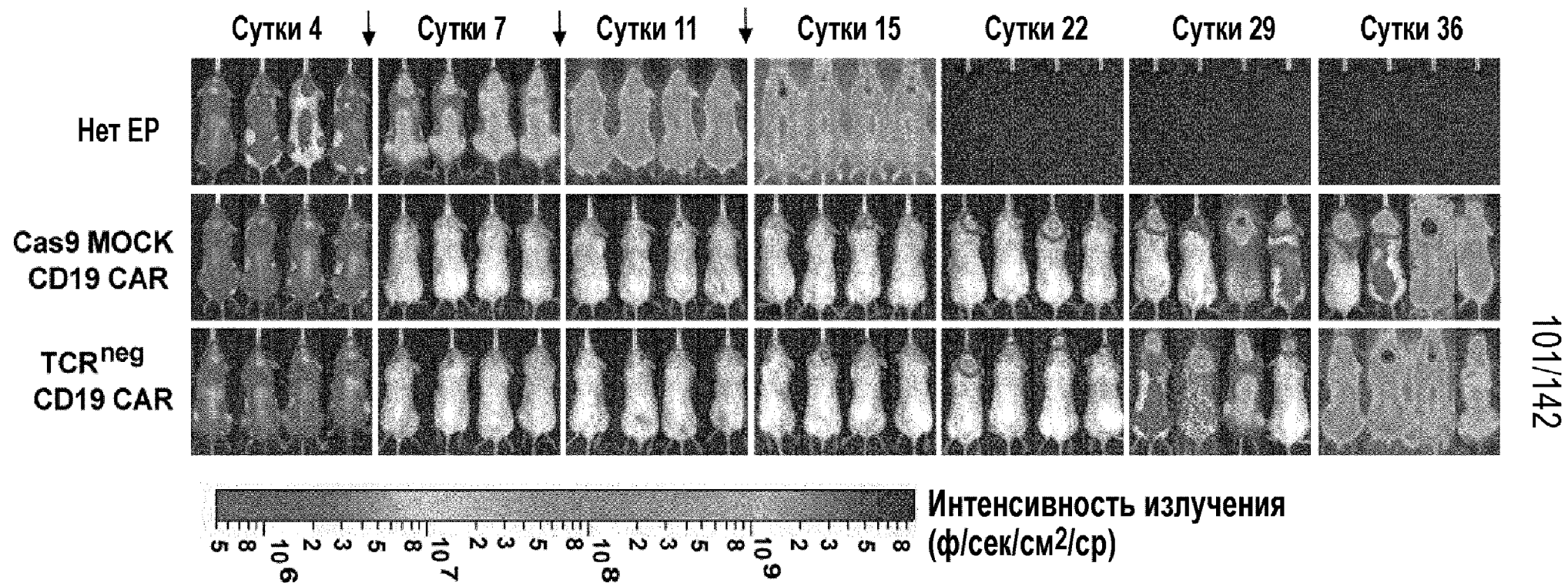
ФИГ.59А



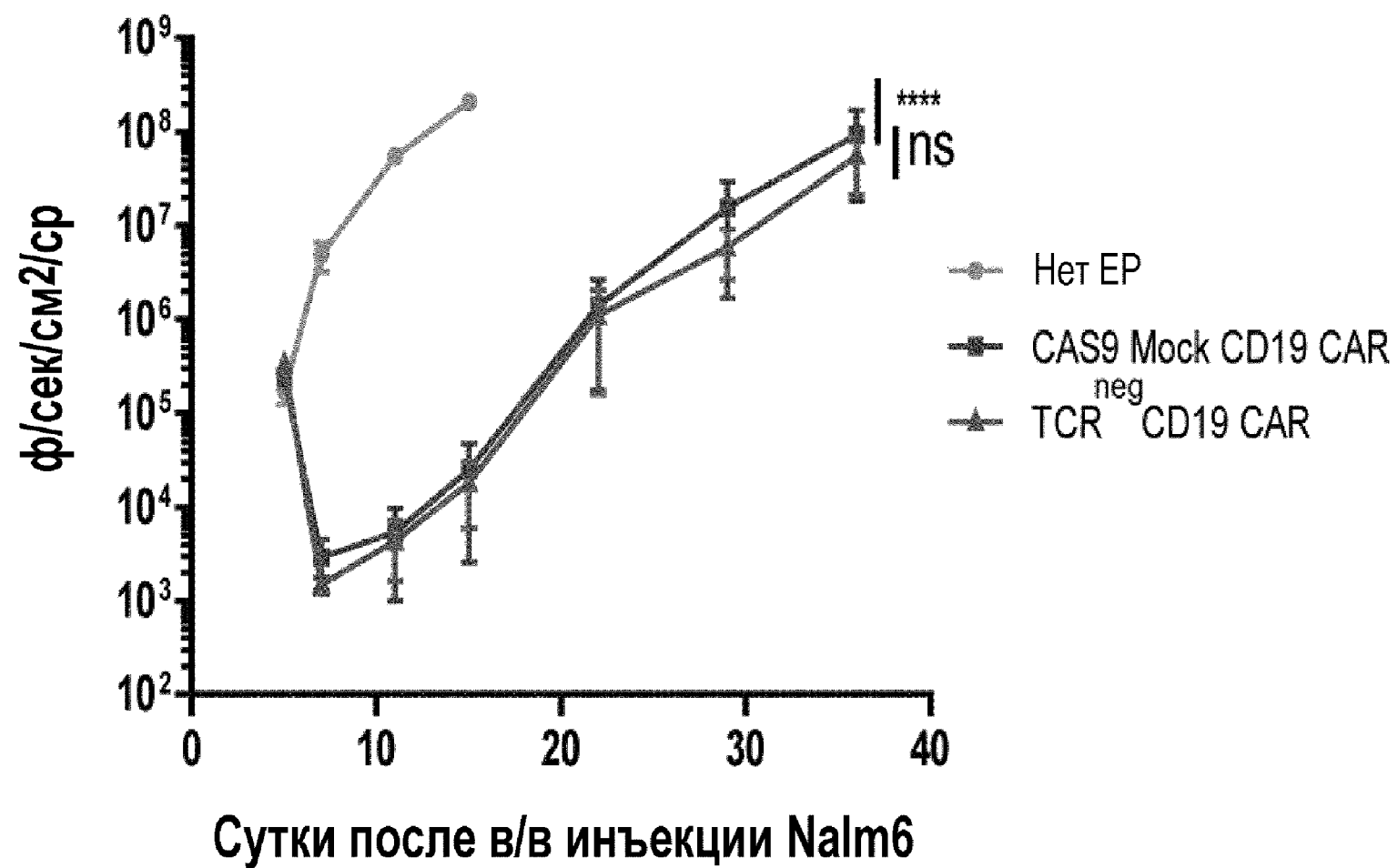
ФИГ.59В



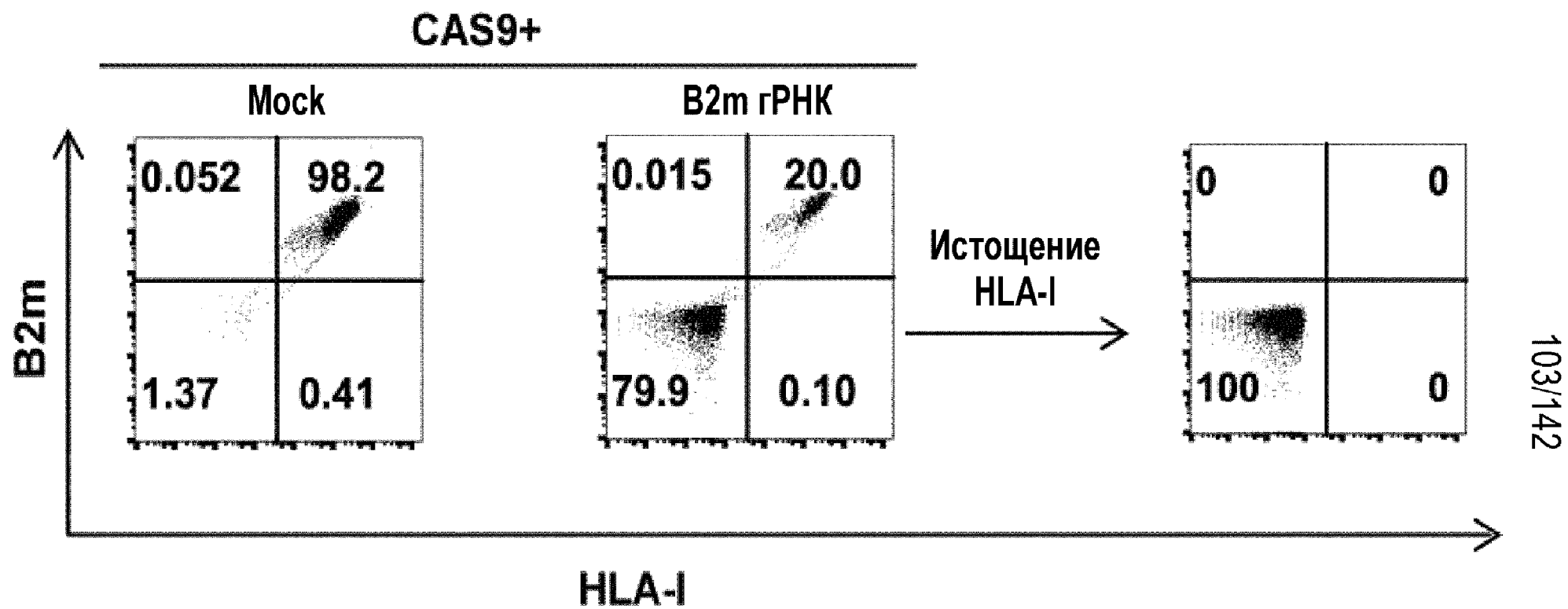
ФИГ.59С



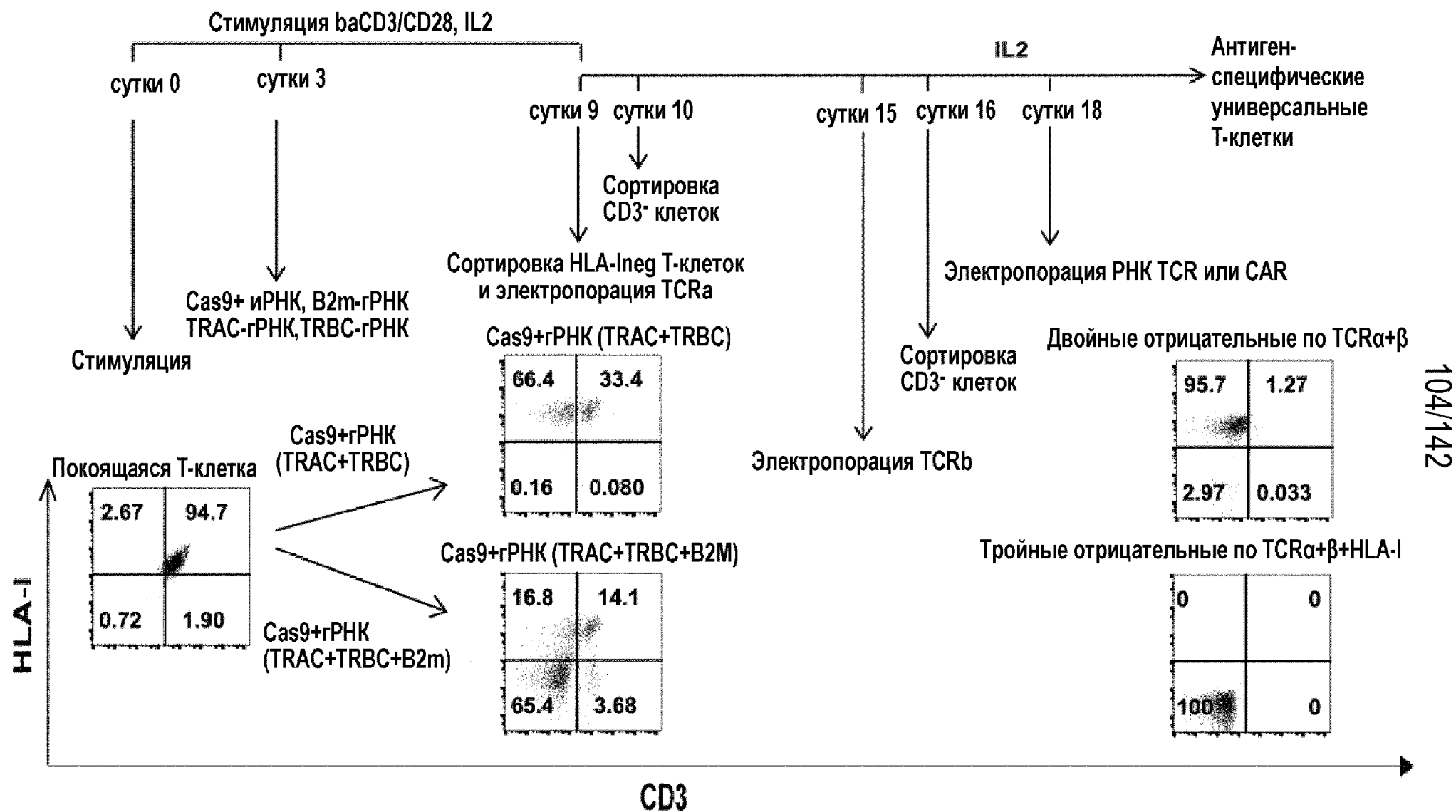
ФИГ.59D



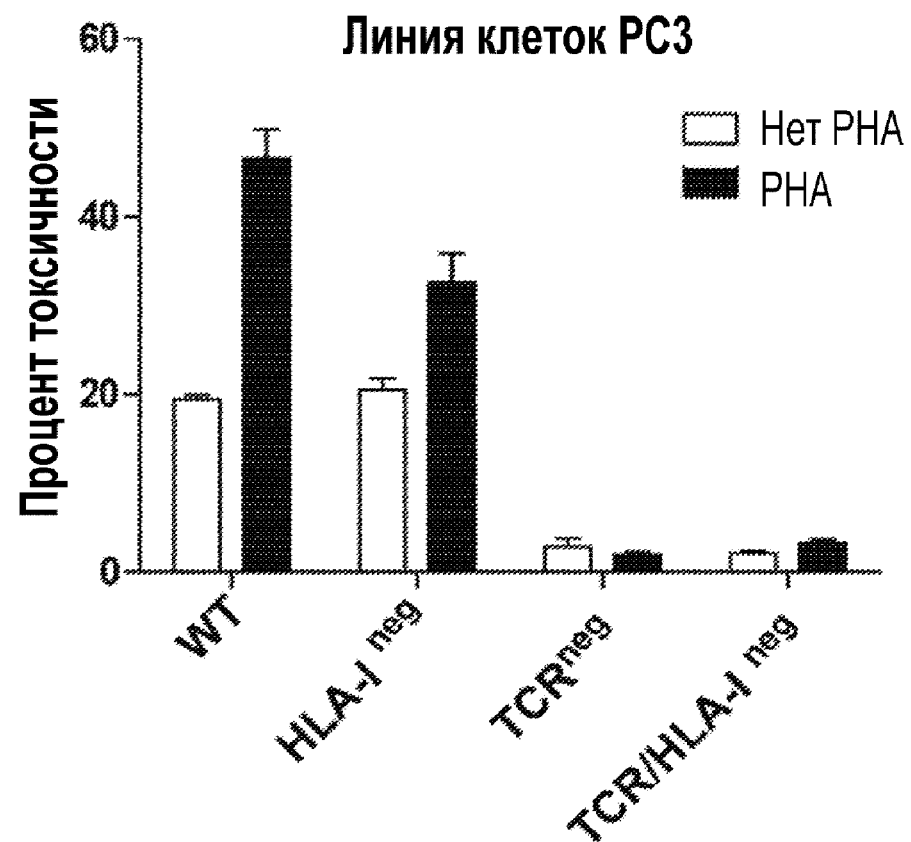
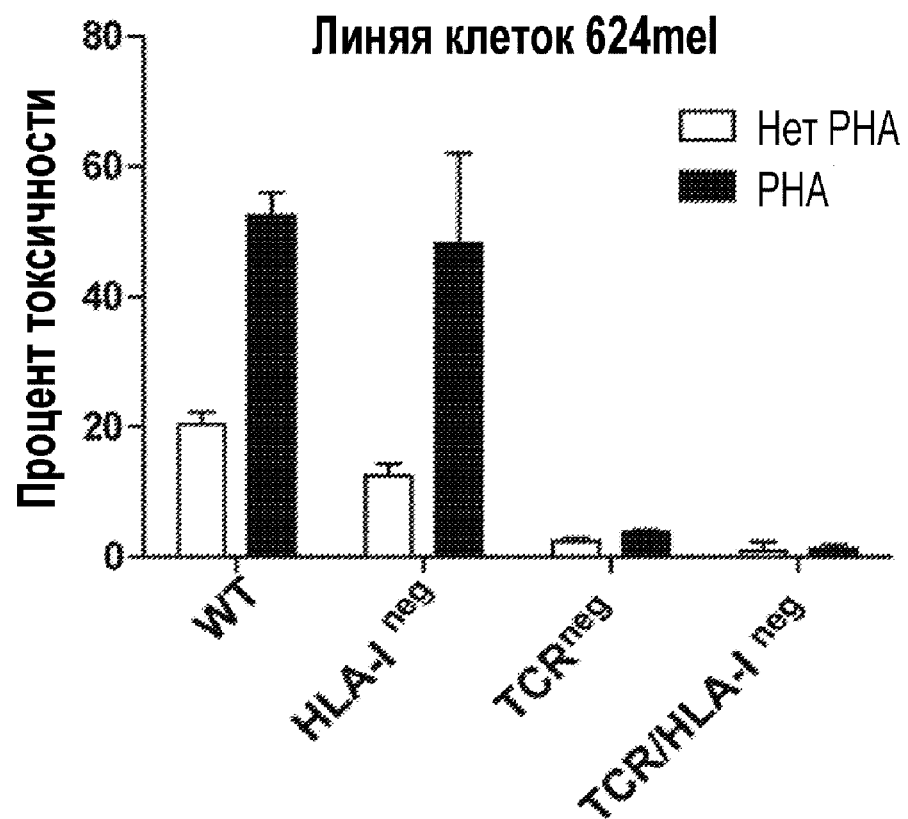
ФИГ.59Е



