

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202291448** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2022.08.04**

(51) Int. Cl. **C12N 5/0783** (2010.01)  
**C07K 14/725** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2020.11.13**

(54) **ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ПРОЦЕСС ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ Т-КЛЕТОК,  
ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ**

(31) **62/934,991**

(72) Изобретатель:  
**Юй Хой, Калаицидис Деметриос,  
Тань Сьюань (US)**

(32) **2019.11.13**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2020/060723**

(87) **WO 2021/095013 2021.05.20**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(71) Заявитель:

**КРИСПР ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)**

(57) Аспекты настоящего изобретения относятся к способам получения генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), которые обеспечивают несколько улучшений по сравнению со стандартными способами получения, за счет чего предоставляется возможность получения стабильного запаса клинически применимых видов терапии на основе CAR-Т-клеток.



**A1**

**202291448**

**202291448**

**A1**

**ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ПРОЦЕСС ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ Т-КЛЕТОК,  
ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ  
ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета согласно предварительной заявке на патент США №62/934991, поданной 13 ноября 2019 года, которая настоящим включена посредством ссылки во всей своей полноте.

**ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Терапия на основе Т-клеток с химерными антигенными рецепторами (CAR) показала перспективные терапевтические эффекты в лечении гемобластоза. Как правило, CAR-Т-клетки получают путем генной инженерии либо из иммунных клеток пациента (аутологичных), либо из иммунных клеток неродственных доноров-людей (аллогенных). Получение высококачественных CAR-Т-клеток, подходящих для клинического применения, является необходимым условием для широкого применения данной технологии. Таким образом, значительный интерес представляет разработка эффективных производственных процессов для серийного получения CAR-Т-клеток.

**СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на разработке способов получения генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), которые обеспечивают несколько улучшений по сравнению со стандартными способами получения. Такие улучшения включают без ограничения улучшения согласованности и эффективности генетических модификаций, описанных в данном документе, что обеспечивает получение стабильного запаса клинически применимых видов терапии на основе CAR-Т-клеток.

Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения представлен способ получения генетически сконструированных Т-клеток, при этом способ предусматривает: (i) обеспечение первой популяции Т-клеток; (ii) инкубирование первой популяции Т-клеток в присутствии средства, активирующего Т-клетки, в сосуде для культивирования клеток с получением второй популяции Т-клеток, где вторая популяция Т-клеток содержит активированные Т-клетки; (iii) введение в активированные Т-клетки первого рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса, содержащего первый фермент Cas9 и первую направляющую РНК (gRNA), нацеливающуюся на ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC), и второго RNP-комплекса, содержащего второй фермент Cas9 и вторую gRNA, нацеливающуюся на ген  $\beta 2M$ , с получением третьей популяции Т-клеток, где третья популяция Т-клеток содержит Т-клетки, имеющие нарушенный ген TRAC и нарушенный ген  $\beta 2M$ ; (iv) инкубирование третьей популяции Т-клеток с вектором на основе аденоассоциированного вируса (AAV) с получением четвертой популяции Т-клеток, где четвертая популяция Т-клеток содержит Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), где вектор на основе AAV содержит

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, и где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, фланкирована последовательностями, гомологичными локусу гена TRAC, на который нацелена первая gRNA; (v) размножение четвертой популяции Т-клеток; (vi) удаление  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  Т-клеток из размноженных Т-клеток с получением популяции генетически сконструированных Т-клеток, где популяция генетически сконструированных Т-клеток содержит Т-клетки, экспрессирующие CAR и имеющие нарушенный ген TRAC и ген  $\beta 2M$ ; и (vii) сбор популяции генетически сконструированных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления первая популяция Т-клеток получена из криоконсервированных Т-клеток, обогащенных из клеток крови человека. В некоторых вариантах осуществления первую популяцию Т-клеток подготавливают посредством способа, предусматривающего: (a) получение клеток крови от донора-человека и (b) обогащение  $\text{CD4}^+$  Т-клеток и  $\text{CD8}^+$  Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления (b) осуществляют с применением магнитных гранул, конъюгированных с антителом к CD4 и/или антителом к CD8. В некоторых вариантах осуществления первая популяция Т-клеток характеризуется жизнеспособностью клеток, составляющей по меньшей мере 80%, и/или чистотой, составляющей по меньшей мере 80%  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$  Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно предусматривают (c) криоконсервацию обогащенных  $\text{CD4}^+$  Т-клеток и  $\text{CD8}^+$  Т-клеток, полученных на стадии (b).

В некоторых вариантах осуществления средство, активирующее Т-клетки, содержит агонист CD3 и агонист CD28, прикрепленные к частице наноматрицы. В некоторых вариантах осуществления стадию (ii) осуществляют путем смешивания первой популяции Т-клеток со средством, активирующим Т-клетки, в сосуде для культивирования клеток при плотности высевания клеток, составляющей приблизительно  $2 \times 10^6/\text{см}^2$ , и концентрации клеток, составляющей приблизительно  $2 \times 10^6$  клеток/мл; и инкубирования полученной таким образом смеси в течение приблизительно 48 часов. В некоторых вариантах осуществления отношение средства, активирующего Т-клетки, к среде в смеси составляет приблизительно 1:12,5 (об./об.).

В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в данном документе, может дополнительно предусматривать разбавление средства, активирующего Т-клетки, во второй популяции Т-клеток после стадии (ii) для снижения активации и для обеспечения восстановления клеток перед стадией (iii).

В некоторых вариантах осуществления стадию (iii) осуществляют путем электропорации. В некоторых вариантах осуществления на стадии (iii) предусмотрено одно событие электропорации. В некоторых вариантах осуществления первый RNP-комплекс и второй RNP-комплекс вводят в активированные Т-клетки в ходе одного события электропорации. В некоторых вариантах осуществления количество первого фермента Cas9 в первом RNP-комплексе является таким же, как количество второго фермента Cas9 во втором RNP-комплексе. В некоторых вариантах осуществления концентрация первого фермента Cas9 составляет приблизительно 0,15 мг/мл,

концентрация второго фермента Cas9 составляет приблизительно 0,15 мг/мл, концентрация первой gRNA, нацеливающейся на ген TRAC, составляет приблизительно 0,08 мг/мл, и концентрация второй gRNA, нацеливающейся на ген  $\beta 2M$ , составляет приблизительно 0,2 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация клеток на стадии (iii) составляет от приблизительно  $100 \times 10^6$  клеток/мл до приблизительно  $400 \times 10^6$  клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация клеток на стадии (iii) составляет приблизительно  $300 \times 10^6$  клеток/мл. В других вариантах осуществления общее число клеток в каждом сосуде, применяемом на стадии (iii) (например, электропорации), может составлять от приблизительно  $5 \times 10^8$  до приблизительно  $1 \times 10^9$  клеток, например приблизительно  $7 \times 10^8$  клеток. В некоторых примерах на стадии (iii) (например, электропорации) можно применять несколько сосудов, например приблизительно 5-10 сосудов. В конкретных примерах на стадии (iii) можно применять до 7 сосудов, которые могут содержать от приблизительно  $1,5 \times 10^9$  до приблизительно  $3 \times 10^9$  клеток (например, приблизительно  $2,1 \times 10^9$  клеток или приблизительно  $2,7 \times 10^9$  клеток), например, для электропорации.

В некоторых вариантах осуществления вектор на основе AAV характеризуется значением множественности заражения (MOI), составляющим от приблизительно 10000 до приблизительно 80000. В некоторых вариантах осуществления MOI вектора на основе AAV составляет приблизительно 20000. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе AAV представляет собой вектор на основе AAV серотипа 6 (AAV6).

В некоторых вариантах осуществления стадию (v) осуществляют путем высевания четвертой популяции Т-клеток в сосуд для культивирования клеток при плотности высевания, составляющей от приблизительно  $2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно  $7 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, и культивирования клеток в течение от приблизительно 6 дней до приблизительно 12 дней. В некоторых вариантах осуществления четвертую популяцию Т-клеток можно высевать в сосуд для культивирования клеток при плотности высевания, составляющей от приблизительно 150000 клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно 600000 клеток/см<sup>2</sup>. В некоторых вариантах осуществления стадию (v) осуществляют путем культивирования четвертой популяции Т-клеток в сосуде для культивирования клеток при плотности высевания, составляющей от приблизительно  $2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, в течение от приблизительно 7 дней до приблизительно 9 дней. В некоторых вариантах осуществления стадию (v) осуществляют путем высевания четвертой популяции Т-клеток в сосуд для культивирования клеток при плотности высевания, составляющей от приблизительно  $3 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>. В некоторых вариантах осуществления сосуд для культивирования клеток представляет собой сосуд для статического культивирования клеток (также взаимозаменяемо называемый в данном документе сосудом для статического культивирования), обеспечивающий размножение клеток в течение от приблизительно 10 дней до приблизительно 12 дней без замены среды. В некоторых вариантах осуществления сосуд для культивирования клеток представляет собой сосуд

для статического культивирования клеток, обеспечивающий размножение клеток в течение от приблизительно 7 дней до приблизительно 9 дней без замены среды.

В некоторых вариантах осуществления стадию (vi) осуществляют путем приведения размноженных клеток в контакт с гранулами, на которых иммобилизованы антитела к TCR $\alpha\beta$ , и сбора несвязавшихся клеток.

В некоторых вариантах осуществления первый фермент Cas9, второй фермент Cas9 или оба представляют собой нуклеазу Cas9 *Streptococcus pyogenes* (spCas9). В некоторых вариантах осуществления первый фермент Cas9 и второй фермент Cas9 являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первый фермент Cas9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и/или где второй фермент Cas9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления первая gRNA, нацеливающаяся на ген TRAC, содержит спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления первая gRNA, нацеливающаяся на ген TRAC, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления вторая gRNA, нацеливающаяся на ген  $\beta 2M$ , содержит спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления вторая gRNA, нацеливающаяся на ген  $\beta 2M$ , содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления первая gRNA, вторая gRNA или обе содержат одну или несколько 2'-О-метилфосфотиоатных модификаций.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный домен, нацеливающийся на раковый антиген, трансмембранный домен, костимулирующий домен и цитоплазматический сигнальный домен CD3z. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), трансмембранный домен получен из CD8a, и/или костимулирующий домен получен из CD28 и/или 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает CD19. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает BCMA. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61.

В аспектах настоящего изобретения представлена популяция генетически сконструированных Т-клеток, которую получают за счет способа, описанного в данном документе.

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

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**Фиг. 1А-1В** включает диаграммы, на которых показана активация и размножение

Т-клеток в различных условиях. **Фиг. 1А:** график, на котором показана активация Т-клеток, измеренная как процент клеток, экспрессирующих CD25 и/или CD69. **Фиг. 1В:** график, на котором показано, что уровень экспрессии CD25 коррелирует со скоростью размножения клеток. Уровень экспрессии CD25 измеряли как среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) CD25.

**Фиг. 2А-2D** включают диаграммы, на которых показана эффективность редактирования и экспрессия CAR в Т-клетках, полученных в мелкомасштабном производственном процессе, в котором Т-клетки активировали в сосуде для статического культивирования с применением оптимизированных условий, описанных в данном документе. Т-клетки получали параллельно в Т-колбе в качестве контроля. UT: необработанные Т-клетки; EP: Т-клетки, повергнутые электропорации с имитационным контролем; Колба: Т-клетки в Т-колбе и Сосуд: Т-клетки в сосуде для статического культивирования. **Фиг 2А:** график, на котором показана эффективность нокаута TCR $\alpha\beta$  в Т-клетках. **Фиг. 2В:** график, на котором показана эффективность нокаута  $\beta$ 2М в Т-клетках. **Фиг. 2С:** график, на котором показана эффективность двойного нокаута (DKO) в Т-клетках. **Фиг. 2D:** график, на котором показан процент экспрессии CAR (% CAR) в Т-клетках.

**Фиг. 3** представляет собой диаграмму, на которой показано размножение Т-клеток после редактирования Т-клеток, полученных в мелкомасштабном производственном процессе. UT: необработанные Т-клетки; EP: Т-клетки, повергнутые электропорации с имитационным контролем; Колба: Т-клетки в Т-колбе и Сосуд: Т-клетки в сосуде для статического культивирования.

**Фиг. 4А-4F** включают диаграммы, на которых показаны эффективность редактирования и экспрессия CAR в Т-клетках, подвергнутых электропорации при различных концентрациях клеток. UT: необработанные Т-клетки; D3: эффективность редактирования в день 3; D6: эффективность редактирования в день 6; D9: эффективность редактирования в день 9; и D12: эффективность редактирования в день 12. **Фиг. 4А:** график, на котором показана эффективность нокаута  $\beta$ 2М в Т-клетках, подвергнутых электропорации при концентрациях клеток, составляющих от  $100 \times 10^6$  клеток/мл до  $300 \times 10^6$  клеток/мл. **Фиг 4В:** график, на котором показана эффективность нокаута TCR $\alpha\beta$  в Т-клетках, подвергнутых электропорации при концентрациях клеток, составляющих от  $100 \times 10^6$  клеток/мл до  $300 \times 10^6$  клеток/мл. **Фиг. 4С:** график, на котором показан процент экспрессии CAR (% CAR) в Т-клетках, подвергнутых электропорации при концентрациях клеток, составляющих от  $100 \times 10^6$  клеток/мл до  $300 \times 10^6$  клеток/мл. **Фиг. 4D:** график, на котором показана эффективность нокаута  $\beta$ 2М в Т-клетках, подвергнутых электропорации при концентрациях клеток, составляющей от  $200 \times 10^6$  клеток/мл до  $400 \times 10^6$  клеток/мл. **Фиг. 4Е:** график, на котором показана эффективность нокаута TCR $\alpha\beta$  в Т-клетках, подвергнутых электропорации при концентрациях клеток, составляющих от  $200 \times 10^6$  клеток/мл до  $400 \times 10^6$  клеток/мл. **Фиг. 4F:** график, на котором показан процент экспрессии CAR (% CAR) в Т-клетках, подвергнутых электропорации при концентрациях

клеток от  $200 \times 10^6$  клеток/мл до  $400 \times 10^6$  клеток/мл.

**Фиг. 5А-5В** включают диаграммы, на которых показана экспрессия CAR<sup>+</sup> в Т-клетках, трансдуцированных при различных значениях MOI. **Фиг. 5А:** график, на котором показана экспрессия CAR<sup>+</sup> в Т-клетках, трансдуцированных при значениях MOI, находящихся в диапазоне от 1,25 тыс. до 80 тыс. UT: необработанные Т-клетки; D3: экспрессия CAR<sup>+</sup> через 3 дня после трансдукции; D6: экспрессия CAR<sup>+</sup> через 6 дней после трансдукции; D10: экспрессия CAR<sup>+</sup> через 10 дней после трансдукции; и D13: экспрессия CAR<sup>+</sup> через 13 дней после трансдукции. **Фиг. 5В:** график, на котором показана экспрессия CAR<sup>+</sup> в Т-клетках, измеренная через 11 дней после трансдукции при значениях MOI, находящихся в диапазоне от 0,12 тыс. до 23 тыс. P.C.: положительный контроль; EP: контроль, подвергнутый только электропорации; и Изотип: положительный по CAR изотип, замененный на IgG козы.

**Фиг. 6А-6С** включают диаграммы, на которых показаны эффекты плотности высевания клеток на размножение отредактированных Т-клеток. **Фиг. 6А:** график, на котором показано число клеток во время размножения. **Фиг. 6В:** график, на котором показана плотность клеток во время размножения. **Фиг. 6С:** график, на котором показана кратность размножения во время размножения.

**Фиг. 7А-7Е** включают диаграммы, на которых показаны данные о производстве генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный Т-клеточный рецептор, направленный на CD19 (CTX110). **Фиг. 7А** включает блок-схему иллюстративного производственного процесса для получения Т-клеток, экспрессирующих CAR к CD19, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления технологии, описанной в данном документе. **Фиг. 7В-7С** включают диаграммы, на которых показана экспрессия CAR<sup>+</sup> в Т-клетках, трансдуцированных при различных значениях MOI. **Фиг. 7В:** график, на котором показана экспрессия CAR<sup>+</sup> в Т-клетках, трансдуцированных с помощью gAAV-138 при значениях MOI, находящихся в диапазоне от 0 тыс. до 80 тыс. **Фиг. 7С:** график, на котором показана экспрессия CAR<sup>+</sup> в Т-клетках, трансдуцированных с помощью gAAV-138 при значениях MOI, находящихся в диапазоне от 0 тыс. до 80 тыс. Трансдукцию с помощью gAAV-138 при значении MOI, составляющем 20 тыс., применяли в качестве положительного контроля. **Фиг. 7D-7Е** включают диаграммы, на которых показана эффективность редактирования в Т-клетках, подвергнутых электропорации с помощью RNP-комплексов, образованных на основе различных концентраций sgRNA, нацеливающих на TCR (sgRNA TA-1), или sgRNA, нацеливающих на B2M (sgRNA B2M-1). TCRαβ<sup>+</sup>: процент клеток, имеющих отредактированные TCRαβ; β2M<sup>+</sup>: процент клеток, имеющих отредактированные β2M; и двойной нокаут (DKO): процент клеток, имеющих отредактированные TCRαβ и отредактированные β2M. **Фиг. 7D:** график, на котором показана эффективность нокаута в Т-клетках, подвергнутых электропорации с помощью RNP-комплексов, образованных с применением от 37,5 мкг/мл до 300 мкг/мл TA-1. **Фиг. 7Е:** график, на котором показана эффективность нокаута в Т-клетках, подвергнутых электропорации с помощью RNP-комплексов, образованных с применением

от 37,5 мкг/мл до 300 мкг/мл В2М-1.