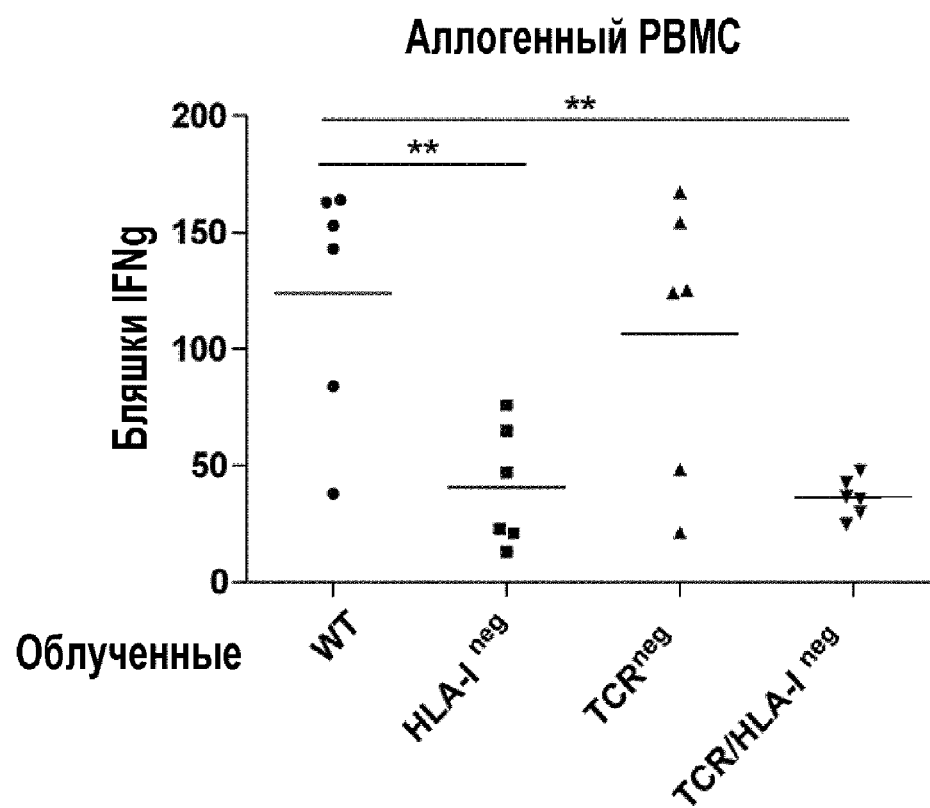
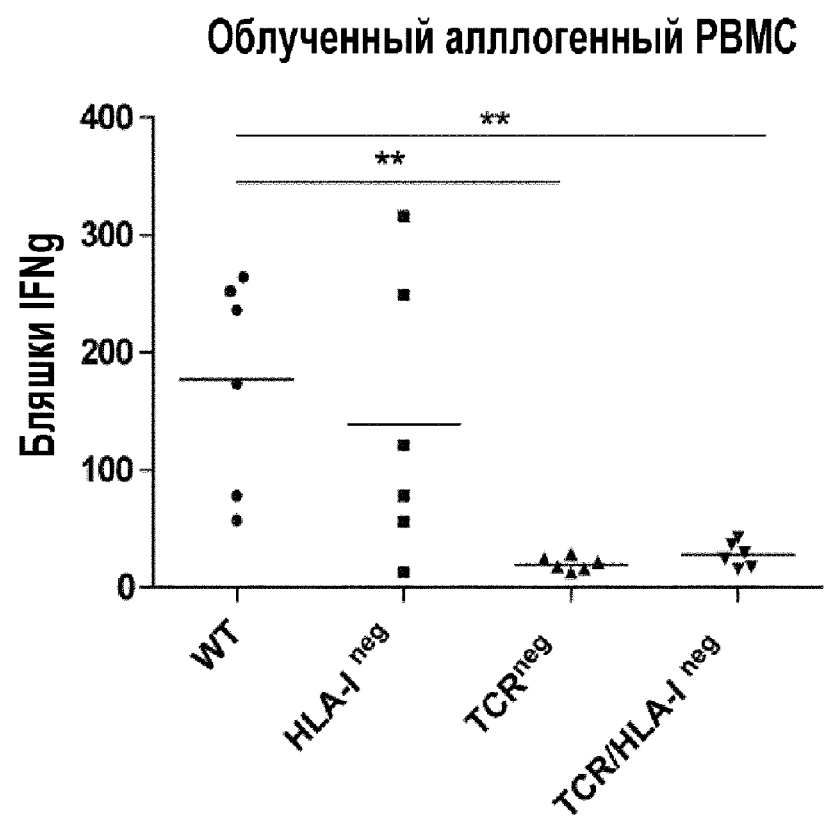
ФИГ.60