**Фиг. 8А-8G** включают диаграммы, на которых показаны данные о производстве генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный Т-клеточный рецептор, направленный на ВСМА (СТХ120). **Фиг. 8А** включает блок-схему иллюстративного производственного процесса для получения Т-клеток, экспрессирующих CAR к ВСМА, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления технологии, описанной в данном документе. **Фиг. 8В:** график, на котором показана экспрессия CAR<sup>+</sup> в Т-клетках, трансдуцированных при возрастающих значениях MOI. **Фиг. 8С:** график, на котором показаны уровни маркеров истощения, обнаруженных в СТХ120. **Фиг. 8D:** график, на котором показаны уровни маркеров памяти, обнаруженных в CD8<sup>+</sup> Т-клетках СТХ120. **Фиг. 8Е:** график, на котором показаны уровни маркеров памяти, обнаруженных в CD4<sup>+</sup> Т-клетках СТХ120. **Фиг. 8F:** график, на котором показана продукция IFN $\gamma$  после совместного культивирования СТХ120 с ВСМА<sup>+</sup> опухолевыми клетками. **Фиг. 8G:** график, на котором показано уничтожение опухолевых клеток после совместного культивирования СТХ120 с ВСМА<sup>+</sup> опухолевыми клетками.

**На фиг. 9А и 9В** представлены графики концентрации клеток на мл в виде функции от дней размножения после редактирования.

**На фиг. 10А и 10В** представлены графики рассчитанного числа клеток в виде функции от дней размножения после редактирования.

**На фиг. 11А и 11В** представлены графики процентной жизнеспособности клеток в виде функции от дней размножения после редактирования.

**На фиг. 12А-12С** представлены графики, на которых изображена эффективность редактирования, включая % CAR<sup>+</sup> (**фиг. 12А**), % TRAC<sup>-</sup> (**фиг. 12В**) и %  $\beta$ 2М% (**фиг. 12С**), оцениваемые в различных группах с пересевом и высеванием с низкой плотностью.

**На фиг. 13А и 13В** представлено соотношение CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток в различных популяциях пересейанных клеток.

**На фиг. 14А-14F** представлены гистограммы, изображающие оценку маркеров подтипа клеток памяти в пересейанных популяциях. Клетки в пересейанных популяциях оценивали как наивные Т-клетки, Т-клетки центральной памяти (СМ), эффекторные Т-клетки памяти (ЕМ) и терминальные эффекторные (ТЕ) Т-клетки.

**На фиг. 15А-15F** представлены гистограммы, изображающие оценку маркеров истощения в пересейанных популяциях CAR<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup> клеток. Анализировали три маркера истощения: PD1, LAG3 и TIM3.

**На фиг. 16А-16С** представлены графики, показывающие способность CAR-Т-клеток в пересейанных группах или группах с низкой плотностью высевания уничтожить CD19-положительные целевые клетки Raji *in vitro*, которую оценивали с применением анализа цитотоксичности на основе проточной цитометрии.

**На фиг. 17А-17D** представлены графики, показывающие процентную выживаемость опухолевых клеток в виде функции от дней после инокуляции при трех различных дозах CAR-клеток *in vivo*.

На **фиг. 18A-18D** представлены графики, показывающие опухолевую массу у мышей в виде функции от дней после инокуляции при трех дозах CAR-клеток *in vivo*.

На **фиг. 19** показана блок-схема, иллюстрирующая один вариант осуществления настоящего изобретения.

На **фиг. 20** показан аналитический контрольный FACS-анализ с помощью измерения лизиса CAR-T-клеток. CAR-T-клетки представляли собой CAR-T-клетки CTX110. 81% T-клеток были CAR<sup>+</sup>.

На **фиг. 21A-21C** показаны результаты аналитического контрольного эксперимента, измеряющего лизис клеток и продукцию цитокинов *in vitro*. В анализе применяли CAR-T-клетки CTX110, размороженные из замороженного запаса. В день 6 после HDR 80% T-клеток были CAR<sup>+</sup>.

На **фиг. 22A-22C** показаны результаты анализа эффективности *in vitro*, показывающие, что T-клетки, полученные от каждого из трех доноров, характеризовались различной степенью эффективности *in vitro* в условиях культивирования 1x, 2x и 4x.

На **фиг. 23A-23C** показаны результаты анализа лизиса клеток при различных концентрациях клеток, демонстрирующие, что клетки, полученные от доноров 1 и 2, показывали подобные ответы, несмотря на разные процентные доли CAR<sup>+</sup> клеток.

На **фиг. 24A-24B** показаны результаты анализа лизиса клеток от трех доноров при нормализации по CAR<sup>+</sup> клеткам. Доноры 2 и 3 сходным образом вели себя в анализе при нормализации CAR-клеток. Анализ повторяли с 2x количеством CAR-T-клеток для донора 2 при тех же самых соотношениях E:T.

На **фиг. 25A-25C** представлены кривые выживаемости, показывающие процентную выживаемость мышей в виде функции от дней после инокуляции CAR-клеток для всех трех доноров и условий размножения *in vivo*.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение основано по меньшей мере частично, на разработке усовершенствованных способов производства для получения CAR-T-клеток, в частности, аллогенных CAR-T-клеток, включая улучшенные условия для одной или нескольких стадий производственных процессов. Усовершенствованные производственные процессы, раскрытые в данном документе, привели к по меньшей мере следующим предпочтительным результатам:

(a) улучшенной чистоте T-клеток и улучшенной жизнеспособности T-клеток в результате улучшенных условий обогащения T-клеток, представленных в данном документе;

(b) улучшенной согласованности и улучшенной эффективности при получении T-клеток, экспрессирующих CAR, в результате улучшенных условий трансдукции T-клеток, представленных в данном документе;

(c) улучшенной согласованности и улучшенной эффективности нарушений гена TRAC и гена  $\beta 2M$  в T-клетках в результате улучшенных опосредованных CRISPR-Cas9 условий генного редактирования, представленных в данном документе;

(d) повышенному запасу средству терапии на основе CAR T-клеток в результате сокращения времени производства и снижения производственных затрат, обеспечиваемых улучшенными производственными процессами, описанными в данном документе;

(e) сниженной вариабельности произведенного лекарственного продукта в результате получения однородных и высококачественных средств терапии на основе CAR-T-клеток с применением усовершенствованных производственных процессов, описанных в данном документе;

(f) упрощенным условиям трансдукции AAV при сохранении высокого уровня экспрессии CAR в T-клетках.

Соответственно, в данном документе представлены способы получения генетически сконструированных T-клеток, экспрессирующих конструкцию CAR, такую как конструкция CAR, нацеливающаяся на раковый антиген, например CD19 или BCMA, и имеющих нокаут генов TRAC и  $\beta 2M$ . Популяции генетически сконструированных T-клеток, полученных с помощью способов, описанных в данном документе, и пути их применения в качестве терапевтических средств также входят в объем настоящего изобретения.

### **I. Производство генетически сконструированных T-клеток**

В аспектах настоящего изобретения представлены способы получения генетически сконструированных T-клеток, содержащих нарушенный ген бета-2-микроглобулина ( $\beta 2M$ ) и нарушенный ген константной области альфа-цепи T-клеточного рецептора (TRAC), а также вставленную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR).

Нарушение гена  $\beta 2M$  и гена TRAC придает генетически сконструированным T-клеткам отсутствие аллореактивности и делает их подходящими для аллогенной трансплантации. Вставка нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, позволяет генетически сконструированной T-клетке экспрессировать на своей поверхности CAR, где он нацеливает генетически сконструированную T-клетку на раковые клетки.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способы получения генетически сконструированных T-клеток, раскрытые в данном документе, предусматривают применение генного редактирования CRISPR-Cas9 для нарушения экспрессии TRAC и  $\beta 2M$ , и применение трансдукции аденоассоциированного вируса (AAV) для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR.

В целом, способ получения CAR-T-клеток, раскрытый в данном документе, может предусматривать: (i) обогащение  $CD4^+/CD8^+$  T-клеток из подходящего источника человеческих иммунных клеток, (ii) активацию обогащенных  $CD4^+/CD8^+$  T-клеток и (iii) генетическое конструирование активированных T-клеток для получения CAR-T-клеток, имеющих нарушенные гены TRAC и  $\beta 2M$ ; и сбор генетически сконструированных T-клеток для путей терапевтического применения. При необходимости обогащенные  $CD4^+/CD8^+$  T-клетки можно хранить за счет криоконсервации для применения в дальнейшем. В качестве альтернативы или в дополнение генетически сконструированные

T-клетки можно размножать *in vitro* перед сбором. TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T-клетки можно подвергать деплеции из полученной таким образом популяции CAR-T-клеток.

**(i) Обогащение T-клеток**

В любом из способов производства, раскрытых в данном документе, в качестве исходного материала могут применяться клетки крови человека. Например, T-клетки можно получить из дозы крови, собранной у субъекта с применением методик, известных специалисту в данной области техники, таких как осаждение, например разделение с помощью FICOLL™. В качестве альтернативы T-клетки для применения в получении генетически сконструированных T-клеток можно получать из стволовых клеток (например, HSC или iPSC) за счет дифференцировки *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления клетки крови могут быть получены от отдельного донора-человека. В других вариантах осуществления клетки крови могут быть получены от нескольких доноров-людей (например, 2, 3, 4 или 5 доноров-людей).

В некоторых примерах можно применять образцы Лейкопак от подходящего донора-человека. Как известно в данной области техники, образец Лейкопак представляет собой обогащенный продукт лейкофереза, собранный из периферической крови. Как правило, он содержит различные клетки крови, включая моноциты, лимфоциты, тромбоциты, плазму крови и эритроциты. Донором-человеком предпочтительно является здоровый донор-человек. Например, кандидата на донора-человека можно подвергать скринингу в отношении HBV, HCV, HIV, HTLV, WNV, *Trypanosoma cruzi* и/или CMV. Субъекта-человека, показывающего отрицательные результаты скрининга, можно использовать в качестве донора клеток крови.

Источники T-клеток, которые находят применение в способах по настоящему изобретению, особым образом не ограничены. В некоторых вариантах осуществления T-клетки из банка T-клеток можно применять в качестве исходного материала в любом из способов производства, раскрытых в данном документе. Банк T-клеток может содержать T-клетки с генетическим редактированием определенных генов (например, генов, вовлеченных в самообновление клеток, апоптоз и/или истощение или репликативное старение T-клеток) для улучшения персистенции T-клеток в клеточной культуре. Банк T-клеток может быть получен из истинных T-клеток, например, нетрансформированных T-клеток, терминально-дифференцированных T-клеток, T-клеток, имеющих стабильный геном, и/или T-клеток, которые зависят от цитокинов и факторов роста для пролиферации и размножения. В качестве альтернативы такой банк T-клеток можно получить из клеток-предшественников, таких как гемопоэтические стволовые клетки (например, iPSC), например культуры *in vitro*. В некоторых примерах T-клетки в банке T-клеток могут предусматривать генетическое редактирование одного или нескольких генов, вовлеченных в самообновление клеток, одного или нескольких генов, вовлеченных в апоптоз, и/или одного или нескольких генов, вовлеченных в истощение T-клеток, так что нарушение или снижение экспрессии таких генов приводит к улучшению персистенции в культуре. Примеры отредактированных генов в банке T-клеток включают без ограничения

Tet2, Fas, CD70, регназа-1 или их комбинацию. По сравнению с не подвергнутыми редактированию аналогичными Т-клетками, Т-клетки в банке Т-клеток могут характеризоваться повышенной способностью к размножению в культуре, повышенной способностью к пролиферации, более высокой активацией Т-клеток и/или сниженными уровнями апоптоза.

Подходящие Т-клетки могут получены обогащением из клеток крови человека с применением стандартных способов или способов, раскрытых в данном документе. Т-клетки для применения в получении генетически сконструированных Т-клеток могут экспрессировать один или несколько Т-клеточных маркеров, включая без ограничения CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления CD4<sup>+</sup> Т-клетки могут получены обогащением из клеток крови человека. В других вариантах осуществления CD8<sup>+</sup> Т-клетки могут быть получены обогащением. В конкретных примерах как CD4<sup>+</sup>, так CD8<sup>+</sup> Т-клетки очищены из клеток крови человека.

CD4<sup>+</sup> Т-клетки и/или CD8<sup>+</sup> Т-клетки можно выделять из подходящего источника клеток крови, такого как описанные в данном документе, с применением любого способа, известного в данной области техники, или раскрытые в данном документе, например, с применением антител, способных связываться со специфическими биомаркерами клеточной поверхности на целевых Т-клетках, например, антител, специфических к CD4, и/или антител, специфических к CD8. В некоторых вариантах осуществления обогащение CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток можно осуществлять с применением антител к CD4 и CD8, конъюгированных с магнитными гранулами. Популяцию клеток, содержащую CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, можно инкубировать с такими магнитными гранулами в подходящих условиях в течение подходящего периода времени, обеспечивающего возможность связывания целевых Т-клеток с магнитными гранулами за счет антител, конъюгированных с гранулами. Несвязавшиеся клетки можно отмывать, а CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, связавшиеся с гранулами, можно собирать с применением стандартных способов.

Полученные обогащением Т-клетки (например, CD4<sup>+</sup> Т-клетки и CD8<sup>+</sup> Т-клетки) можно оценивать в отношении таких признаков, как жизнеспособность клеток и/или чистота целевых Т-клеток, в соответствии со стандартной практикой. В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток, полученная на стадии обогащения, раскрытой в данном документе, может характеризоваться жизнеспособностью клеток, составляющей по меньшей мере приблизительно 80% (например, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или выше). В качестве альтернативы или в дополнение к этому популяция обогащенных Т-клеток может характеризоваться чистотой, составляющей по меньшей мере приблизительно 80% целевых Т-клеток (например, CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток), например, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или больше. В качестве альтернативы или в дополнение к этому популяция обогащенная Т-клеток может

характеризоваться чистотой, составляющей по меньшей мере приблизительно 70% целевых Т-клеток (например, CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток), например, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или больше.

Термин "приблизительно" или "примерно" означает нахождение конкретного значения в пределах приемлемого диапазона ошибок, определенного специалистом средней квалификации в данной области техники, который будет частично зависеть от того, каким образом значение измеряют или определяют, т. е. ограничений системы измерения. Например, термин "приблизительно" может означать в пределах приемлемого стандартного отклонения в соответствии с практикой в данной области техники. В качестве альтернативы термин "приблизительно" может означать диапазон, составляющий не более  $\pm 20\%$ , предпочтительно не более  $\pm 10\%$ , более предпочтительно не более  $\pm 5\%$  и еще более предпочтительно не более  $\pm 1\%$  от заданного значения. В качестве альтернативы, в частности, в отношении биологических систем или процессов, термин может означать в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах 2-кратного значения. Когда в настоящей заявке и формуле изобретения описаны конкретные значения, если не указано иное, термина "приблизительно" является подразумеваемым, и в данном контексте для конкретного значения означает нахождение в пределах приемлемого диапазона ошибок.

Популяцию обогащенных Т-клеток (которая также находится в пределах объема настоящего изобретения) можно немедленно применять для дополнительной обработки, как раскрыто в данном документе. В качестве альтернативы популяцию обогащенных Т-клеток можно сохранить в подходящих условиях для применения в дальнейшем, например, за счет криоконсервации. Перед дальнейшей обработкой криоконсервированные Т-клетки можно разморозить, следуя стандартным процедурам. Жизнеспособность клеток у размороженных клеток можно оценивать для определения того, подходят ли размороженные клетки для дальнейшей обработки.

#### (ii) *Активация Т-клеток*

Обогащенные Т-клетки можно подвергать активации Т-клеток для обеспечения пролиферации и размножения обогащенных CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Стадия активации Т-клеток, применяемая в любом из способов, раскрытых в данном документе, может включать условия активации Т-клеток, раскрытые в данном документе, которые обеспечивают высокую эффективность активации Т-клеток. Кроме того, активированные Т-клетки, полученные из них, будут демонстрировать высокую эффективность генного редактирования и высокие показатели скорости размножения Т-клеток после редактирования. См. примеры ниже.

В некоторых вариантах осуществления активация Т-клеток может достигаться с применением средства или средств, активирующих Т-клетки, например средств, которые

стимулируют сигнальный путь, опосредованный CD3/TCR, и/или сигнальный путь, опосредованный костимулирующей молекулой (например, CD28). Например, средство, активирующее Т-клетки, может представлять собой агонист CD3 (например, агонистическое антитело к CD3) и активировать клеточный сигнальный путь, опосредованный CD3/TCR. В качестве альтернативы или в дополнение средство, активирующее Т-клетки, может представлять собой агонист CD28 (например, антитело к CD28) и активировать костимулирующий сигнальный путь, опосредованный CD28. Любое из средств, активирующих Т-клетки, для применения в способе, раскрытом в данном документе, можно конъюгировать с элементом-носителем, таким как частица наноматрицы. В конкретных примерах средство, активирующее Т-клетки, для применения в способе, раскрытом в данном документе, может предусматривать антитело к CD3 и антитело к CD28, которые могут быть конъюгированы с частицами наноматрицы. В некоторых вариантах осуществления средство, активирующее Т-клетки, содержит агонист CD3 и агонист CD28, прикрепленные к частице наноматрицы. В некоторых вариантах осуществления агонист CD3 и агонист CD28 прикреплены к одной и той же частице наноматрицы. В некоторых вариантах осуществления агонист CD3 и агонист CD28 прикреплены к разным частицам наноматрицы.

Для достижения активации Т-клеток обогащенные Т-клетки, раскрытые в данном документе (например, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Т-клетки), можно помещать в сосуд для культивирования клеток при подходящей плотности высевания клеток и подходящей концентрации клеток и инкубировать в присутствии любого из средств, активирующих Т-клетки, раскрытых в данном документе, в течение подходящего периода для индукции активации Т-клеток.