ФИГ.61

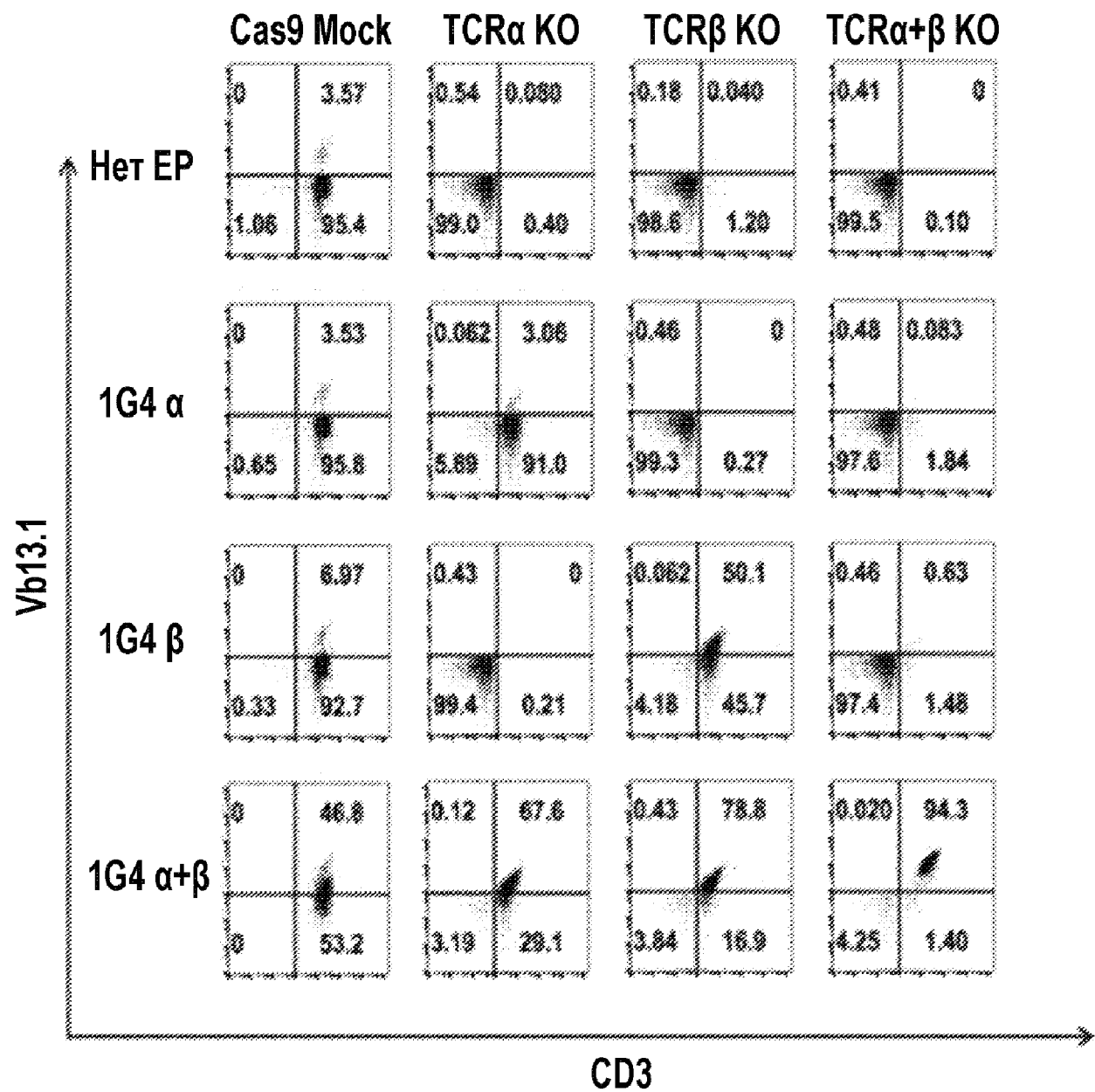


ФИГ.62



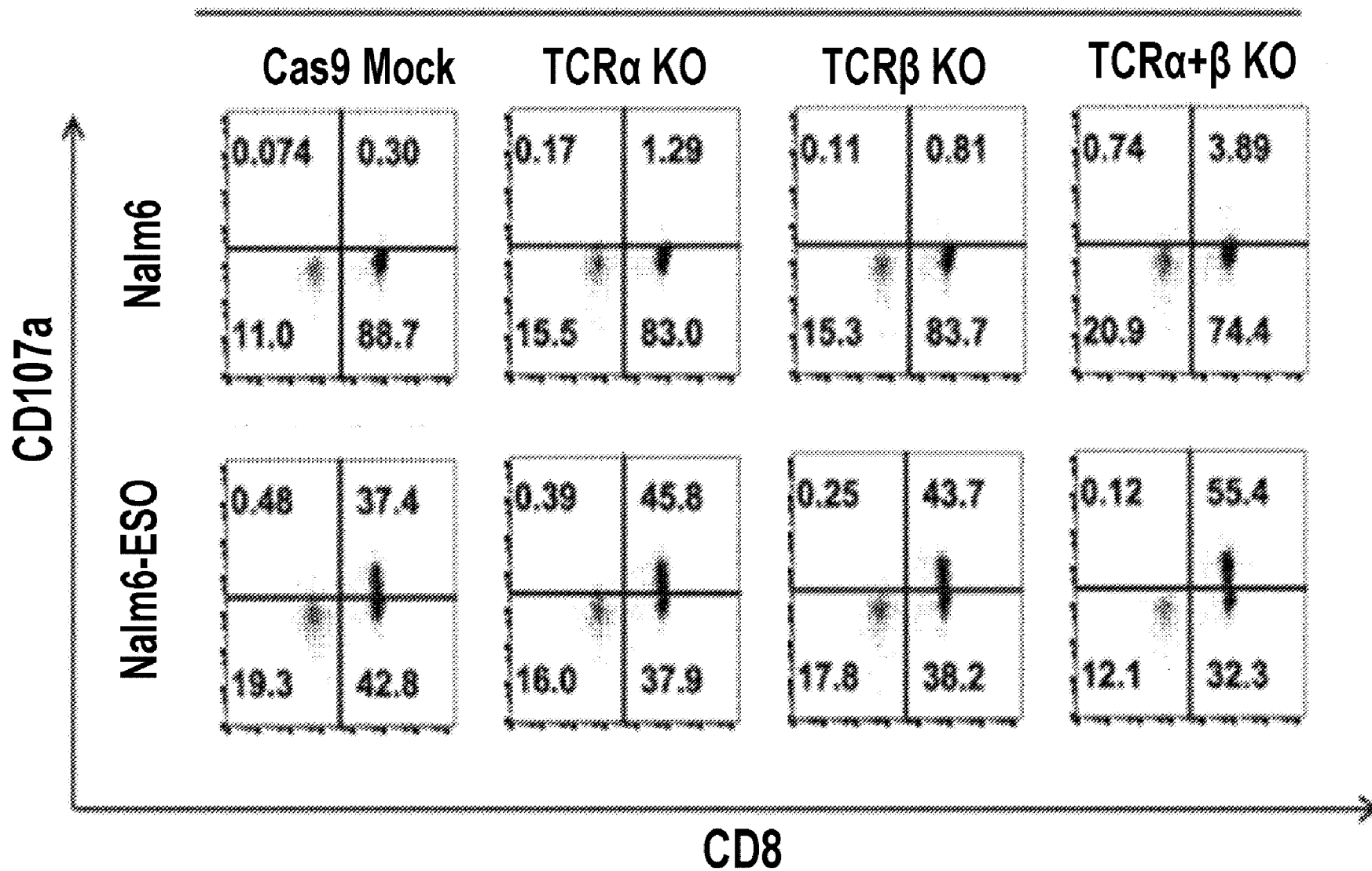
ФИГ.63

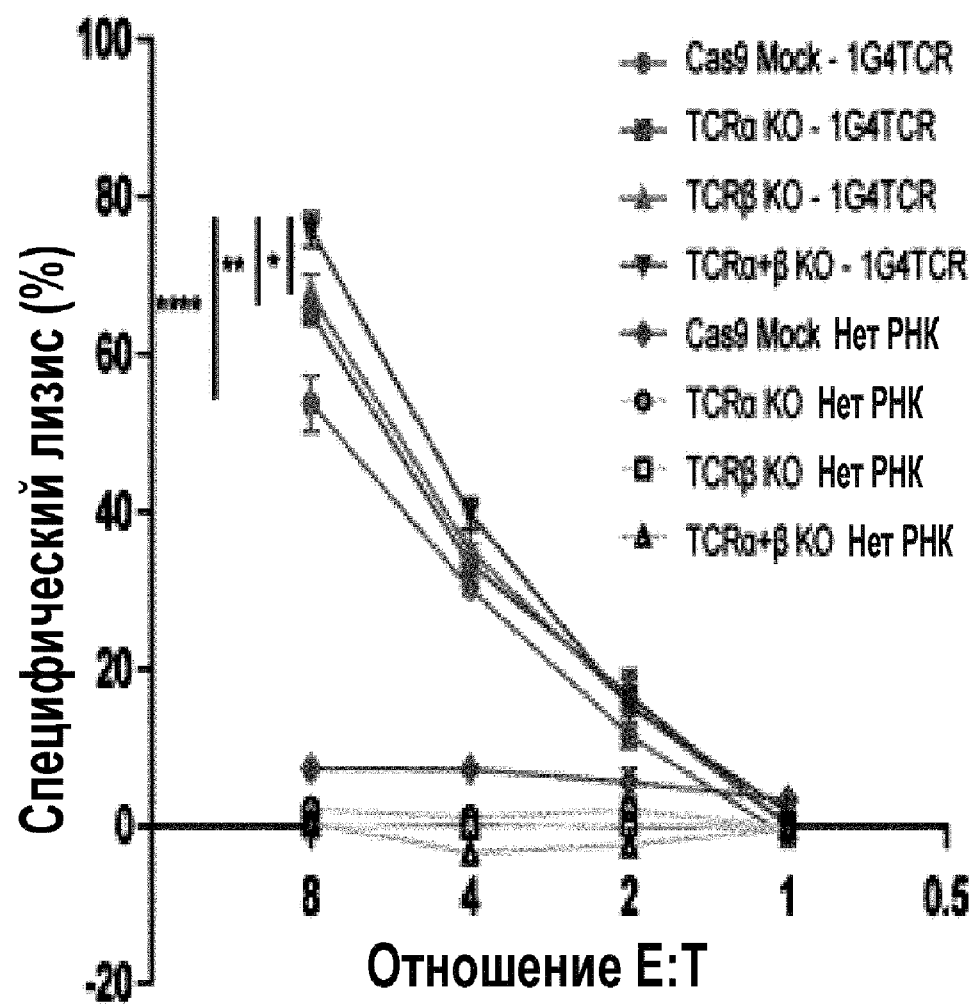
ФИГ.64



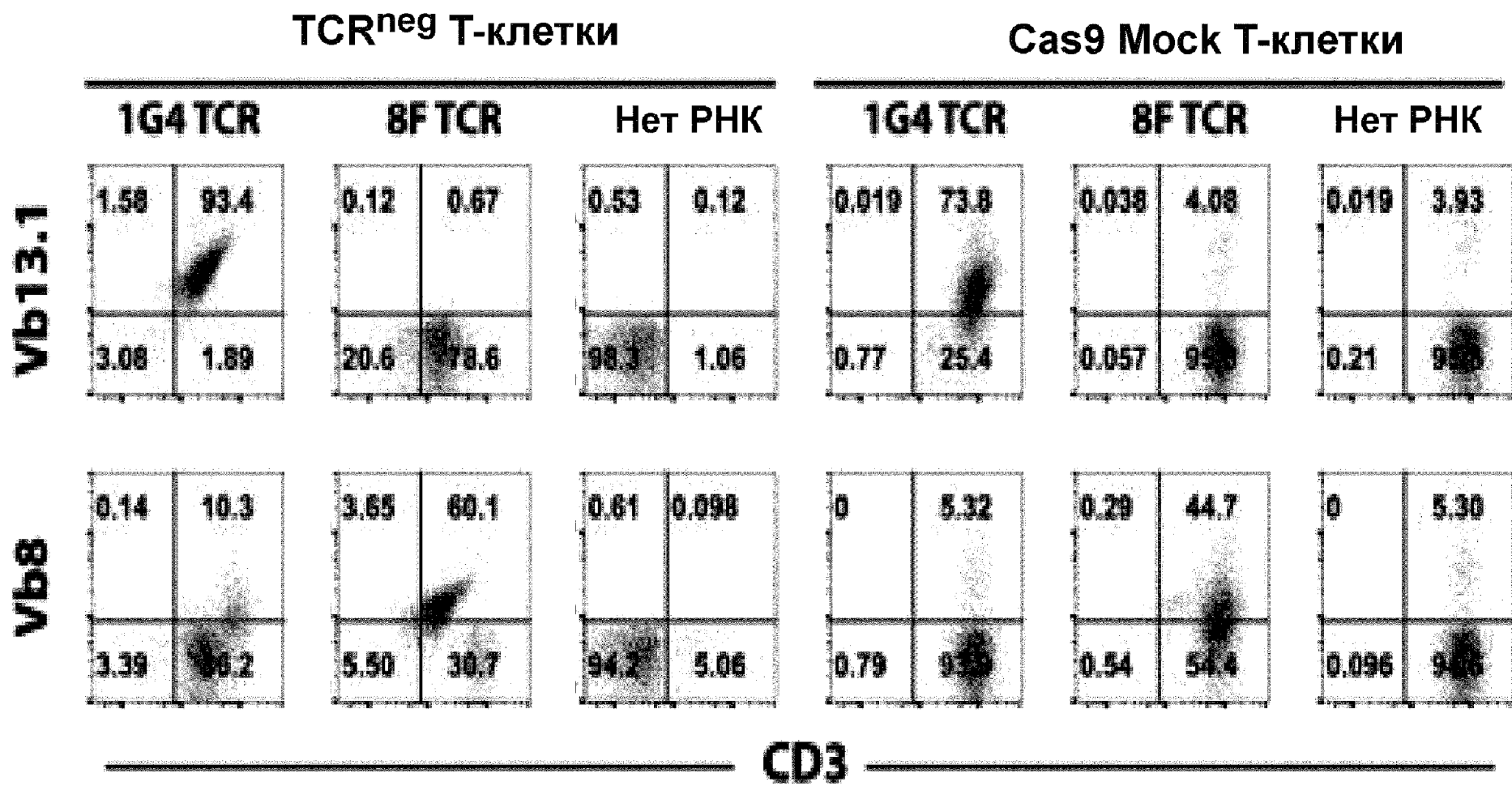
ФИГ.65А

Перенаправление 1G4TCR





ФИГ.65В



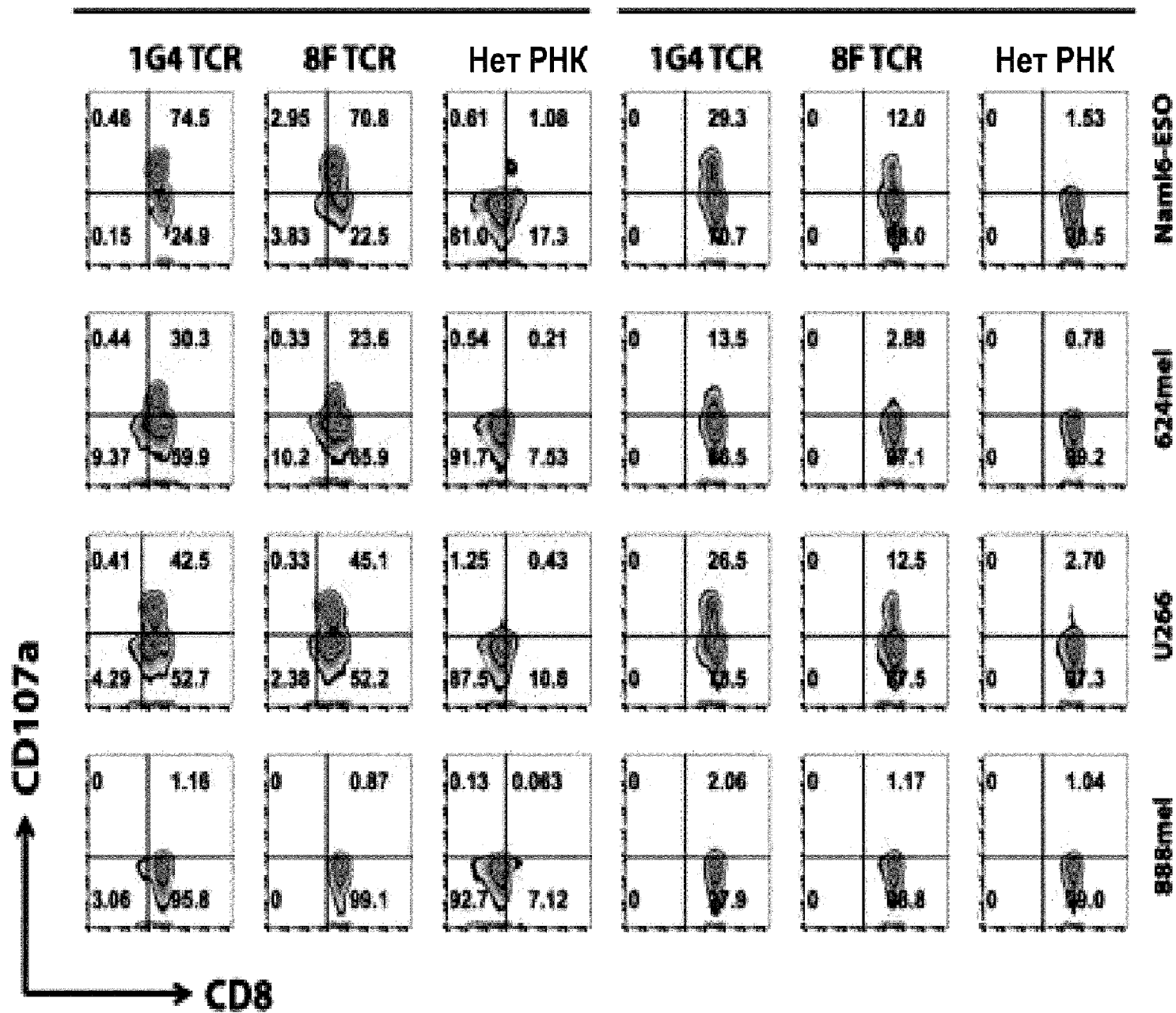
110/142

ФИГ.66

ФИГ.67А

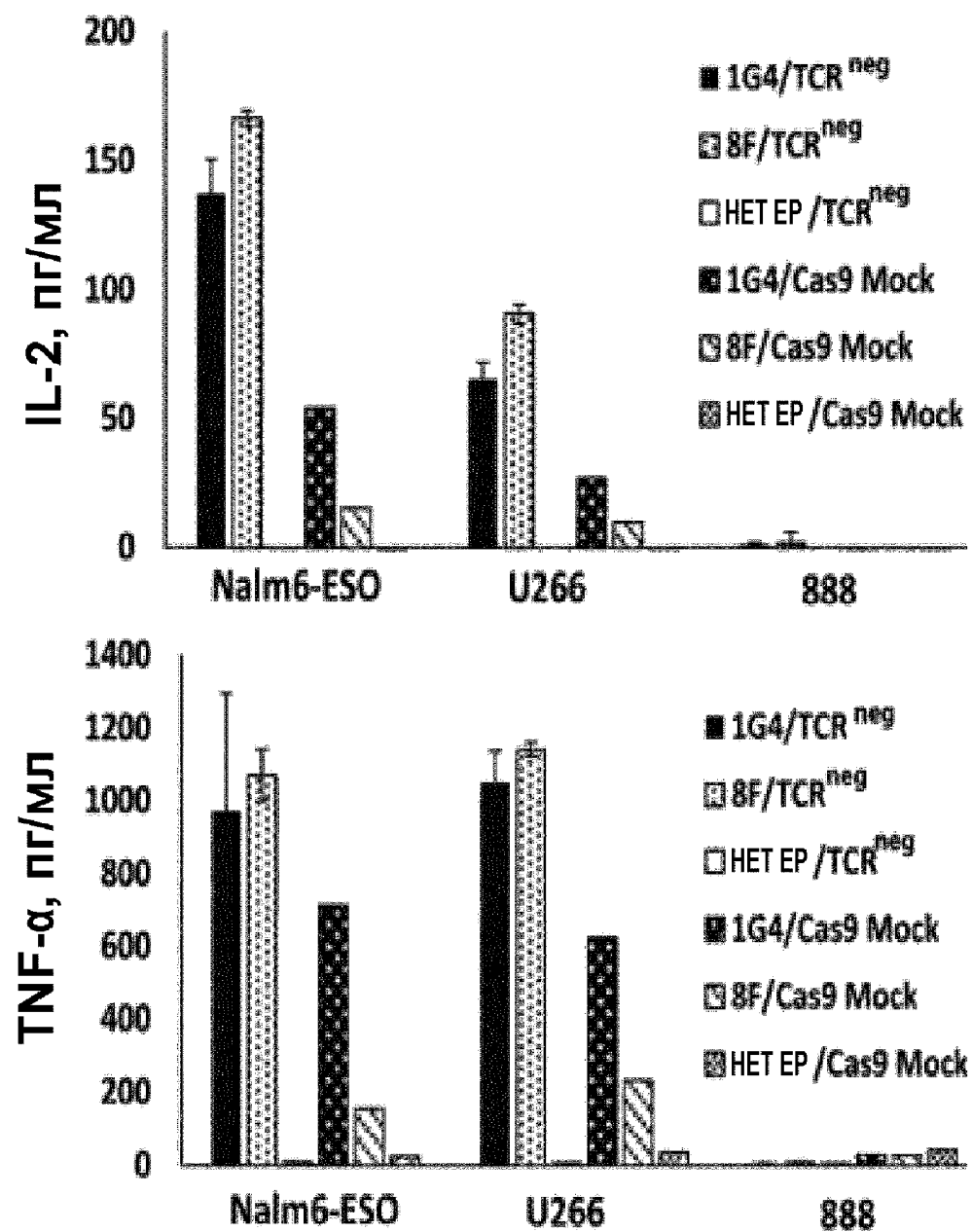