В некоторых случаях отношения средства, активирующего Т-клетки, к среде для культивирования клеток в сосуде для культивирования клеток могут находиться в диапазоне от приблизительно 1:10 (об./об.) до приблизительно 1:15 (об./об.). В некоторых примерах отношение средства, активирующего Т-клетки, к среде для культивирования клеток в сосуде для культивирования клеток может составлять приблизительно 1:10 (об./об.), приблизительно 1:10,5 (об./об.), приблизительно 1:11 (об./об.), приблизительно 1:11,5 (об./об.), приблизительно 1:12 (об./об.), приблизительно 1:12,5 (об./об.), приблизительно 1:13 (об./об.), приблизительно 1:13,5 (об./об.), приблизительно 1:14 (об./об.), приблизительно 1:14,5 (об./об.) или приблизительно 1:15 (об./об.). В конкретных примерах отношение средства, активирующего Т-клетки, к среде для культивирования в сосуде для культивирования клеток составляет приблизительно 1:12,5 (об./об.).

В качестве альтернативы или в дополнение подходящая плотность высевания клеток может составлять от приблизительно  $1,5 \times 10^6$  до  $2,5 \times 10^6$  (например,  $2 \times 10^6/\text{см}^2$ ), а подходящая концентрация клеток может составлять от приблизительно  $1,5 \times 10^6$  до  $2,5 \times 10^6$  (например,  $2 \times 10^6/\text{мл}$ ). Клетки можно инкубировать со средством, активирующим Т-клетки, в течение приблизительно 42-54 часов, например приблизительно 48 часов.

В некоторых вариантах осуществления сосуд для культивирования клеток может

представлять собой сосуд для статического культивирования, который будет обеспечивать относительно крупномасштабное получение генетически сконструированных Т-клеток, раскрытых в данном документе. По сравнению со стандартными колбами для культивирования клеток сосуды для статического культивирования клеток обеспечивают нахождение Т-клеток на мембране с высокой газопроницаемостью, погруженной в среду, которая снабжает Т-клетки кислородом и питательными веществами без перемешивания или встряхивания. Сосуды для статического культивирования обеспечивают производство Т-клеток без замены среды. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления процесс активации Т-клеток в любом из способов, раскрытых в данном документе, может не предусматривать замену среды.

При необходимости активирующее средство можно удалять из сосуда для культивирования клеток или разбавлять перед последующими событиями генного редактирования, чтобы свести к минимуму любое потенциальное воздействие, которое может оказывать активирующее средство во время генного редактирования. В некоторых вариантах осуществления активирующее средство можно удалить из сосуда для культивирования клеток с применением стандартных способов, например центрифугирования. В качестве альтернативы активирующее средство можно разбавлять в сосуде для культивирования клеток перед генным редактированием, например, разбавлять путем добавления среды в сосуд для культивирования клеток.

В некоторых вариантах осуществления активированные Т-клетки, полученные в результате любого из процессов активации Т-клеток, раскрытых в данном документе, можно культивировать на протяжении ночи (например, приблизительно 16 часов), чтобы обеспечить восстановление Т-клеток перед генным редактированием. В некоторых случаях культура активированных Т-клеток все еще может содержать средство, активирующее Т-клетки. В других случаях активированные Т-клетки могут характеризоваться незначительным присутствием средства, активирующего Т-клетки, или его отсутствием.

***(iii) Опосредованное CRISPR-CAS9 генное редактирование в активированных Т-клетках***

Активированные Т-клетки, подготовленные с помощью любой из процедур, раскрытых в данном документе, можно подвергнуть генному редактированию для нокаута генов, связанных с ответом хозяина, например гена TRAC и/или гена  $\beta 2M$ , за счет, например, технологии генного редактирования CRISPR-Cas9.

Ген TRAC кодирует компонент комплекса TCR. Нарушение гена TRAC приводит к утрате функции TCR и придает сконструированным Т-клеткам отсутствие аллореактивности и делает их пригодными для аллогенной трансплантации, при этом сводится к минимуму риск реакции "трансплантат против хозяина". Ген  $\beta 2M$  кодирует общий (инвариантный) компонент комплексов главного комплекса гистосовместимости (МНС) I. Нарушение гена  $\beta 2M$  может предупреждать ответы хозяина на терапевтические аллогенные Т-клетки. Нокаутирование одновременно гена TRAC и гена  $\beta 2M$  будет

приводить к получению аллогенных Т-клеток для применения в клеточной терапии.

### *Опосредованная CRISPR-Cas9 система генного редактирования*

Система CRISPR-Cas9 представляет собой встречающийся в природе защитный механизм у прокариот, который был переориентирован в направляемую с помощью РНК платформу для нацеливания на ДНК, применяемую для редактирования гена. Она основана на ДНК-нуклеазе Cas9 и двух некодирующих РНК, crisprRNA (crRNA) и трансактивирующей РНК (tracrRNA), для нацеливания на расщепление ДНК. CRISPR является сокращением термина "короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами", это семейство последовательностей ДНК, обнаруженных в геномах бактерий и архей, которое содержит фрагменты ДНК (спейсерную ДНК), сходные с чужеродной ДНК, воздействию которой ранее подвергалась клетка, например, вирусов, которые инфицировали или атаковали прокариотическую клетку. Эти фрагменты ДНК прокариотическая клетка использует для обнаружения и разрушения аналогичной чужеродной ДНК после повторного введения, например, из аналогичных вирусов во время последующих атак. Транскрипция локуса CRISPR приводит к образованию молекулы РНК, содержащей спейсерную последовательность, которая ассоциируется с белками Cas (ассоциированными с CRISPR), способными распознавать и разрезать чужеродную экзогенную ДНК, и нацеливается их. Были описаны многочисленные типы и классы систем CRISPR/Cas (см., например, Koonin et al., (2017) *Curr Opin Microbiol* 37:67-78).

crRNA управляет распознаванием последовательности и специфичностью комплекса CRISPR-Cas9 благодаря спариванию оснований по Уотсону-Крику, как правило, с 20-нуклеотидной (нт.) последовательностью в целевой ДНК. Изменение последовательности из 20 нт. на 5'-конце в crRNA обеспечивает нацеливание комплекса CRISPR-Cas9 на специфические локусы. Комплекс CRISPR-Cas9 связывает последовательности ДНК, которые содержат последовательность, соответствующую первым 20 нт. crRNA, только если за целевой последовательностью следует специфический короткий мотив ДНК (с последовательностью NGG), называемый мотив, примыкающий к протоспейсеру (PAM).

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

После того как комплекс CRISPR-Cas9 связывается с ДНК в целевом сайте, каждый из двух независимых нуклеазных доменов в пределах фермента Cas9 расщепляет одну из нитей ДНК выше сайта PAM, оставляя двухнитевой разрыв (DSB), при этом обе нити ДНК заканчиваются парой оснований (тупым концом).

После связывания комплекса CRISPR-Cas9 с ДНК в специфическом целевом сайте и образования сайт-специфического DSB следующая ключевая стадия заключается в репарации DSB. Клетки используют два основных пути репарации ДНК для репарации DSB: негомологичное соединение концов (NHEJ) и направляемая гомологией репарация

(HDR).

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

(i) Cas9

В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазу Cas9 (CRISPR-ассоциированный белок 9) применяют в способе CRISPR для получения генетически сконструированных Т-клеток, раскрытых в данном документе. Фермент Cas9 может представлять собой фермент из *Streptococcus pyogenes*, хотя также можно применять другие гомологи Cas9. Следует учитывать, что можно применять Cas9 дикого типа или можно применять модифицированные версии Cas9 (например, видоизмененные версии Cas9 или ортологи или варианты Cas9), представленные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления Cas9 содержит белок нуклеазу Cas9, полученную из *Streptococcus pyogenes*, которая была сконструирована, чтобы включать С- и N-концевые последовательности ядерной локализации (NLS) большого Т-антигена SV40. Полученная в результате нуклеазы Cas9 (sNLS-spCas9-sNLS) представляет собой белок с молекулярной массой 162 кДа, который получают при культивировании рекомбинантной бактерии *E. coli* и очищают посредством хроматографии. Аминокислотную последовательность spCas9 можно найти в UniProt под номером доступа Q99ZW2, которая представлена в данном документе как SEQ ID NO: 1.

(ii) Направляющие РНК (gRNA)

Опосредованное CRISPR-Cas9 редактирование генов, описанное в данном документе, включает применение направляющей РНК или gRNA. Используемая в данном документе "gRNA" относится к нуклеиновой кислоте, нацеливающейся на геном, которая может направлять Cas9 на специфическую целевую последовательность в пределах гена TRAC или гена  $\beta 2M$  для генного редактирования в специфической целевой последовательности. Направляющая РНК содержит по меньшей мере спейсерную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты в пределах целевого гена для осуществления редактирования, и последовательность повтора CRISPR.