TCR^{neg} Т-клетки

Cas9 Моск Т-клетки

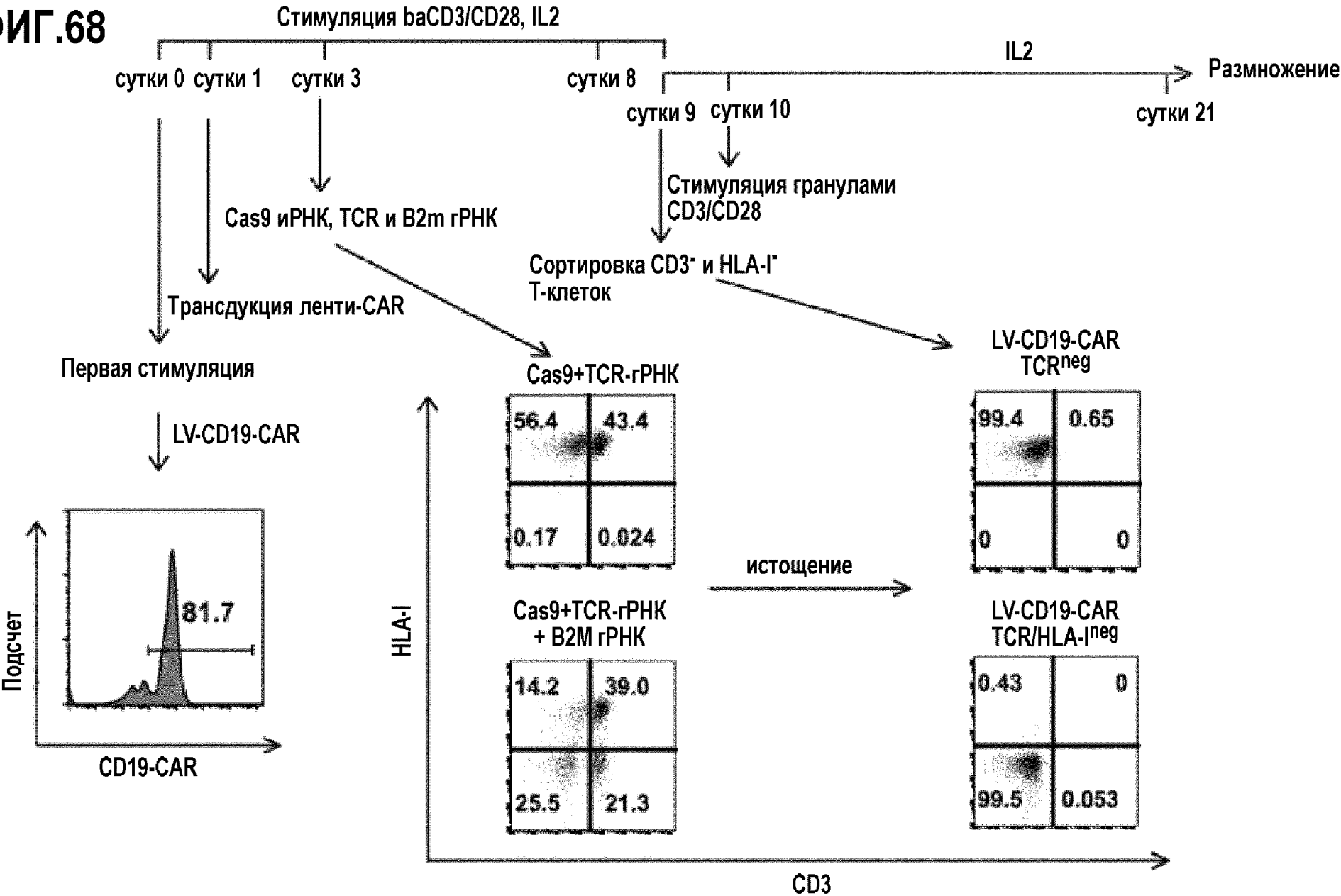


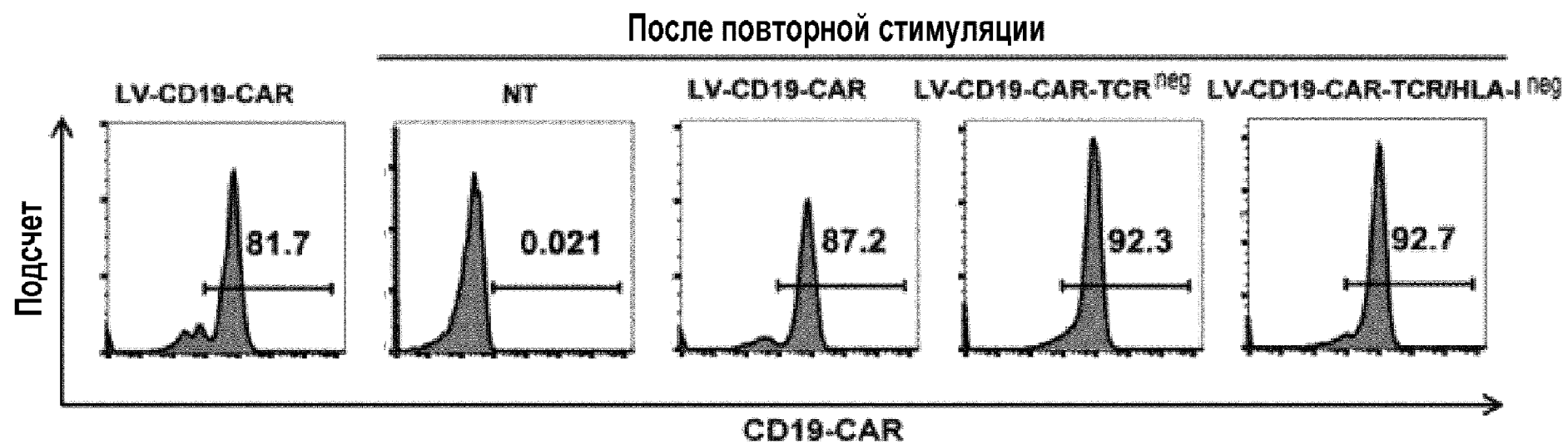
111/142

ФИГ.67В

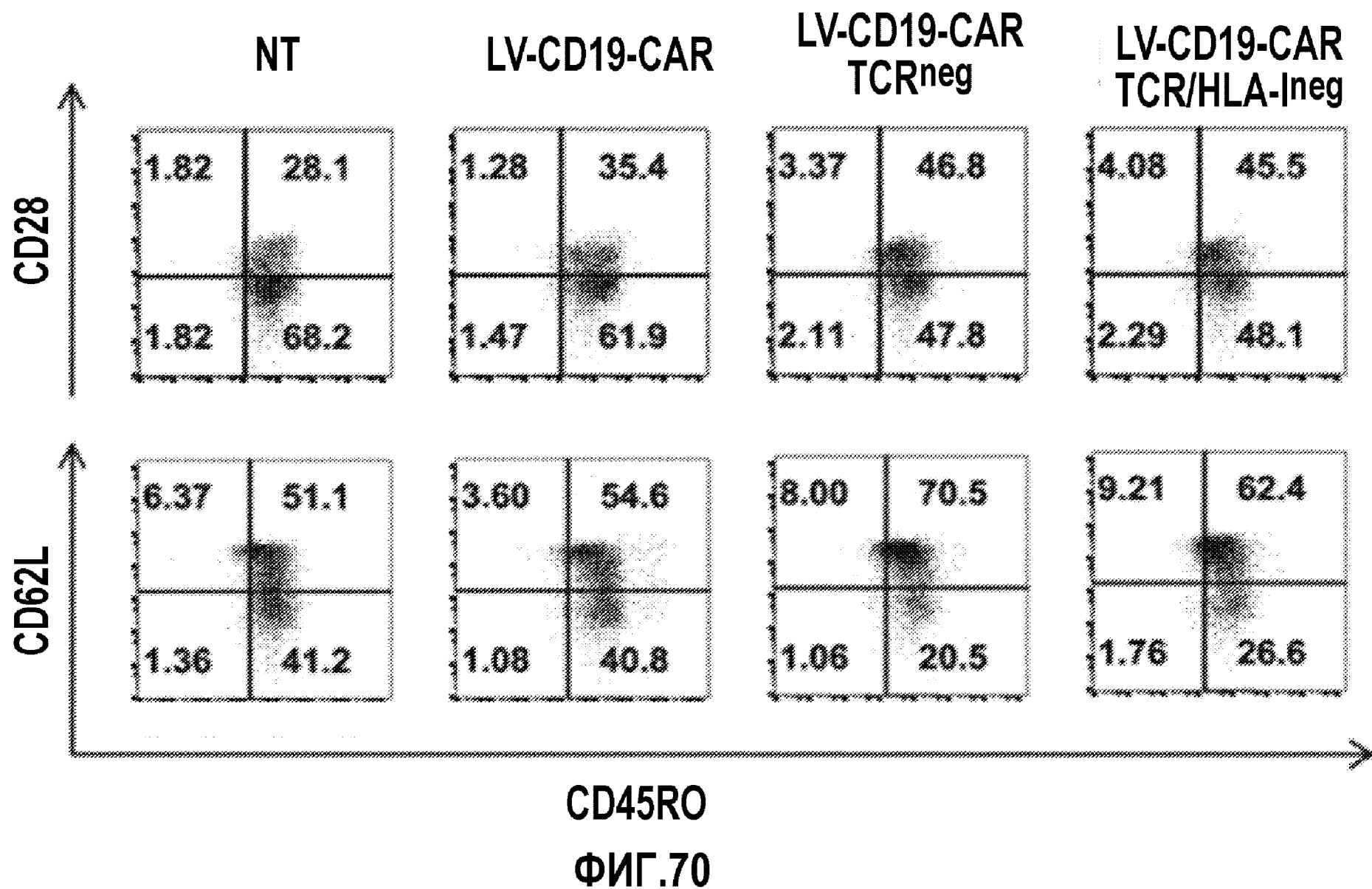


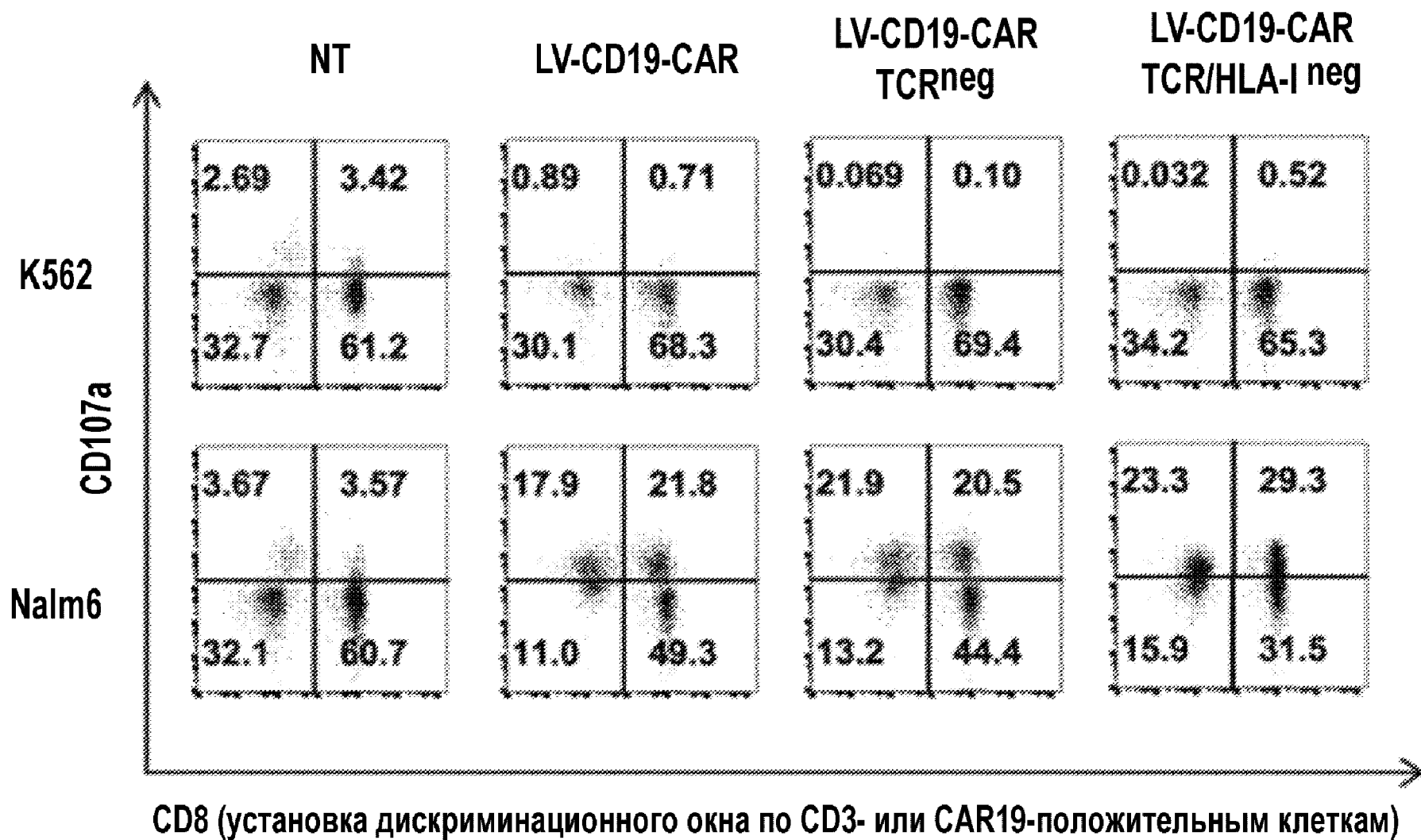
ФИГ.68





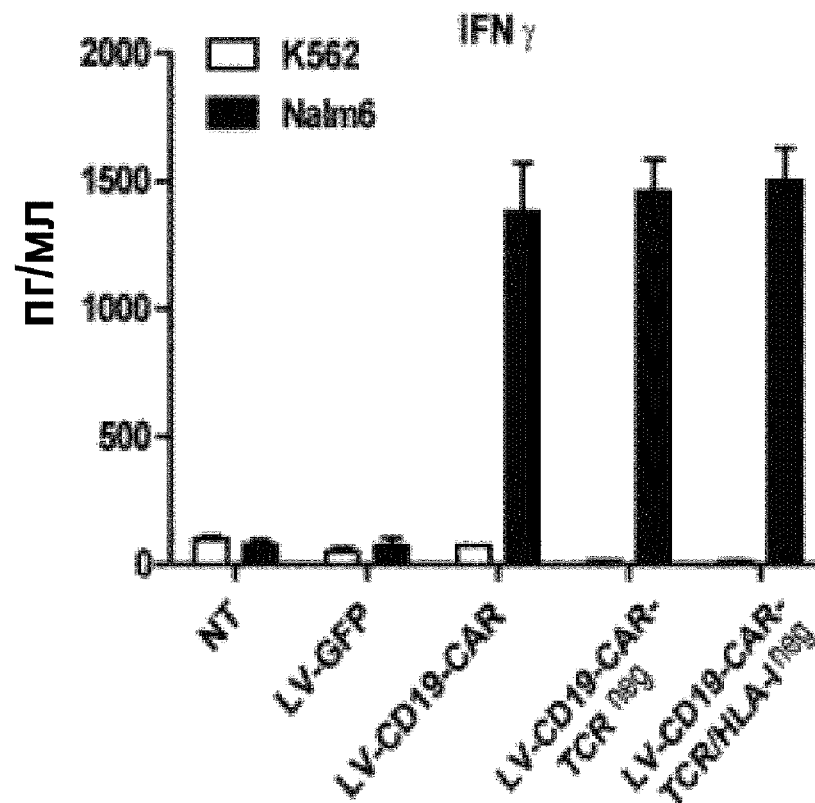
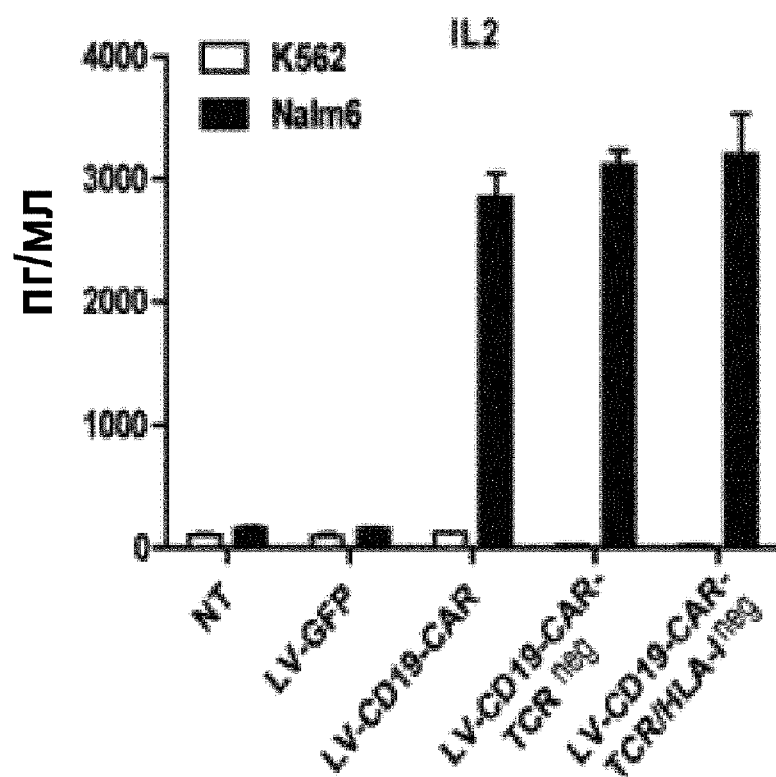
ФИГ.69