Иллюстративная gRNA, нацеливающаяся на ген TRAC, представлена под SEQ ID NO: 2. См. также международную заявку № PCT/IB2018/001619, поданную 11 мая 2018 г.,

которая опубликована как WO 2019/097305A2, соответствующие раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки для заявленного объекта и цели, упомянутых в данном документе. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с применением последовательности гена TRAC, расположенной на хромосоме 14 (GRCh38: хромосома 14: 22547506-22552154; Ensembl: ENSG00000277734). В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область TRAC, и Cas9 создают разрывы в геномной области TRAC, что приводит к вставкам/делециям в гене TRAC с нарушением экспрессии мРНК или белка.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область TRAC, приводят к возникновению вставок/делеций в гене TRAC, содержащем по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей в **таблице 9**. В некоторых вариантах осуществления gRNA (SEQ ID NO: 2), нацеливающаяся на геномную область TRAC, приводит к возникновению вставок/делеций в гене TRAC, содержащем по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей в **таблице 9**.

Иллюстративная gRNA, нацеливающаяся на ген  $\beta 2M$ , представлена под SEQ ID NO: 6. См. также международную заявку № PCT/IB2018/001619, поданную 11 мая 2018 г., которая опубликована как WO 2019/097305A2, соответствующие раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки для заявленного объекта и цели, упомянутых в данном документе. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с применением последовательности гена  $\beta 2M$ , расположенной на хромосоме 15 (координаты GRCh38: хромосома 15: 44711477-44718877; Ensembl: ENSG00000166710). В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область  $\beta 2M$ , и РНК-направляемая нуклеаза создают разрывы в геномной области  $\beta 2M$ , что приводит к вставкам/делециям в гене  $\beta 2M$  с нарушением экспрессии мРНК или белка.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область  $\beta 2M$ , приводят к возникновению вставок/делеций в гене  $\beta 2M$ , содержащем по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей в **таблице 10**. В некоторых вариантах осуществления gRNA (SEQ ID NO: 6), нацеливающаяся на геномную область  $\beta 2M$ , приводит к возникновению вставок/делеций в гене  $\beta 2M$ , содержащем по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей в **таблице 10**.

В системах II типа gRNA также содержит вторую РНК, называемую последовательностью tracrRNA. В gRNA, относящейся ко II типу, последовательность повтора CRISPR и последовательность tracrRNA гибридизируются друг с другом с образованием дуплекса. В gRNA, относящейся к V типу, crRNA образует дуплекс. В обеих системах дуплекс связывает сайт-направленный полипептид таким образом, что направляющая РНК и сайт-направленный полипептид образуют комплекс. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, обеспечивает

специфичность комплекса в отношении мишени благодаря своей ассоциации с сайт-направленным полипептидом. Таким образом, нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, направляет активность сайт-направленного полипептида.

Как понятно специалисту средней квалификации в данной области техники, каждая направляющая РНК разработана так, чтобы включать спейсерную последовательность, комплементарную ее геномной целевой последовательности. См. Jinek et al., *Science*, 337, 816-821 (2012) и Deltcheva et al., *Nature*, 471, 602-607 (2011).

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

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

Направляющая РНК, состоящая из одной молекулы (называемая "sgRNA"), в системе II типа содержит в направлении от 5'- к 3'-концу необязательную последовательность удлинения спейсера, спейсерную последовательность, минимальную последовательность повтора CRISPR, линкер направляющей, состоящей из одной молекулы, минимальную последовательность tracrRNA, 3'-последовательность tracrRNA и необязательную последовательность удлинения tracrRNA. Необязательная последовательность удлинения tracrRNA может содержать элементы, которые придают направляющей РНК дополнительные функциональные свойства (например, стабильность). Линкер направляющей, состоящей из одной молекулы, связывает минимальный повтор CRISPR и минимальную последовательность tracrRNA с образованием шпильчатой структуры. Необязательная последовательность удлинения tracrRNA содержит одну или несколько шпилек. Направляющая РНК, состоящая из одной молекулы, в системе V типа содержит в направлении от 5' к 3'-конца минимальную последовательность повтора CRISPR и спейсерную последовательность.

"Целевая последовательность" находится в целевом гене, при этом она примыкает к последовательности PAM и представляет собой последовательность, подлежащую модификации с помощью Cas9. "Целевая последовательность" находится на так называемой PAM-нити в "целевой нуклеиновой кислоте", которая представляет собой двухнитевую молекулу, содержащую PAM-нить и комплементарную не содержащую PAM нить. Специалист в данной области техники поймет, что спейсерная последовательность gRNA гибридизируется с комплементарной последовательностью,

расположенной в не содержащей PAM нити, целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. Таким образом, спейсерная последовательность gRNA представляет собой РНК-эквивалент целевой последовательности.

Например, если целевая последовательность TRAC представляет собой 5'-AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3' (SEQ ID NO: 11), то спейсерная последовательность gRNA представляет собой 5'-AGAGCAACAGUGCUGUGGCC-3' (SEQ ID NO: 5). В другом примере, если целевая последовательность  $\beta$ 2M представляет собой 5'-GCTACTCTCTCTTTCTGGCC-3' (SEQ ID NO: 13), то спейсерная последовательность gRNA представляет собой 5'-GCUACUCUCUCUUUCUGGCC-3' (SEQ ID NO: 9). Спейсер gRNA взаимодействует с целевой нуклеиновой кислотой, представляющей интерес, специфическим в отношении последовательности образом за счет гибридизации (т. е. спаривания оснований). Таким образом, нуклеотидная последовательность спейсера меняется в зависимости от целевой последовательности целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес.

В системе CRISPR/Cas, описанной в данном документе, спейсерная последовательность разработана, чтобы гибридизироваться с областью целевой нуклеиновой кислоты, которая расположена в 5'-направлении от PAM, распознаваемого ферментом Cas9, применяемым в системе. Спейсер может идеально соответствовать целевой последовательности или может иметь ошибочные спаривания. Для каждого фермента Cas9 имеется конкретная последовательность PAM, которую он распознает в целевой ДНК. Например, фермент из *S. pyogenes* распознает в целевой нуклеиновой кислоте PAM, который содержит последовательность 5'-NRG-3', где R представляет собой A или G, где N представляет собой любой нуклеотид, и при этом N находится непосредственно рядом с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, на которую нацеливается спейсерная последовательность, в 3'-направлении от нее.

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

Спейсерная последовательность в gRNA представляет собой последовательность (например, последовательность из 20 нуклеотидов), которая определяет целевую последовательность (например, целевые последовательности ДНК, такие как геномная целевая последовательность) целевого гена, представляющего интерес. Иллюстративная спейсерная последовательность gRNA, нацеливающаяся на ген TRAC, представлена под SEQ ID NO: 4. Иллюстративная спейсерная последовательность gRNA, нацеливающаяся на ген *β2M*, представлена под SEQ ID NO:8.

Направляющая РНК, раскрытая в данном документе, может нацеливаться на любую последовательность, представляющую интерес, за счет спейсерной последовательности в crRNA. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между спейсерной последовательностью направляющей РНК и целевой последовательностью в целевом гене может составлять приблизительно 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность направляющей РНК и целевая последовательность в целевом гене комплементарны на 100%. В других вариантах осуществления спейсерная последовательность направляющей РНК и целевая последовательность в целевом гене могут содержать не более 10 ошибочных спариваний, например, не более 9, не более 8, не более 7, не более 6, не более 5, не более 4, не более 3, не более 2 или не более 1 ошибочного спаривания.

Неограничивающие примеры gRNA, которые можно применять, как представлено в данном документе, представлены в международной заявке № PCT/IB2018/001619, поданной 11 мая 2018 г., которая опубликована как WO 2019/097305A2, и в международной заявке № PCT/IB2019/000500, поданной 10 мая 2019 г., которая опубликована как WO/2019/215500, при этом соответствующие раскрытия каждой из предшествующих заявок включены в данный документ посредством ссылки для целей и заявляемого объекта, упомянутых в данном документе. Для любой из последовательностей gRNA, представленных в данном документе, подразумевается, что последовательности, для которых явно не указано, что они содержат модификации, охватывают как немодифицированные последовательности, так и последовательности, содержащие любые подходящие модификации.

Длина спейсерной последовательности в любой из gRNA, раскрытых в данном документе, может зависеть от системы CRISPR/Cas9 и компонентов, применяемых для редактирования любого из целевых генов, также раскрытых в данном документе. Например, разные белки Cas9 из разных видов бактерий характеризуются варьирующими значениями длины оптимальной спейсерной последовательности. Соответственно, длина спейсерной последовательности может составлять 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или более чем 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина спейсерной последовательности может составлять 18-24 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления длина нацеливающейся последовательности может составлять 19-21 нуклеотид. В некоторых

вариантах осуществления длина спейсерной последовательности может составлять 20 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления gRNA может представлять собой sgRNA, которая может содержать спейсерную последовательность из 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA может содержать спейсерную последовательность из менее чем 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA может содержать спейсерную последовательность из более чем 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность переменной длины из 17-30 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. Примеры представлены в **таблице 8** в примере 7.