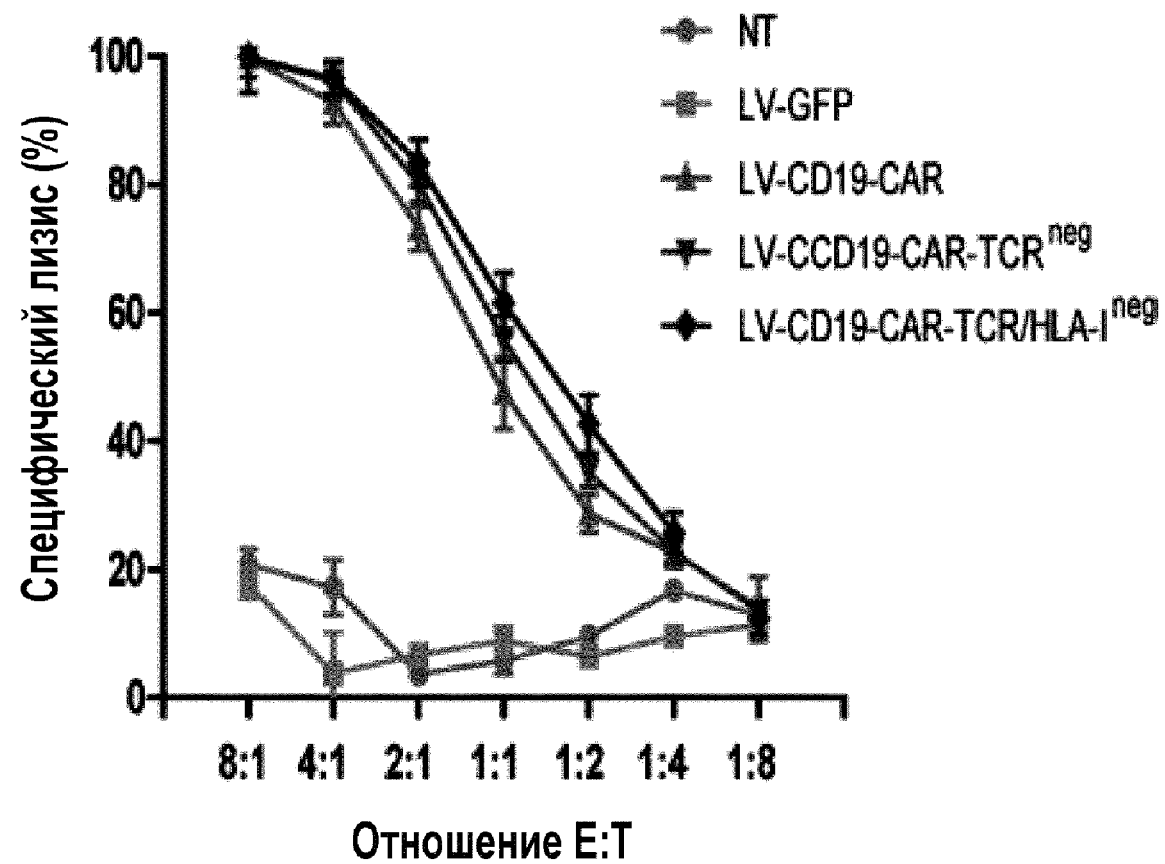


116/142

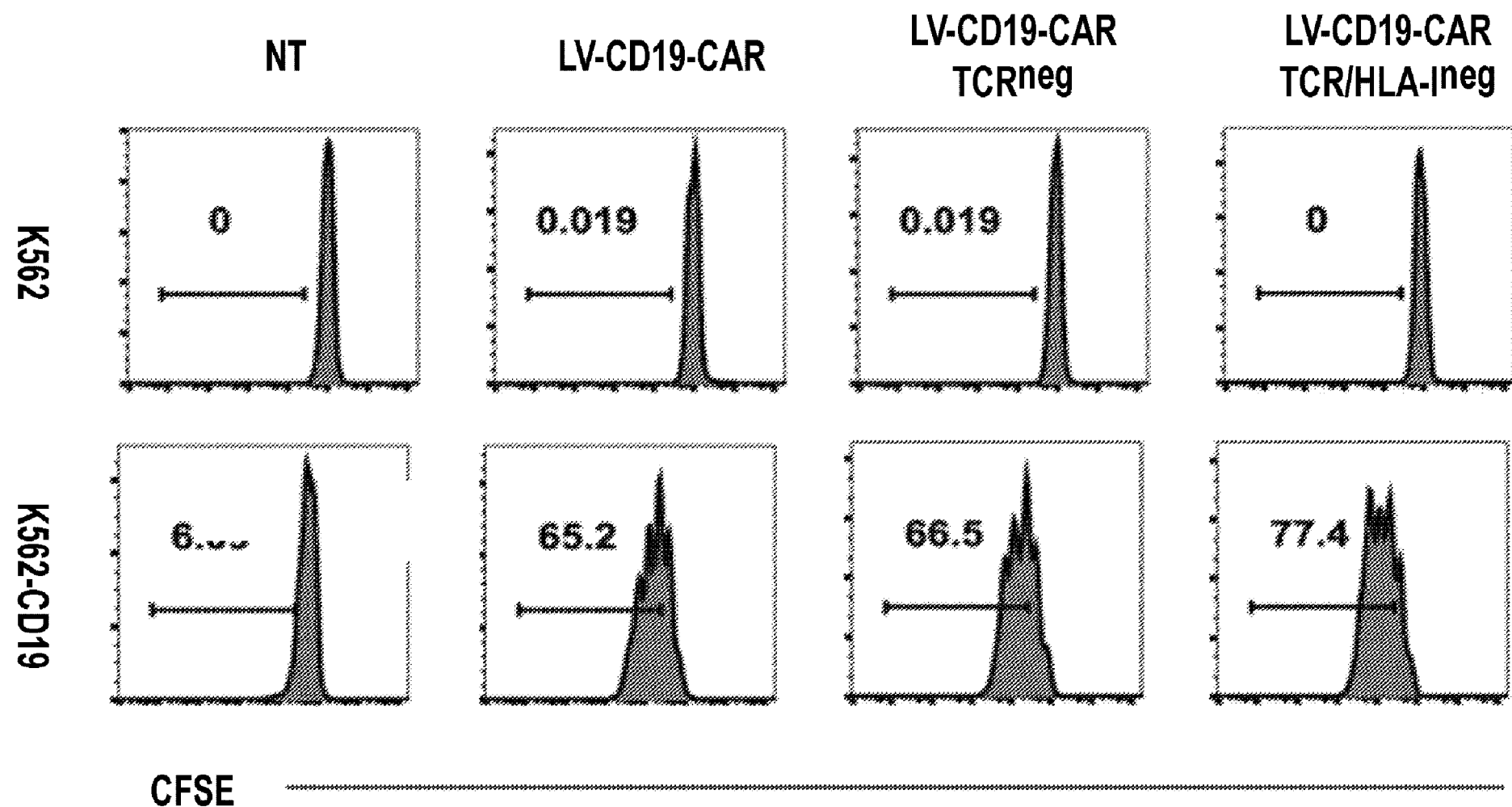
ФИГ.71



ФИГ.72

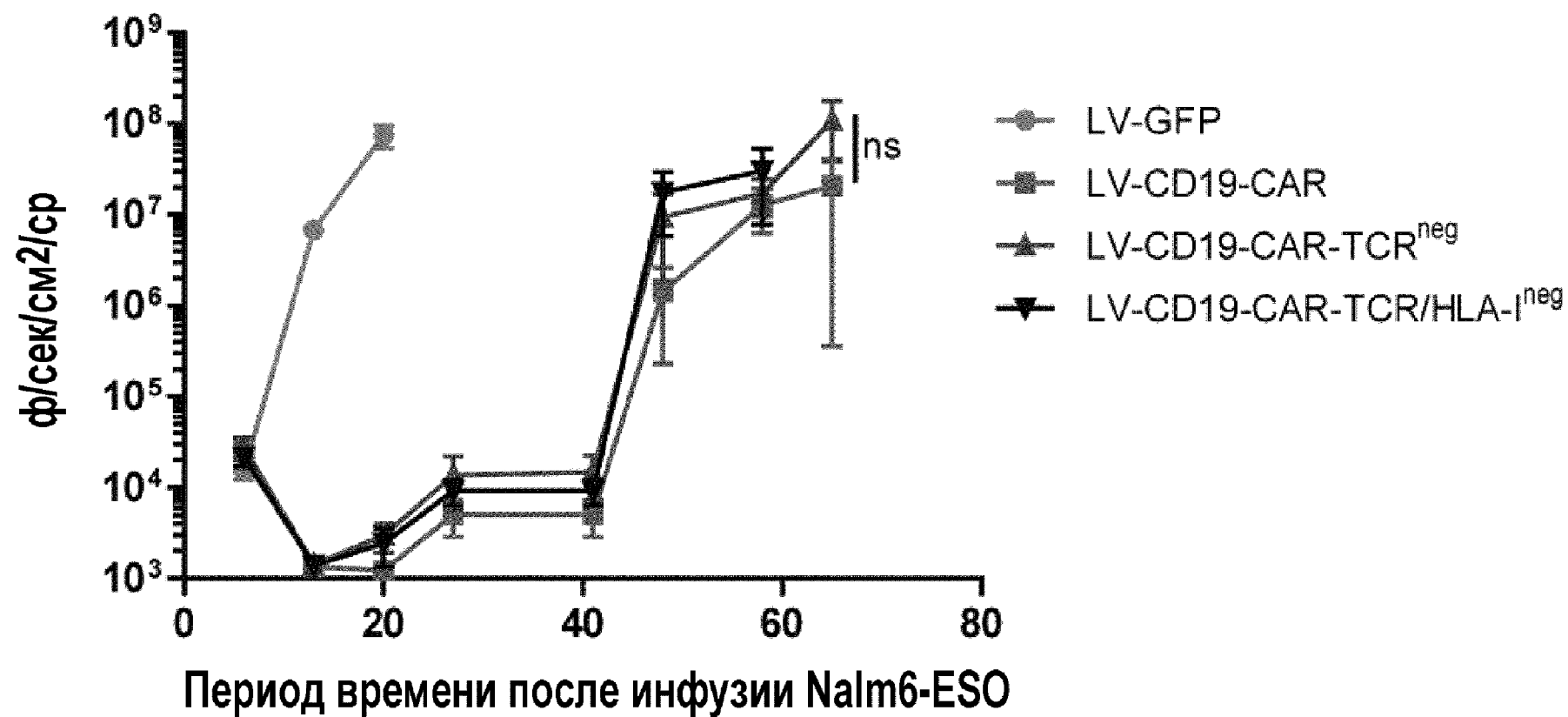


ФИГ.73

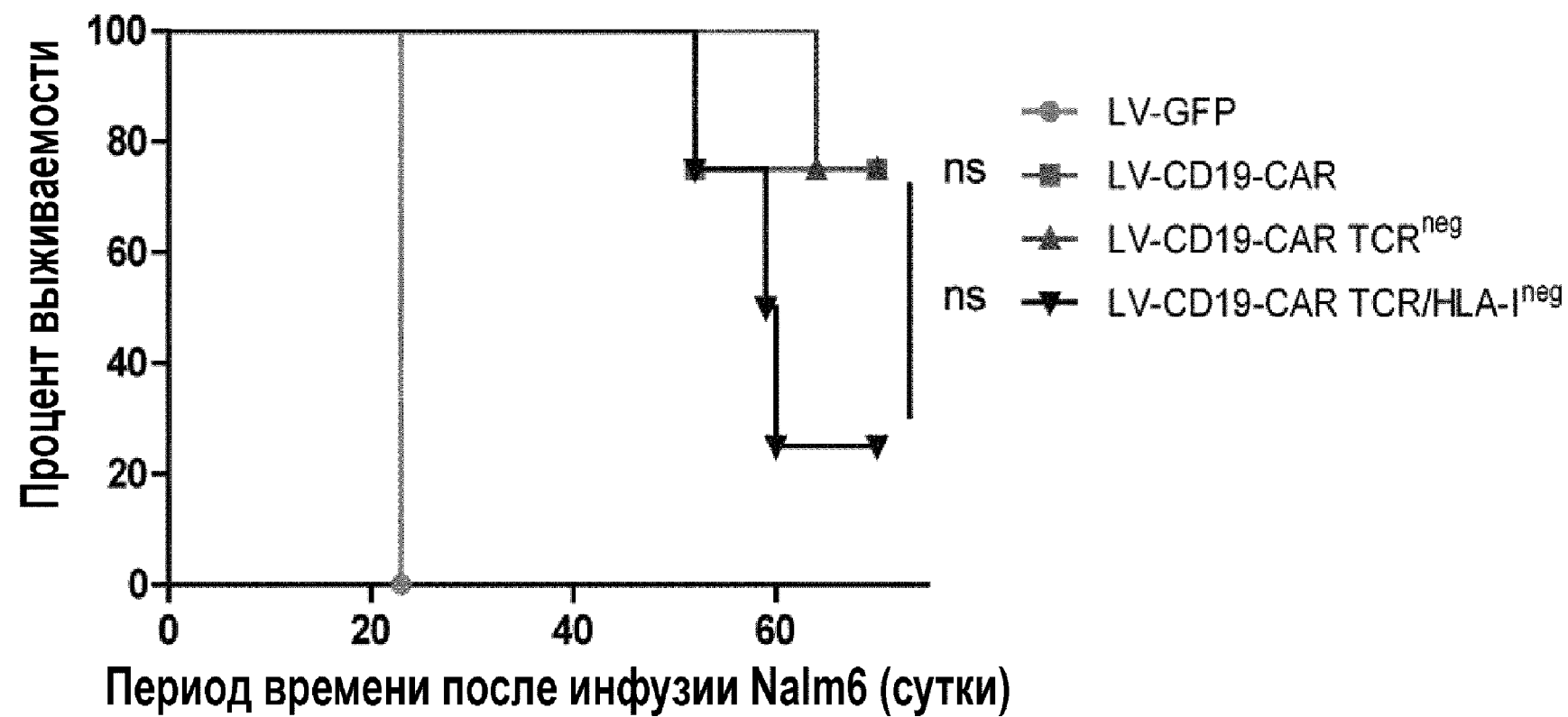


119/142

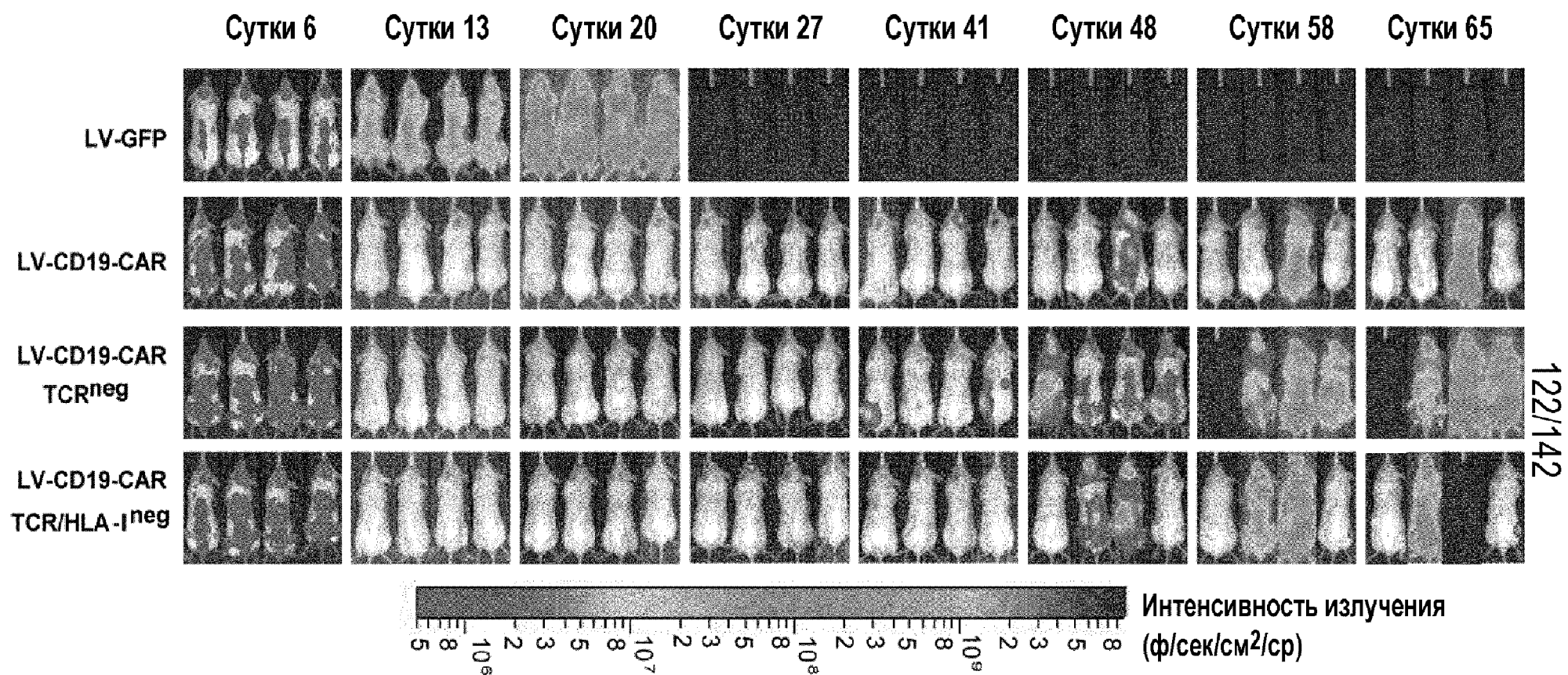
ФИГ.74



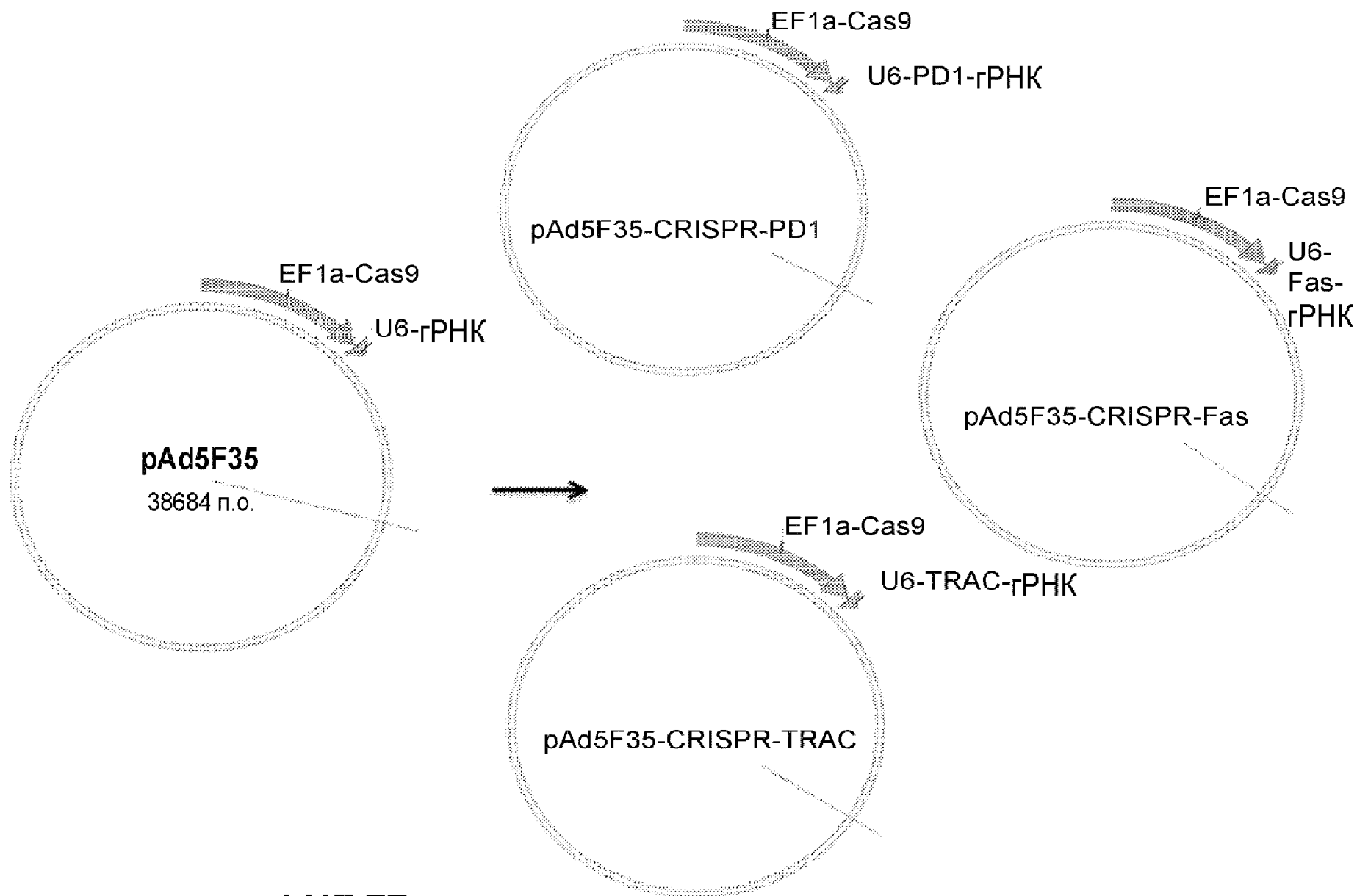
ФИГ.75А

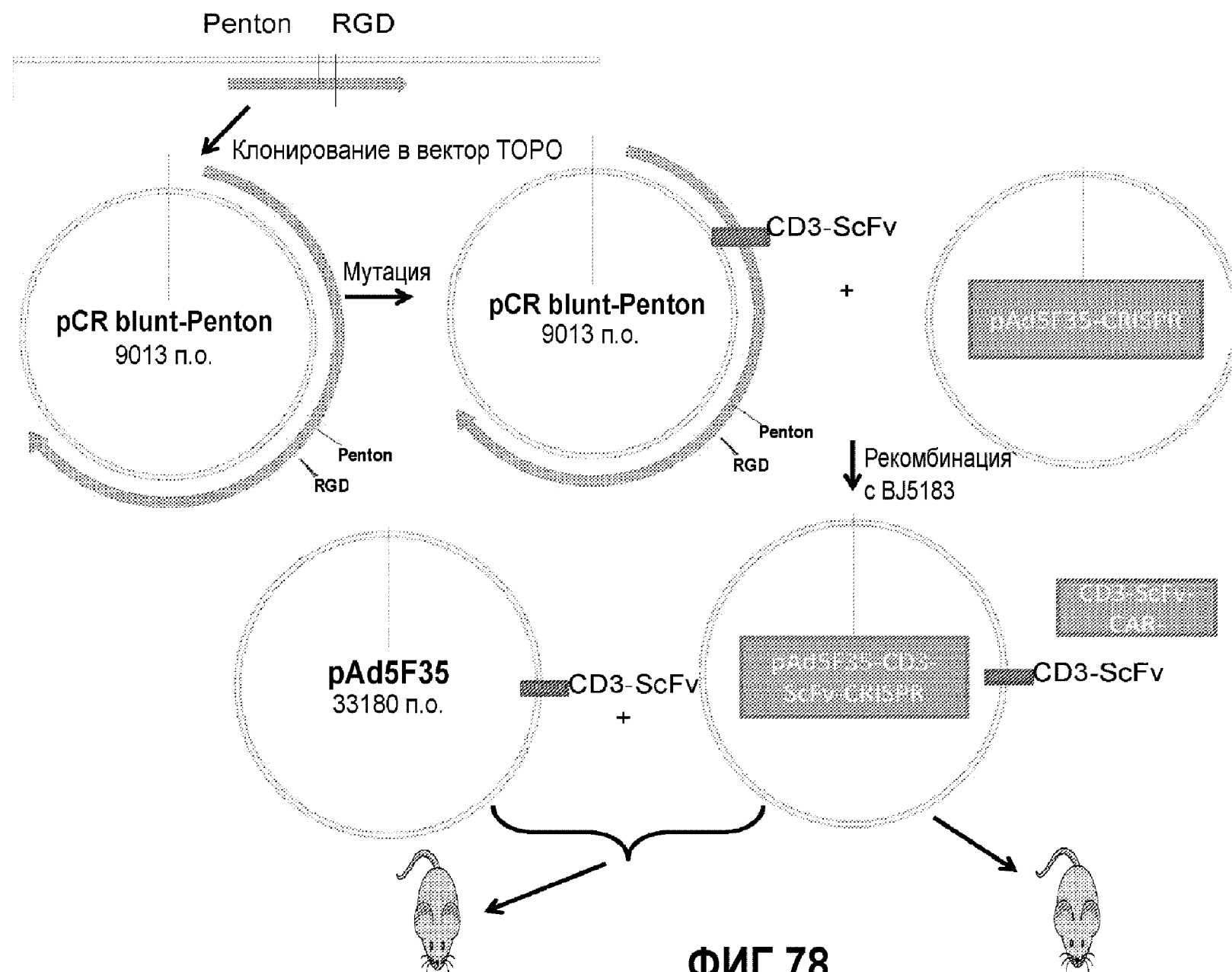


ФИГ.75В



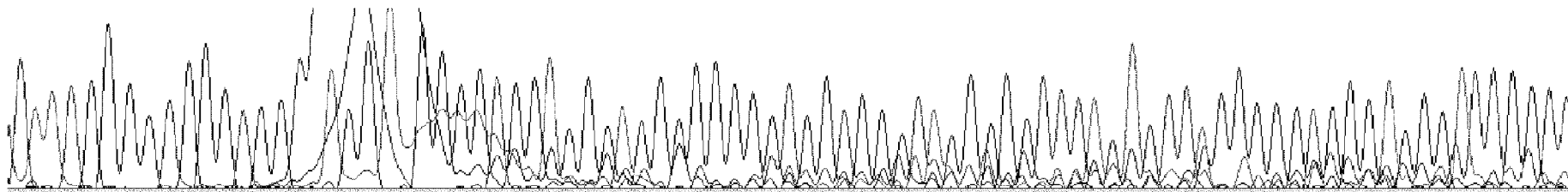
ФИГ.76





ФИГ.78

PD1-rPHK: GGCCAGGATGGTTCTTAGGT



ФИГ.79А

WT: TGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGGTAGGTGGGGT

1: TGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGGTAGGTGGGGT

6: TGGGCTGGCGGCCAGGATGG----TAGGTAGGTGGGGT

7: TGGGCTGGCGGCCAGGATGGTT-TTAGGTAGGTGGGGT

8: TGGGCTGGCGGCCAGGATGG----TAGGTAGGTGGGGT

13: TGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTGGTAGGTAGGTGG

16: TGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGGTAGGTGGGGT

19: TGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGGGGTAGGTGGG

ФИГ.79В

EP #	Условие EP1		Условие EP2		EP1 PHK (мкг)		EP2 PHK (мкг)		Кювета	Объем (мкл)	CD3- %	B2M - %	Кратность разм.
					CAS9	гPHK	гPHK						
1	360 В	1 мс	360 В	1 мс	40	20	10	2 мм	200	81.8	88.6	2.7	
2	360 В	1 мс	360 В	1 мс	40	10	5	2 мм	200	71.6	77.5	4.7	
3	360 В	1 мс	360 В	1 мс	40	2	5	2 мм	200	66.2	59.5	7.3	
4	360 В	1 мс	360 В	1 мс	40	0	10	2 мм	200	76.9	75.4	8.5	
5	360 В	1 мс	360 В	1 мс	20	10	5	2 мм	200	68.2	56.2	5.5	
6	360 В	1 мс	360 В	1 мс	40	20	10	4 мм	200	35.6	17.8	16.8	
7	360 В	1 мс	360 В	1 мс	20	10	5	4 мм	200	15.8	3.8	19.1	
8	360 В	1 мс	360 В	1 мс	80	40	20	4 мм	400	38	33.8	9.7	
9	500 В	500 мкс	500 В	500 мкс	40	20	10	4 мм	200	37.4	17.8	17.2	
10	500 В	1 мс	500 В	500 мкс	20	10	5	4 мм	200	22.8	9.3	18.5	
11	500 В	700 мкс	500 В	500 мкс	20	10	5	4 мм	200	18.3	5	16.7	
12	Нет EP	Только промывка							200	1.8	1.5	18.8	

126/142

ФИГ.80

Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												
Экспериментальная программа												

127/142

ФИГ.81

	Условие EP1		Условие EP2		CAS9	гPHK	CD3-	B2M-	Размножение D7
1	400 В	3 мс	500 В	1 мс	80	20	62.2	84.4	3.2
2	400 В	3 мс	500 В	1 мс	120	20	59.6	76.5	3.7
3	400 В	3 мс	500 В	1 мс	120	30	72.6	85.1	3.4
4	400 В	2 мс	500 В	1 мс	120	20	63.5	84.8	5.2
5	400 В	2 мс	500 В	1 мс	120	30	67.3	86.7	3.6
6	400 В	2 мс	500 В	800 мкс	120	20	54.8	79.3	3.9
7	400 В	2 мс	500 В	800 мкс	120	30	69.7	87.1	3.6
8	500 В	2 мс	500 В	800 мкс	80	20	63.6	85.2	3.3
9	500 В	2 мс	500 В	800 мкс	120	20	64.2	83.0	2.9
10	500 В	2 мс	500 В	800 мкс	120	30	76.5	84.1	2.1
11	500 В	2 мс	500 В	800 мкс	120	30	75.9	87.6	2.0
12	500 В	2 мс	500 В	1 мс	120	30	81.4	89.8	2.0
13	450 В	2 мс	500 В	1 мс	80	20	66.3	88.1	3.1
14	450 В	2 мс	500 В	1 мс	120	20	71.0	88.2	2.7
15	450 В	3 мс	500 В	1 мс	120	20	74.8	88.2	1.8
16	400 В	3 мс	500 В	1 мс	80	20	60.6	72.0	2.2
17	Нет EP						0.5	0.7	9.9



128/142

ФИГ.82

EP#	Условие EP1		Условие EP2		CAS9	гРНК	CD3-	B2m-	Размн. сутки 8
1	400 В	2 мс	500 В	1 мс	120	20	68.8	78.9	7.8