В некоторых вариантах осуществления sgRNA не содержит остаток урацила на 3'-конце последовательности sgRNA. В других вариантах осуществления sgRNA может содержать один или несколько остатков урацила на 3'-конце последовательности sgRNA. Например, sgRNA может содержать 1-8 остатков урацила на 3'-конце последовательности sgRNA, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 остатков урацила на 3'-конце последовательности sgRNA.

Любая из gRNA, раскрытых в данном документе, включая любую из sgRNA, может быть немодифицированной. В качестве альтернативы она может содержать один или несколько модифицированных нуклеотидов и/или модифицированных каркасов. Например, модифицированная gRNA, такая как sgRNA, может содержать один или несколько нуклеотидов с 2'-О-метилфосфоротиоатными связями, которые могут располагаться на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах.

В определенных вариантах осуществления более чем одна направляющая РНК может быть использована с системой CRISPR/нуклеаза Cas. Каждая направляющая РНК может содержать отличающуюся нацеливающую последовательность, так что система CRISPR/Cas расщепляет более чем одну целевую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько направляющих РНК могут обладать одинаковыми или различающимися свойствами, такими как активность или стабильность в комплексе Cas9 RNP. При использовании более чем одной направляющей РНК каждая направляющая РНК может быть закодирована на одном и том же или на разных векторах. Промоторы, применяемые для управления экспрессией более чем одной направляющей РНК, являются одинаковыми или разными.

Следует понимать, что более чем один подходящий Cas9 и более чем одну подходящую gRNA можно использовать в способах, описанных в данном документе, например в способах, известных из уровня техники или раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способы включают фермент Cas9 и/или gRNA, известные из уровня техники. Примеры можно найти, например, в международной заявке № PCT/IB2018/001619, поданной 11 мая 2018 г., которая опубликована как WO 2019/097305A2, и в международной заявке № PCT/IB2019/000500, поданной 10 мая 2019

г., которая опубликована как WO/2019/215500, соответствующие раскрытия каждой из предшествующих заявок включены в данный документ посредством ссылки для цели и заявляемого объекта, упомянутых в данном документе.

*Опосредованное CRISPR-Cas9 генное редактирование TRAC и  $\beta 2M$*

В некоторых вариантах осуществления активированные Т-клетки, раскрытые в данном документе, могут подвергаться генному редактированию одновременно гена TRAC и гена  $\beta 2M$  за счет опосредованного CRISPR-Cas9 генного редактирования, в условиях, раскрытых в данном документе, что приведет к более высоким и более совместимым показателям эффективности генного редактирования по сравнению с показателями, обеспечиваемыми стандартными условиями. Кроме того, TRAC/ $\beta 2M$  Т-клетки, полученные в процессе генного редактирования, описанного в данном документе, демонстрировали высокий уровень экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), когда вирусный вектор, кодирующий конструкцию CAR, доставлялся в TRAC/ $\beta 2M$  Т-клетки.

Фермент Cas9 и gRNA, нацеливающиеся на ген TRAC и ген  $\beta 2M$ , могут образовывать один или несколько рибонуклеопротеиновых (RNP) комплексов, которые могут доставляться в активированные Т-клетки, раскрытые в данном документе. RNP применимы для генного редактирования по меньшей мере потому, что они сводят к минимуму риск беспорядочных взаимодействий в богатой нуклеиновыми кислотами клеточной среде и защищают РНК от разрушения. Способы образования RNP известны из уровня техники.

Опосредованный CRISPR-Cas9 способ генного редактирования может предусматривать два рибонуклеопротеиновых комплекса. Первый RNP-комплекс содержит первый фермент Cas9 и направляющую РНК (gRNA), нацеливающуюся на ген TRAC. Второй RNP-комплекс содержит второй фермент Cas9 и gRNA, нацеливающуюся на ген  $\beta 2M$ . В некоторых примерах два RNP-комплекса могут содержать разные ферменты Cas9. В других примерах два RNP-комплекса содержат один и тот же фермент Cas9. В конкретных примерах фермент Cas9 под SEQ ID NO:1 можно применять как в первом, так и во втором RNP.

В некоторых вариантах осуществления два RNP-комплекса могут содержать одинаковое количество фермента Cas9. Например, оба RNP-комплекса могут содержать приблизительно 0,1-0,3 мг/мл (например, приблизительно 0,1-0,2 мг/мл) фермента Cas9 (например, фермента Cas9 под SEQ ID NO:1). В некоторых примерах каждый из RNP-комплексов может содержать приблизительно 0,15 мг/мл фермента Cas9, который может представлять собой фермент Cas9 под SEQ ID NO:1.

В других вариантах осуществления два RNP-комплекса могут содержать различные количества фермента Cas9. В некоторых примерах RNP-комплекс, нацеливающийся на ген TRAC, может содержать большее количество фермента Cas9 по сравнению с RNP-комплексом, нацеливающимся на ген  $\beta 2M$ . В качестве альтернативы RNP-комплекс, нацеливающийся на ген  $\beta 2M$ , может содержать большее количество

фермента Cas9 по сравнению с RNP-комплексом, нацеливающимся на ген TRAC.

Два RNP-комплекса могут содержать одинаковое количество gRNA (одну, нацеливающуюся на TRAC, а другую, нацеливающуюся на  $\beta 2M$ ). В качестве альтернативы два RNP-комплекса могут содержать разные количества gRNA. Например, количество gRNA, нацеливающейся на ген TRAC, может находиться в диапазоне от приблизительно 0,035 мг/мл до приблизительно 0,8 мг/мл, например, от приблизительно 50 мкг/мл до приблизительно 80 мкг/мл. В конкретных примерах количество gRNA, нацеливающейся на ген TRAC, составляет приблизительно 0,08 мг/мл. В качестве альтернативы или в дополнение количество gRNA, нацеливающейся на ген  $\beta 2M$ , может находиться в диапазоне от приблизительно 0,075 мг/мл до приблизительно 0,3 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 0,3 мг/мл. В конкретных примерах количество gRNA, нацеливающейся на ген  $\beta 2M$ , составляет приблизительно 0,2 мг/мл.

В конкретных примерах RNP-комплекс, нацеливающийся на ген TRAC, может содержать приблизительно 0,15 мг/мл Cas9 (например, Cas9 под SEQ ID NO:1) и приблизительно 0,08 мг/мл gRNA, нацеливающейся на ген TRAC (например, gRNA из TA-1). В качестве альтернативы или в дополнение RNP-комплекс, нацеливающийся на ген  $\beta 2M$ , может содержать приблизительно 0,15 мг/мл Cas9 (например, Cas9 под SEQ ID NO:1) и приблизительно 0,2 мг/мл gRNA, нацеливающейся на ген  $\beta 2M$  (например, gRNA из B2M-1).

В некоторых вариантах осуществления два RNP можно вводить в активированную Т-клетку посредством последовательной электропорации, т. е. посредством двух событий электропорации. В качестве альтернативы два RNP можно вводить в активированные Т-клетки одновременно, т. е. посредством одного события электропорации. В этом случае два RNP можно объединять с образованием смеси перед событием электропорации.

Любой из RNP, раскрытых в данном документе, можно вводить в активированные Т-клетки путем смешивания RNP с подходящим количеством активированных Т-клеток, и полученную таким образом смесь подвергают электропорации в подходящих условиях, обеспечивающих доставку RNP в клетки. В некоторых случаях подходящее количество активированных Т-клеток может находиться в диапазоне от приблизительно  $100 \times 10^6$  клеток/мл до приблизительно  $300 \times 10^6$  клеток/мл. Например, подходящее количество Т-клеток для стадии электропорации может находиться в диапазоне от приблизительно  $200 \times 10^6$  клеток/мл до приблизительно  $300 \times 10^6$  клеток/мл. В некоторых примерах концентрация активированных Т-клеток может составлять приблизительно  $100 \times 10^6$  клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация активированных Т-клеток может составлять приблизительно  $200 \times 10^6$  клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация активированных Т-клеток может составлять приблизительно  $300 \times 10^6$  клеток/мл.

В некоторых вариантах осуществления подходящее количество активированных Т-клеток может находиться в диапазоне от приблизительно  $1 \times 10^8$  до приблизительно  $1 \times 10^{10}$  клеток, например, от приблизительно  $5 \times 10^8$  до приблизительно  $8 \times 10^9$  клеток, от

приблизительно  $1 \times 10^9$  до приблизительно  $5 \times 10^9$  клеток или от приблизительно  $1 \times 10^9$  до приблизительно  $3 \times 10^9$  клеток.

Для применения в электропорации Т-клетки можно помещать в многоклеточные кассеты, в зависимости от применяемого инструмента для электропорации. Подходящие инструменты для электропорации известны специалистам в данной области техники и могут включать статические и проточные электропораторы, включая Lonza Nucleofector, Maxcyte GT и MaxCyte GTx. В некоторых случаях в процессе электропорации можно применять многоклеточные кассеты. Более подробная информация представлена в примере 10 ниже.