2	400 В	2 мс	500 В	1 мс	120	10	51.5	60.3	9.7
3	500 В	1 мс	500 В	1 мс	120	20	70.6	79	8.3
4	500 В	1 мс	500 В	1 мс	120	10	52.1	62.9	10.1
5	500 В	1 мс	500 В	1 мс	120	5	30.6	31.4	11.4
6	500 В	1 мс	500 В	1 мс	120	1	8.91	5.51	12.4
7	500 В	1 мс	400 В	1 мс	120	20	55.9	67	10.3
8	400 В	2 мс	500 В	800 мкс	120	20	61.6	73.4	8.6
9	400 В	2 мс	500 В	800 мкс	120	10	42.9	49.9	10.4
10	400 В	2 мс	500 В	800 мкс	80	10	41.8	49.3	10.0
11	400 В	2 мс	500 В	1 мс	120	20	59.1	68.1	6.8
12	HET EP						3.73	2.79	17.0

ФИГ.83

ФИГ.84

Сутки 0	Стимуляция гранулами CD3/CD28	1. Подсчет/вычисление Т-клеток, промывание гранул CD3/CD28, смешанных с Т-клетками в Т:гранулы=1:3 2. Доведение до 0.5e6-1e6/мл ММ, 100 мл/флакон в Т150
Сутки 1	Трансдукция лентивирусом CD19 CAR	1. Оттаивание hCD19 LVV, добавление к Т-клеткам при MOI2
Сутки 3	Удаление гранул	1. После удаления гранул центрифугирование и промывание клеток OPTI-MEM 2 раза 2. Ресуспендирование клеток в OPTI-MEM при 50e6/мл 3. Электропорация BTX830 при 500 В, 1 мс, 120 мкг Cas9/400 мкл Т-клеток 4. После ЕР добавление Т-клетки в исходный объем культуры половины свежей и половины кондиционированной среды
Сутки 3	ЕР РНК Cas9	
Сутки 4	ЕР гРНК TRBC и B2m	1. Центрифугирование и промывание клеток OPTI-MEM 2 раза 2. Ресуспендирование клеток в OPTI-MEM при 50e6/мл 3. Электропорация BTX830 при 500 В и 1 мс, 20 мкг TRBC4 и B2M гРНК/400 мкл Т-клеток 4. После ЕР добавление Т-клетки в исходный объем культуры половины свежей и половины кондиционированной среды
Сутки 8	Истощение CD3- положительных Т-клеток	1. Сбор клеток, центрифугирование и последующая CD3-отрицательная селекция с использованием колонки LD 2. Ресуспендированные CD3-отрицательные CD3-клетки в ММ при 0.5-1e6/мл, 100 мл/Т150 для дальнейшего размножения Т-клеток
Сутки 10	Сбор Т-клеток	1. Сбор клеток, разделение на аликвоты и заморозка Т-клеток

130/142

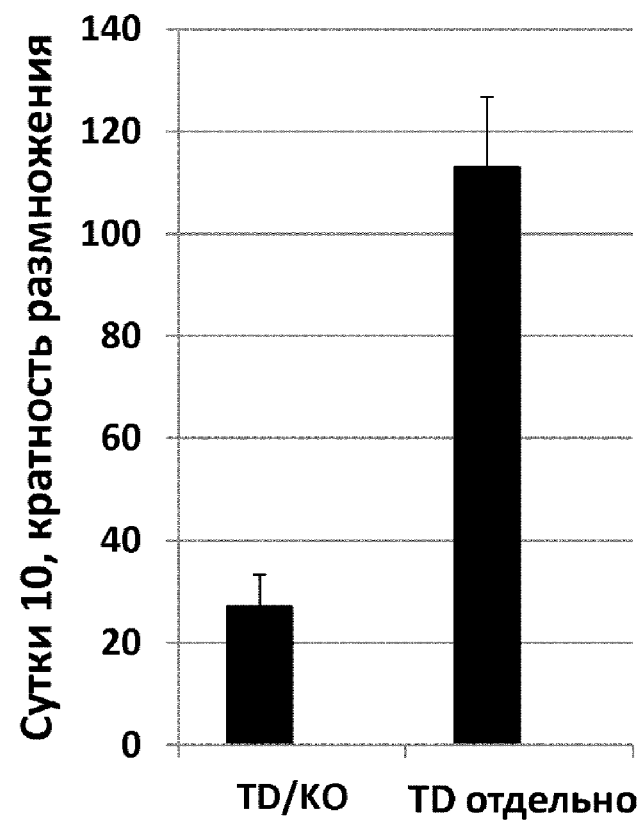
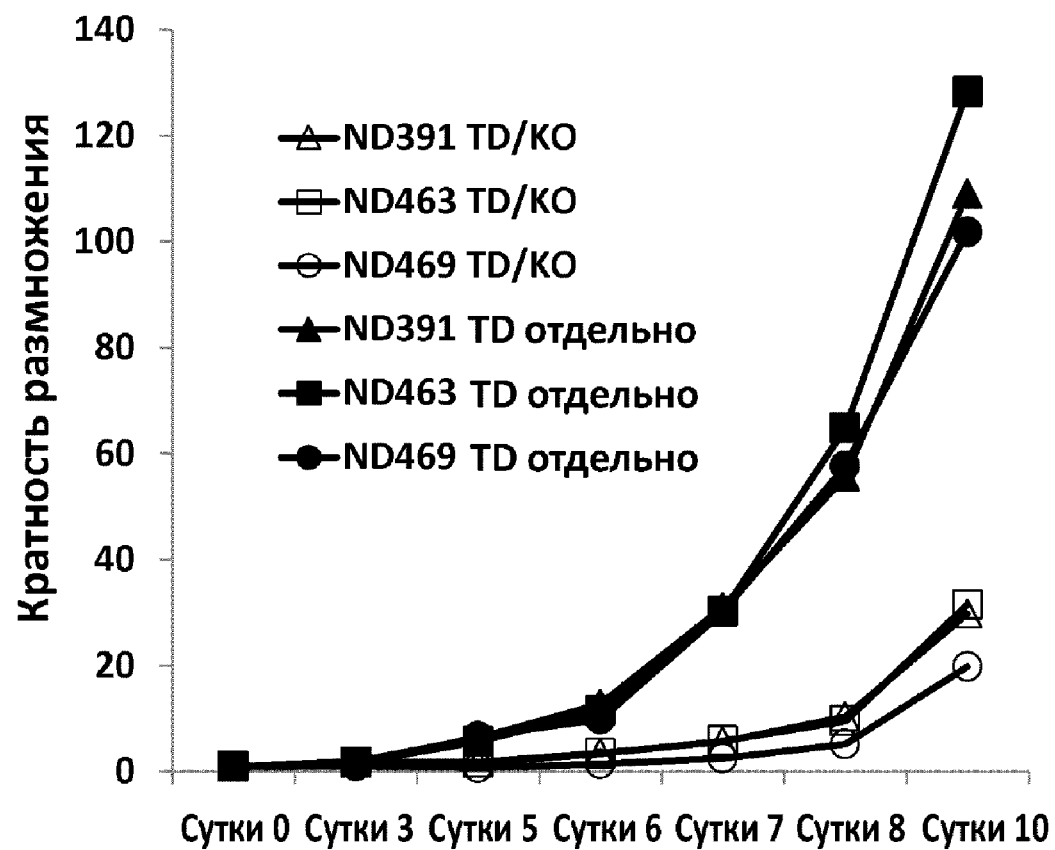
Клетка#									
Группа#	Донор	Т-клетки	Сутки 0	Сутки 3	Сутки 5	Сутки 6	Сутки 7	Сутки 8	Сутки 10
1	ND391	CART/MOCK EP	10.0	19.8	63.4	127.9	310.2	556.8	1090.8
2	ND391	CART/CRISPR	100.0	178.2	175.4	350.4	571.6	1036.8	2985.6
3	ND463	CART/MOCK EP	10.0	17.1	57.0	115.1	301.9	648.6	1282.5
4	ND463	CART/CRISPR	90.0	153.5	150.8	309.6	522.8	861.6	2839.2
5	ND463	HEМОДИФ.	30.0	43.5	173.8	305.2	733.2	1503.2	2935.2
6	ND469	CART/MOCK EP	10.0	12.0	66.6	99.3	301.9	577.2	1017.9
7	ND469	CART/CRISPR	60.0	108.2	74.1	147.0	252.0	521.6	1190.4

Кратность размножения

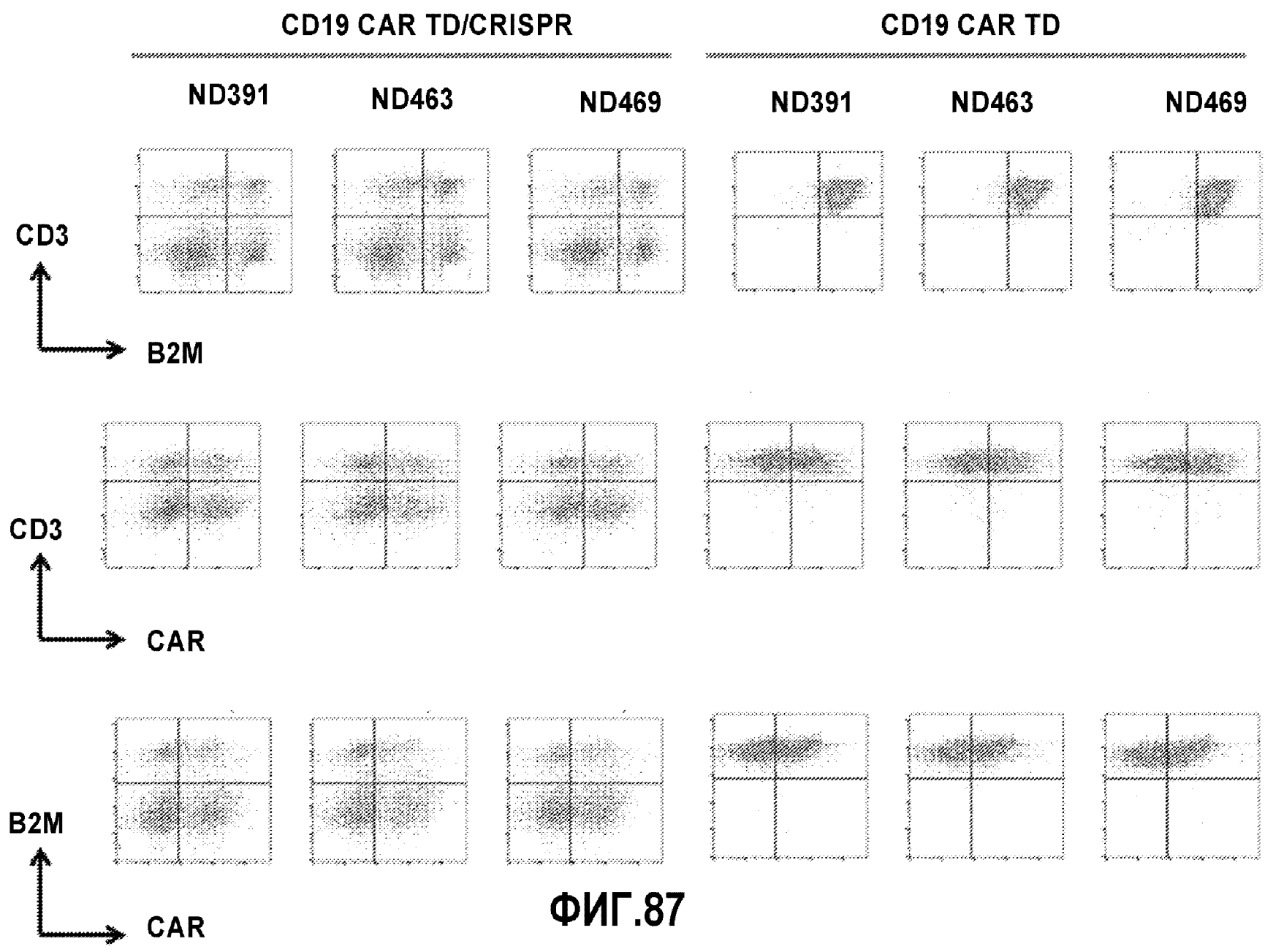
Группа#	Донор	Т-клетки	Сутки 0	Сутки 3	Сутки 5	Сутки 6	Сутки 7	Сутки 8	Сутки 10
1	ND391	ND391 CART/MOCK EP	1	2	6	13	31	56	109
2	ND391	ND391CART/CRISPR	1	2	2	4	6	10	30
3	ND463	ND463 CART/MOCK EP	1	2	6	12	30	65	128
4	ND463	ND463 CART/CRISPR	1	2	2	3	6	10	32
5	ND463	ND463 HEМОДИФ.	1	1	6	10	24	50	98
6	ND469	ND469 CART/MOCK EP	1	1	7	10	30	58	102
7	ND469	ND469 CART/CRISPR	1	2	1	2	4	9	20

131/142

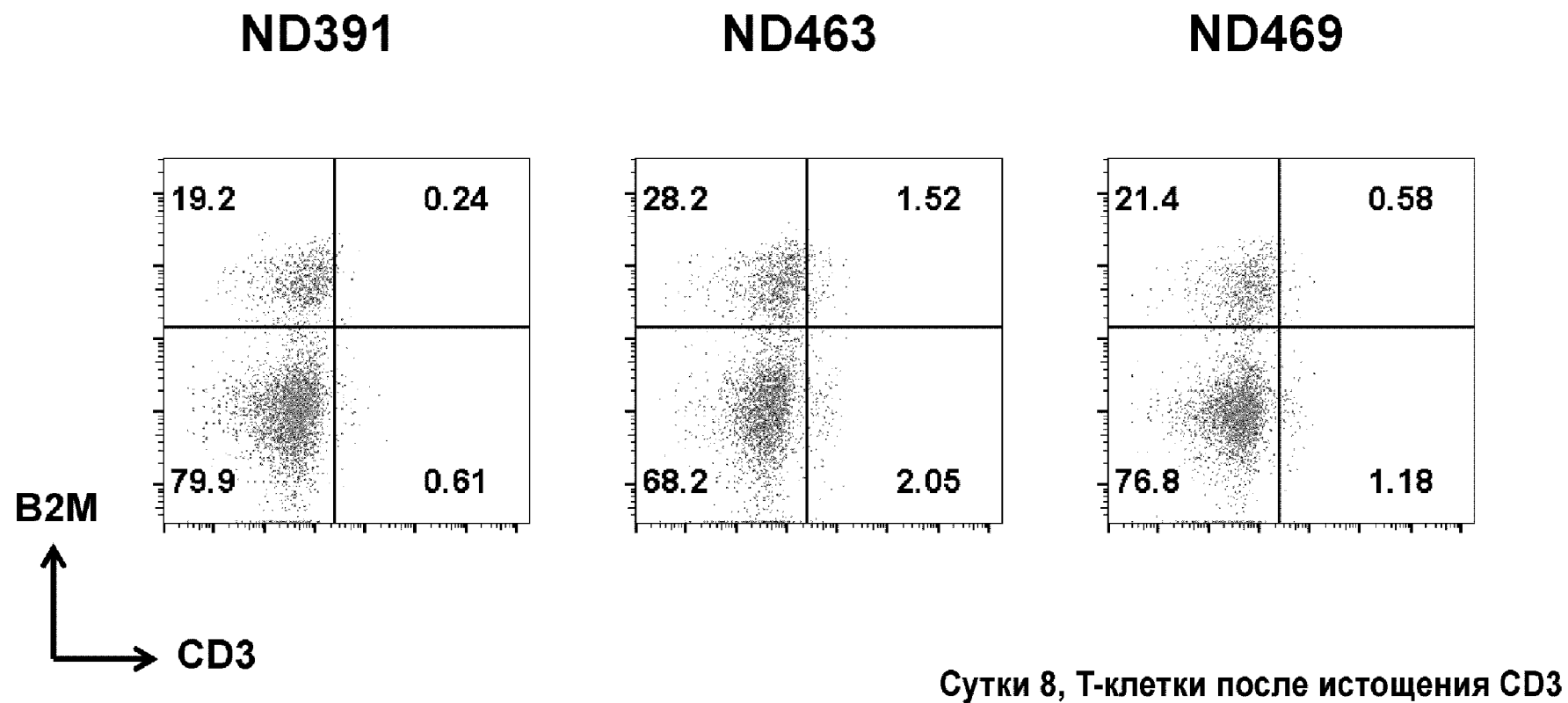
ФИГ.85



ФИГ.86

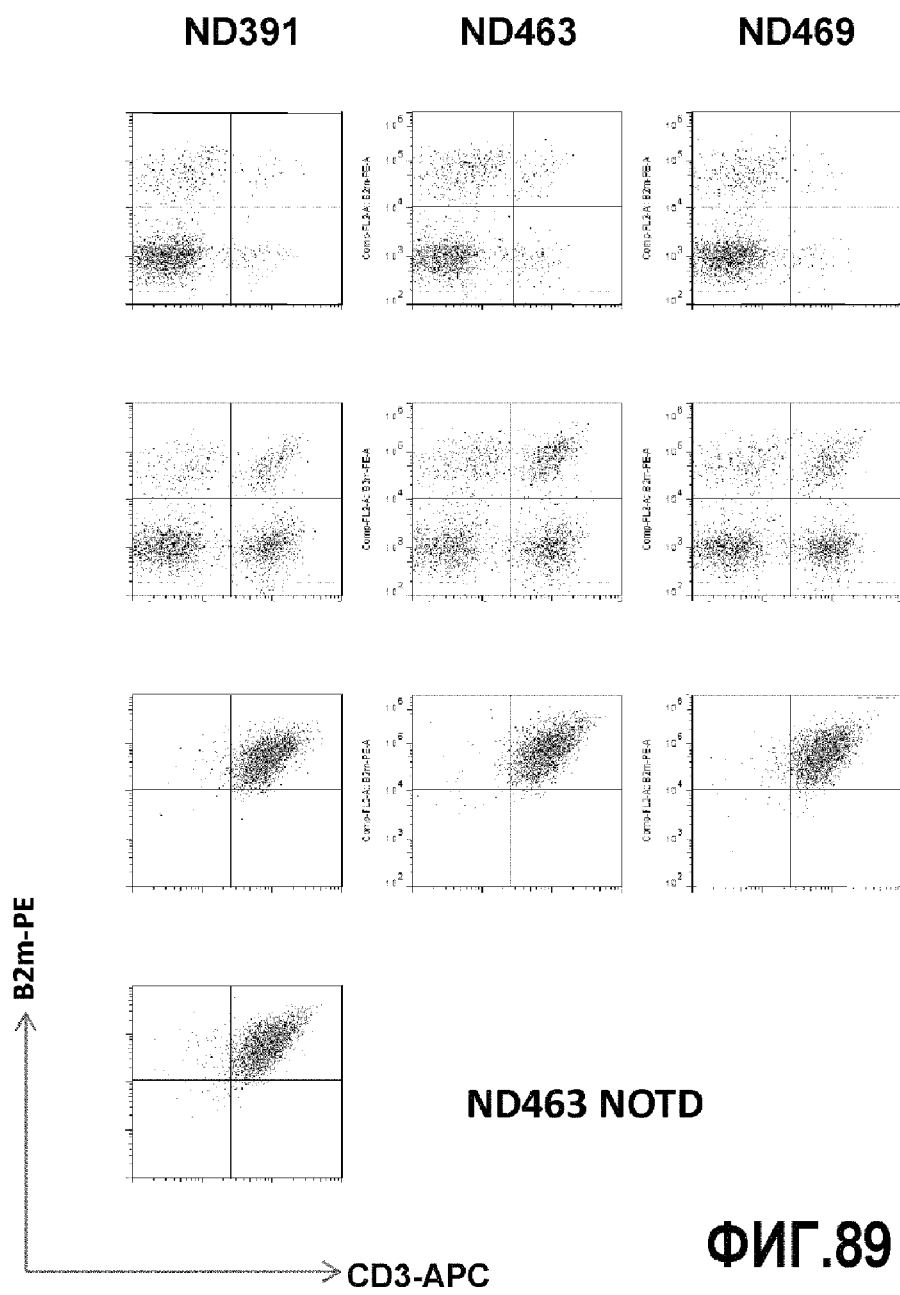


ФИГ.87



134/142

ФИГ.88

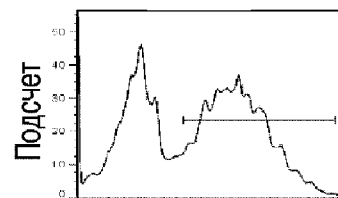
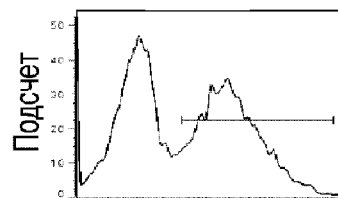
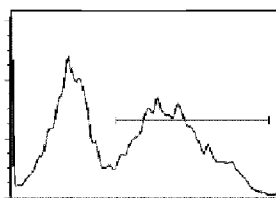


ФИГ.89

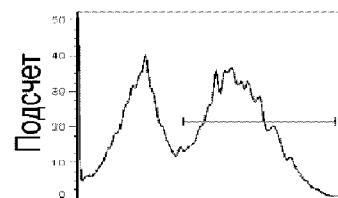
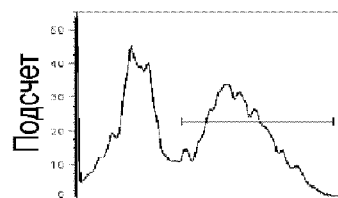
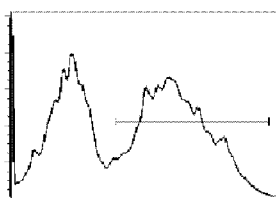
ND391

ND463

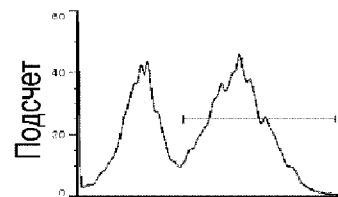
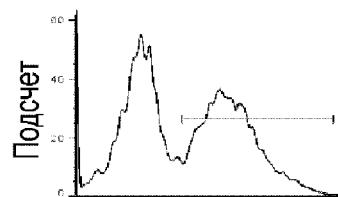
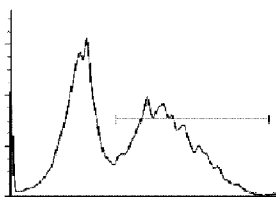
ND469



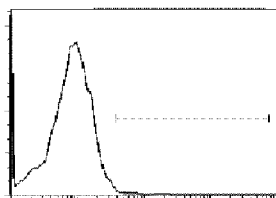
CD19 CAR TD/CRISPR,
истощенные по CD3



CD19 CAR TD/CRISPR



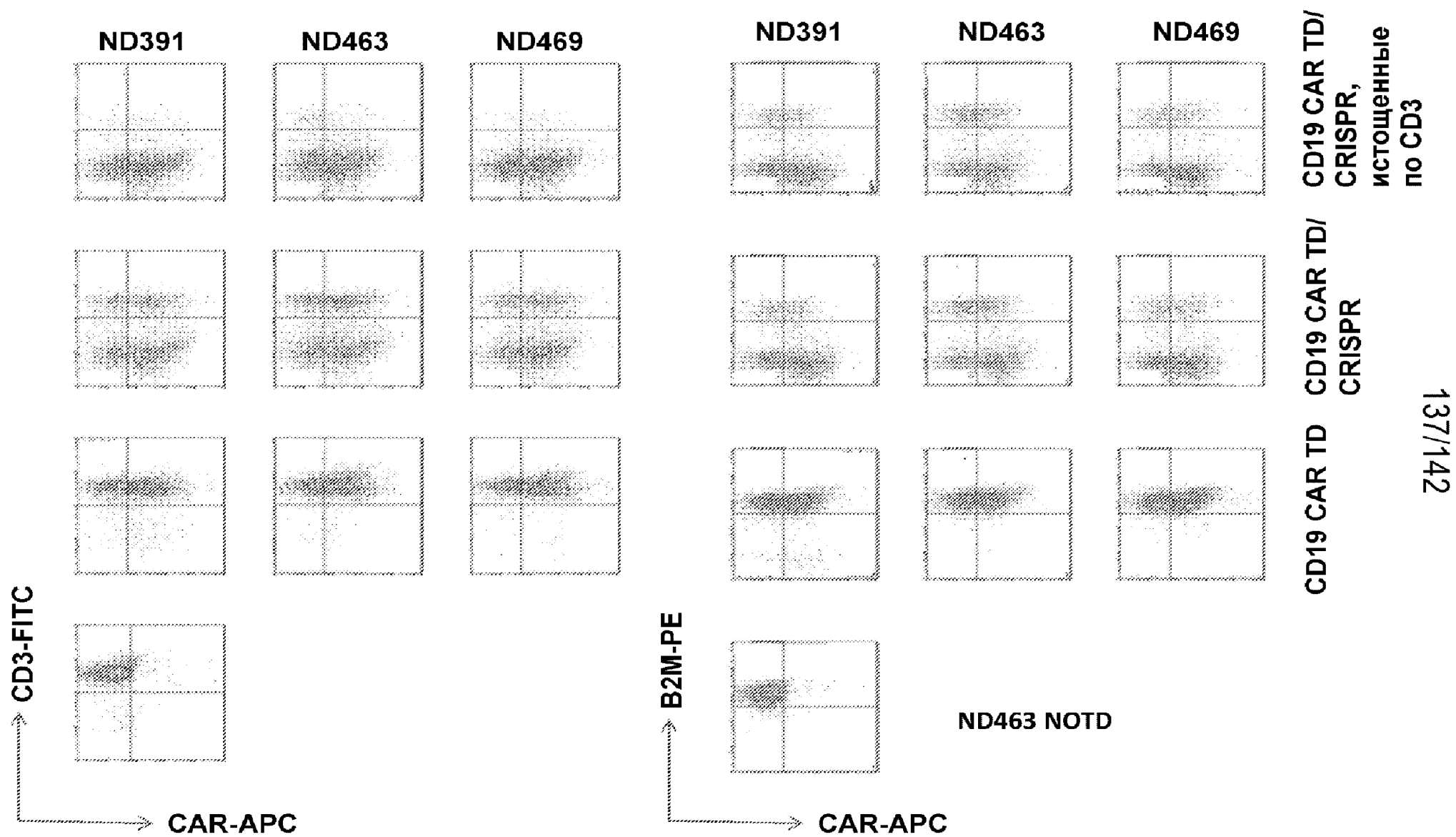
CD19 CAR TD



ND463 NOTD

→ CAR-
PE

ФИГ.90

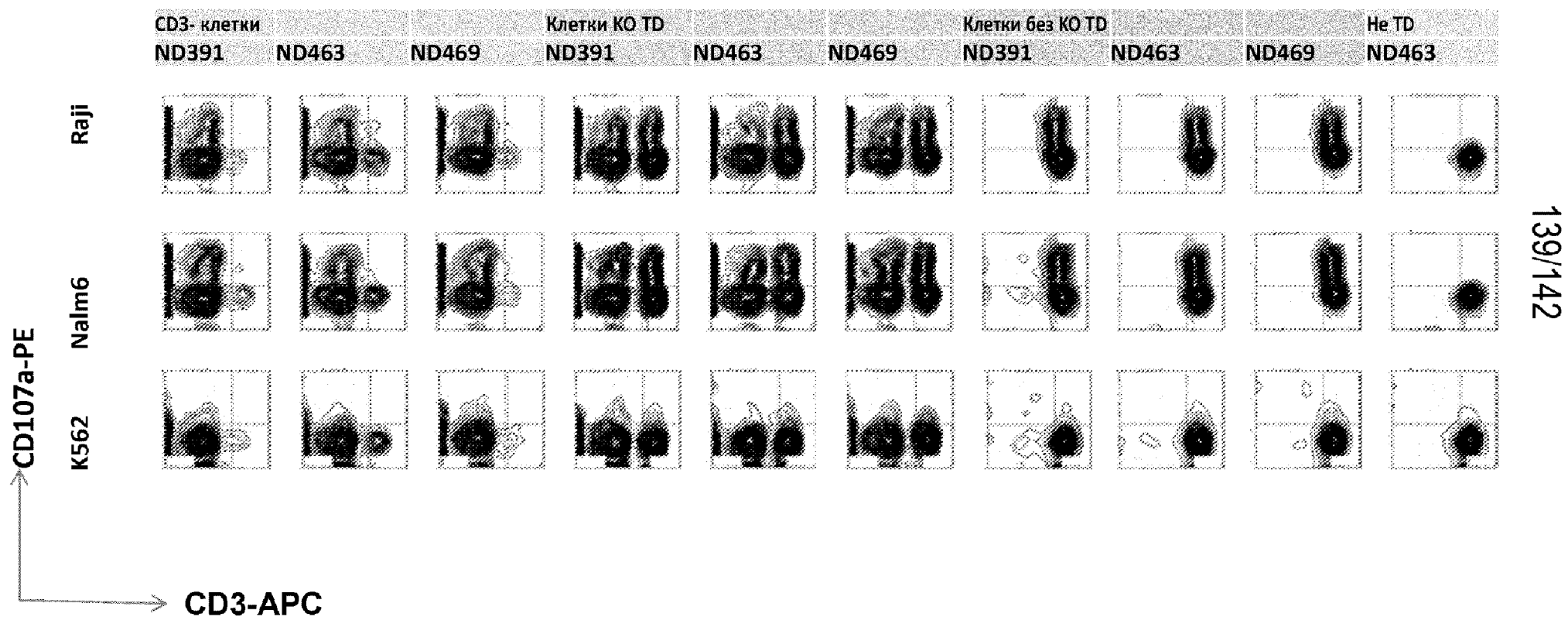


ФИГ.91

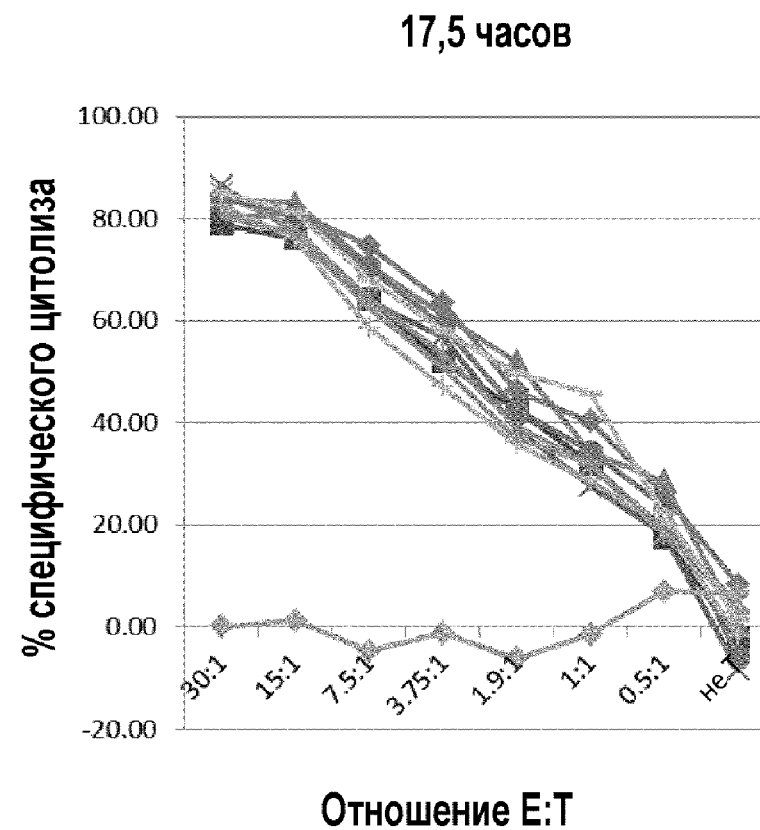
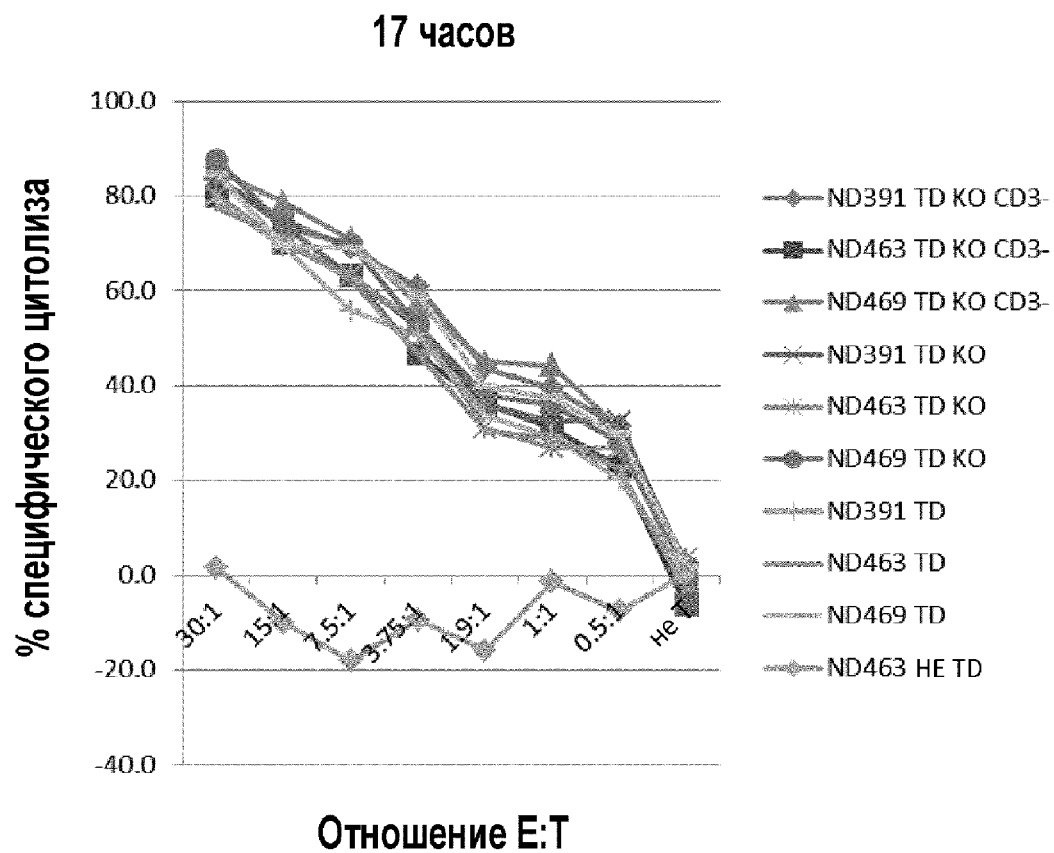
Идентификатор донора клеток	%CAR19+	%CAR19+ CD3- B2M-	% CAR19+ CD3- B2M+	%CAR19 +CD3+ B2M-	%CAR19 +CD3+ B2M+
ND391	51.4	85.2	12.8	1.6	0.4
ND463	48.5	73.4	22.9	1.8	1.9
ND469	55.8	82.1	16.5	0.8	0.6

138/142

ФИГ.92

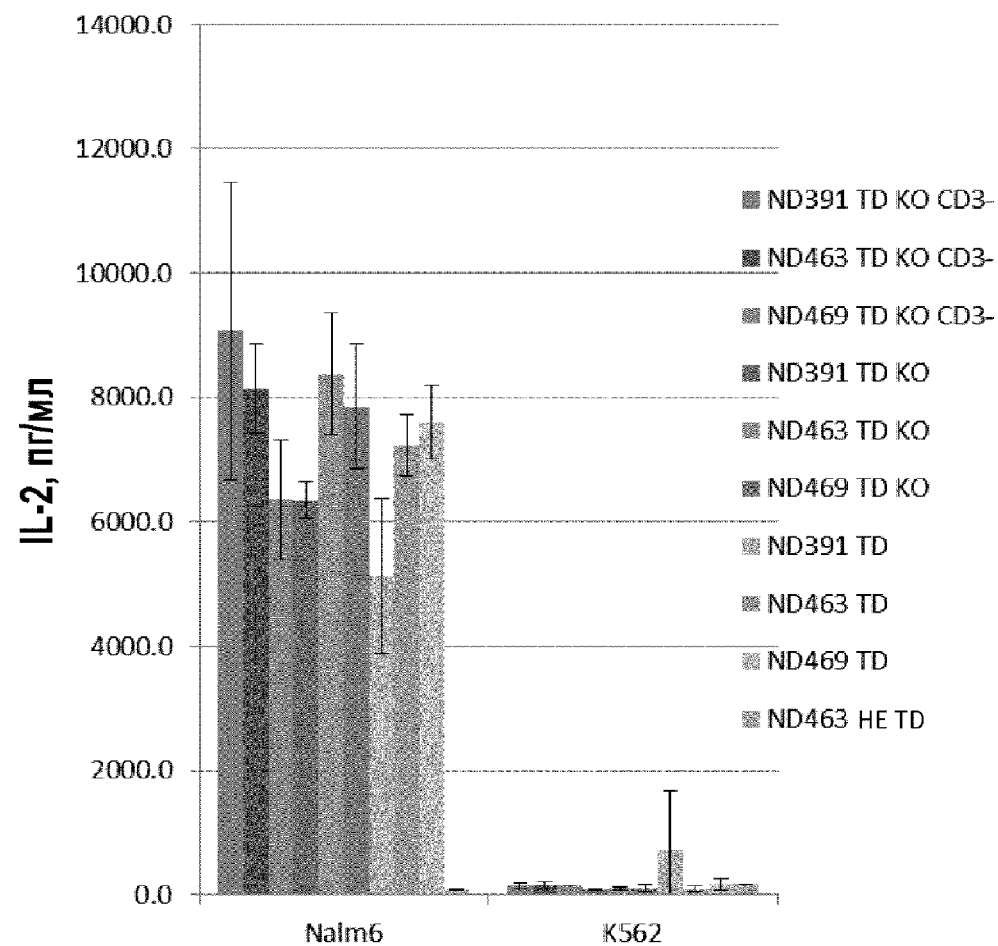
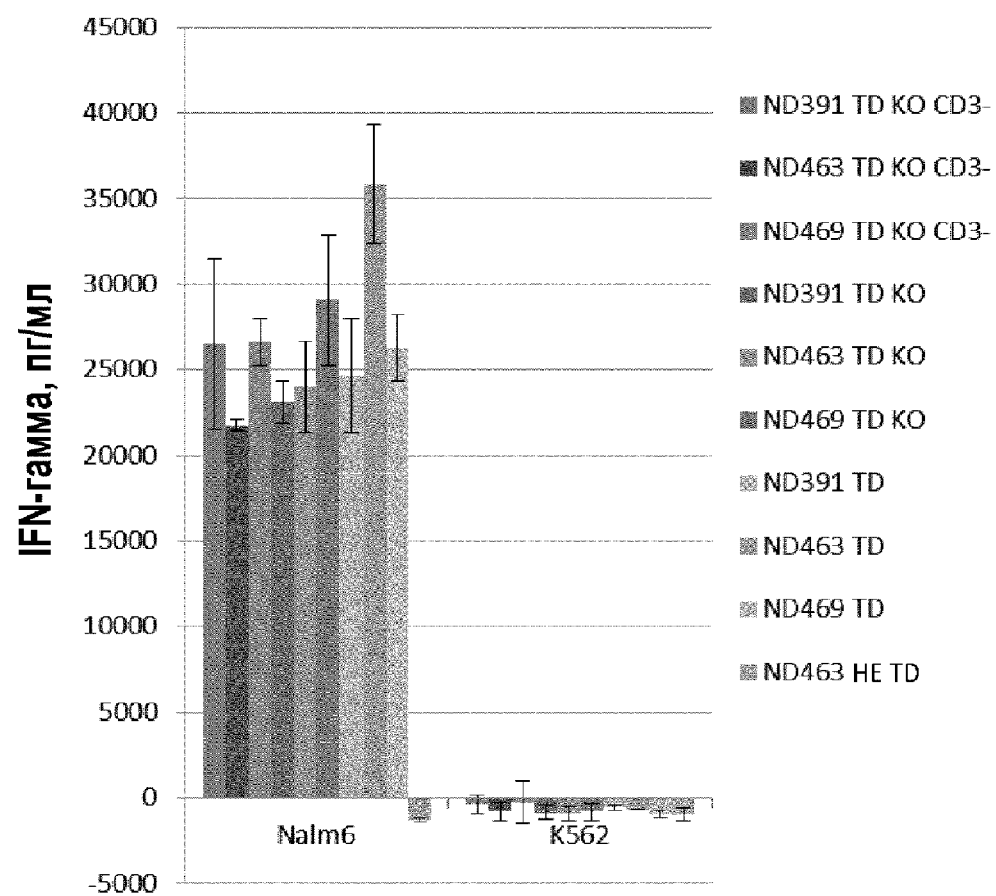


ФИГ.93



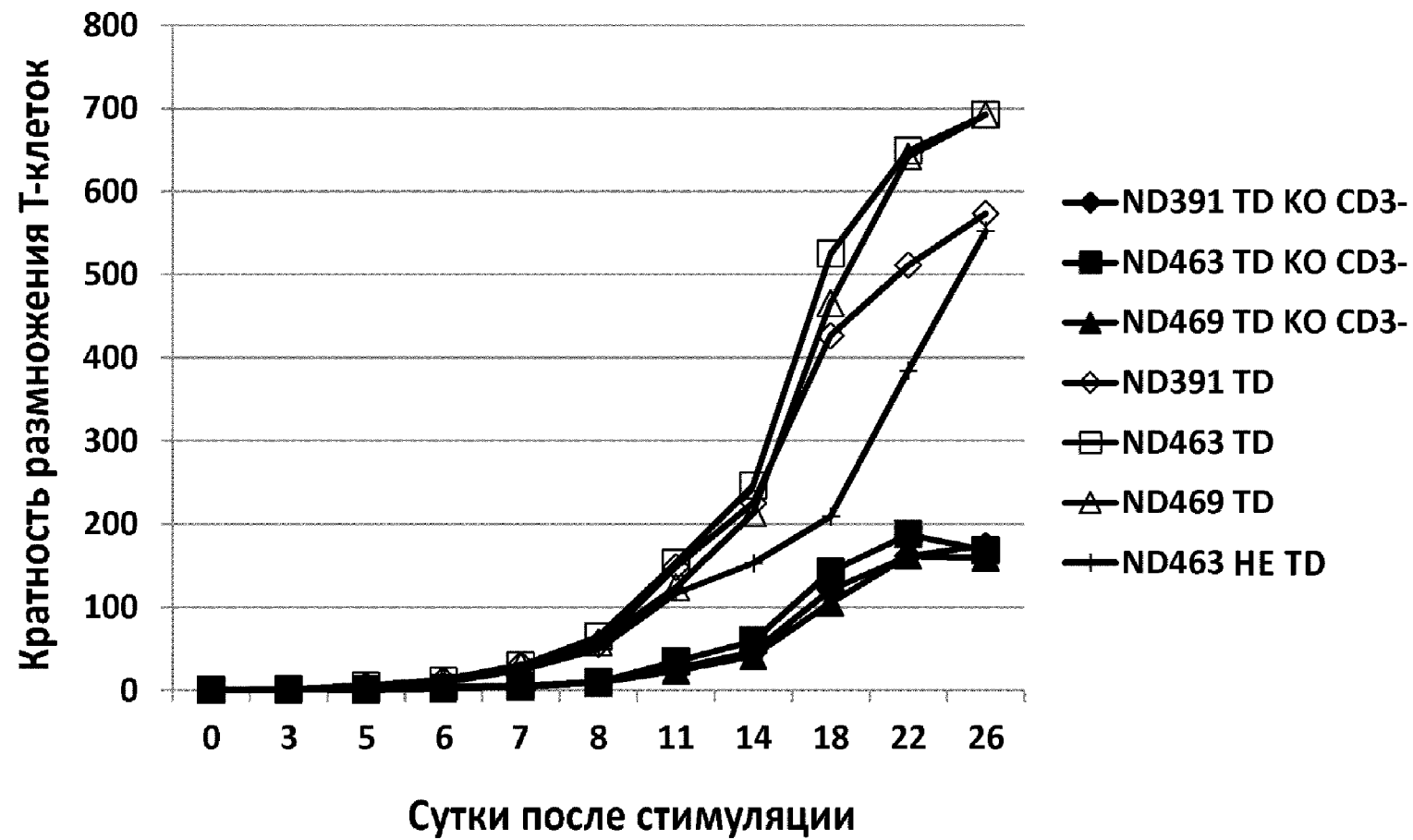
140/142

ФИГ.94



141/142

ФИГ.95



ФИГ.96

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 46483-7100WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2015/055799	International filing date (<i>day/month/year</i>) 15 October 2015	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 31 October 2014
Applicant THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1A
☐ as suggested by the applicant.
☒ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/055799

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/055799

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 35/17 (2015.01)

CPC - A61K 35/17 (2015.12)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8) - A61K 35/17, C12N 5/071, 5/0783, 5/10, 15/63, 15/85 (2015.01)

CPC - A61K 35/17, 39/0011, 2039/5156 ; C07K 16/32 ; C12N 5/0636, 15/63, 15/85, 2501/515, 2510/00 (2015.12)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CPC - A61K 35/17, 39/0011, 2039/5156 ; C07K 16/32 ; C12N 5/0636, 15/63, 15/85, 2501/515, 2510/00 (2015.12) (keyword delimited)

USPC - 424/93.71 ; 435/325, 372.3, 375, 455, 462

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Orbit, Google Patents, Google Scholar.

Search terms used: chimeric, antigen, receptor, t-cell, CAR, CART, expanding, IL-1, IL-3, Flt3, Oct4, Klf4, Sox2, c-kit, CRISPR, Cas9, Ad5/F35, expressed, nonfunctional, downregulated, repression, suppression, deficient

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/074916 A1 (UNIVERSITY OF TEXAS) 23 May 2013 (23.05.2013) entire document	1, 2, 4-12, 14-18, 20-24, 26-38
--		-----
Y		3, 13, 19, 25
Y	WO 2014/153470 A2 (SANGAMO BIOSCIENCES INC) 25 September 2014 (25.09.2014) entire document	3, 13
Y	WO 2014/165707 A2 (SLOAN KETTERING INST CANCER) 09 October 2014 (09.10.2014) entire document	19, 25
A	US 6,143,291 A (JUNE et al) 07 November 2000 (07.11.2000) entire document	1-38
A	WO 2013/126712 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 29 August 2013 (29.08.2013) entire document	1-38

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 December 2015

Date of mailing of the international search report

02 MAR 2016

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Blaine Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774