В конкретных примерах два раскрытые выше RNP, содержащие приблизительно 0,3 мг/мл фермента Cas9 в целом (например, фермента Cas9 под SEQ ID NO:1), приблизительно 0,08 мг/мл gRNA из TA-1 и приблизительно 0,2 мг/мл gRNA из B2M-1, можно смешивать с активированными Т-клетками в количестве, составляющем от приблизительно  $100 \times 10^6$  клеток/мл до приблизительно  $300 \times 10^6$  клеток/мл (например, приблизительно  $300 \times 10^6$  клеток/мл). Затем смесь подвергают электропорации для доставки RNP в Т-клетки.

После электропорации клетки можно культивировать в свежей среде или буфере для электропорации в течение периода, подходящего для восстановления. Оценку эффективности генного редактирования можно осуществлять в соответствии со стандартной практикой. Полученные таким образом генетически отредактированные Т-клетки можно подвергать трансдукции вирусным вектором для доставки нуклеиновой кислоты, выполненной с возможностью экспрессии CAR.

#### (iv) *Трансдукция Т-клеток*

Генетически отредактированные Т-клетки, характеризующиеся нокаутом по генам TRAC и  $\beta 2M$ , можно подвергнуть трансдукции вирусным вектором, таким как вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), для получения популяция Т-клеток, экспрессирующих CAR.

#### *Химерный антигенный рецептор (CAR)*

Химерный антигенный рецептор (CAR) относится к искусственному рецептору иммунных клеток, который сконструирован для распознавания и связывания антигена, экспрессируемого нежелательными клетками, например, пораженными заболеванием клетками, такими как раковые клетки. Т-клетка, которая экспрессирует полипептид CAR, называется CAR-Т-клеткой. CAR обладают способностью перенаправлять специфичность и реактивность Т-клеток в направлении выбранной мишени без рестриктирования по МНС. Распознавание антигена без рестриктирования по МНС придает CAR-Т-клеткам способность распознавать антиген независимо от процессирования антигена, таким образом обходя основной механизм ускользания опухоли. Более того, при экспрессии на Т-клетках CAR преимущественно не димеризуются с альфа- и бета-цепями эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR).

Существуют различные поколения CAR, каждое из которых содержит отличающиеся компоненты. В CAR первого поколения scFv, полученный из антитела, соединен с внутриклеточным сигнальным доменом CD3зета ( $\zeta$  или  $z$ ) T-клеточного рецептора посредством шарнирного и трансмембранного доменов. В CAR второго поколения включен дополнительный костимулирующий домен, например, CD28, 4-1BB (41BB) или ICOS, для обеспечения костимулирующего сигнала. CAR третьего поколения содержат два костимулирующих домена (например, комбинацию CD27, CD28, 4-1BB, ICOS или OX40), слитых с цепью CD3 $\zeta$  TCR. Maude et al., *Blood*. 2015; 125(26):4017-4023; Kakarla and Gottschalk, *Cancer J*. 2014; 20(2):151-155). Любое из различных поколений конструкций CAR входит в объем настоящего изобретения.

Обычно CAR представляет собой слитый полипептид, содержащий внеклеточный домен, который распознает целевой антиген (например, одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) антитела или другой фрагмент антитела), и внутриклеточный домен, содержащий сигнальный домен комплекса T-клеточного рецептора (TCR) (например, CD3 $\zeta$ ), и, в большинстве случаев, костимулирующий домен. (Enblad et al., *Human Gene Therapy*. 2015; 26(8):498-505). Конструкция CAR может дополнительно содержать шарнирный и трансмембранный домен между внеклеточным доменом и внутриклеточным доменом, а также сигнальный пептид на N-конце для поверхностной экспрессии. Примеры сигнальных пептидов включают MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP (SEQ ID NO: 44) и MALPVTALLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 75). Можно применять другие сигнальные пептиды.

(а) Антигенсвязывающий внеклеточный домен

Антигенсвязывающий внеклеточный домен представляет собой область полипептида CAR, которая подвергается воздействию внеклеточной жидкости, когда CAR экспрессируется на клеточной поверхности. В некоторых случаях сигнальный пептид может располагаться на N-конце для облегчения экспрессии на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен может представлять собой одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv, который может содержать варибельную область тяжелой цепи антитела ( $V_H$ ) и варибельную область легкой цепи антитела ( $V_L$ ) (в любой ориентации). В некоторых случаях фрагменты  $V_H$  и  $V_L$  могут быть связаны посредством пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидрофильные остатки в пределах отрезков из глицина и серина для обеспечения гибкости, а также отрезками из глутамата и лизина для обеспечения дополнительной растворимости. scFv-фрагмент сохраняет антигенсвязывающую специфичность исходного антитела, из которого получен scFv-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления scFv может содержать гуманизированные домены  $V_H$  и/или  $V_L$ . В других вариантах осуществления домены  $V_H$  и/или  $V_L$  scFv являются полностью человеческими.

Антигенсвязывающий внеклеточный домен может быть специфичным в отношении представляющего интерес целевого антигена, например, патологического

антигена, такого как опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой "ассоциированный с опухолью антиген", что относится к иммуногенной молекуле, такой как белок, которая обычно экспрессируется на более высоком уровне в опухолевых клетках, чем в отличных от опухолевыми клетках, в которых она может не экспрессироваться вообще или только на низких уровнях. В некоторых вариантах осуществления ассоциированные с опухолью структуры, которые распознаются иммунной системой хозяина, несущего опухоль, называются ассоциированными с опухолью антигенами. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с опухолью антиген представляет собой универсальный опухолевый антиген, если он широко экспрессируется в большинстве типов опухолей. В некоторых вариантах осуществления ассоциированные с опухолью антигены представляют собой дифференцировочные антигены, мутационные антигены, сверхэкспрессированные клеточные антигены или вирусные антигены. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой "опухолеспецифический антиген" или "TSA", что относится к иммуногенной молекуле, такой как белок, которая является уникальной для опухолевой клетки. Опухолеспецифические антигены экспрессируются исключительно в опухолевых клетках, например, в специфическом типе опухолевых клеток.

В некоторых примерах конструкции CAR, раскрытые в данном документе, содержат внеклеточный домен scFv, способный связываться с CD19. В некоторых примерах конструкции CAR, раскрытые в данном документе, содержат внеклеточный домен scFv, способный связываться с BCMA. Примеры CAR к CD19 и CAR к BCMA представлены в примерах ниже.

**(b) Трансмембранный домен**

Полипептид CAR, раскрытый в данном документе, может содержать трансмембранный домен, который может представлять собой гидрофобную альфа-спираль, которая пронизывает мембрану. Используемый в данном документе термин "трансмембранный домен" относится к любой белковой структуре, которая является термодинамически стабильной в клеточной мембране, предпочтительно в мембране эукариотической клетки. Трансмембранный домен может обеспечивать стабильность CAR, содержащему его.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR, предусмотренный в данном документе, может представлять собой трансмембранный домен CD8. В других вариантах осуществления трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен CD28. В еще одних вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой химеру из трансмембранного домена CD8 и CD28. Можно применять другие трансмембранные домены, предусмотренные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8a, содержащий последовательность:

FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR (SEQ ID NO: 49) или

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY (SEQ ID NO: 31).

Также могут применяться другие трансмембранные домены.

(с) Шарнирный домен

В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен может быть расположен между внеклеточным доменом (содержащим антигенсвязывающий домен) и трансмембранным доменом CAR или между цитоплазматическим доменом и трансмембранным доменом CAR. Шарнирный домен может представлять собой любой олигопептид или полипептид, функции которого заключаются в связывании трансмембранного домена с внеклеточным доменом и/или цитоплазматическим доменом в полипептидной цепи. Функция шарнирного домена может заключаться в обеспечении гибкости CAR или его доменов или предотвращении стерических затруднений CAR или его доменов.

В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен может содержать не более 300 аминокислот (например, от 10 до 100 аминокислот или от 5 до 20 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления один или несколько шарнирных доменов могут быть включены в другие области CAR. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен может представлять собой шарнирный домен CD8. Можно применять другие шарнирные домены.

(d) Внутриклеточные сигнальные домены

Любая из конструкций CAR содержит один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов (например, CD3 $\zeta$  и необязательно один или несколько костимулирующих доменов), которые представляют собой функциональный конец рецептора. После распознавания антигена рецепторы образуют кластер и сигнал передается в клетку.

CD3 $\zeta$  представляет собой цитоплазматический сигнальный домен Т-клеточного рецепторного комплекса. CD3 $\zeta$  содержит три (3) иммунорецепторных активирующих мотива на основе тирозина (ITAM), которые передают сигнал активации Т-клетке после того, как Т-клетка взаимодействует с когнатным антигеном. Во многих случаях CD3 $\zeta$  обеспечивает первичный сигнал активации Т-клеток, но не полностью компетентный сигнал активации, которому требуется костимулирующая передача сигнала.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды CAR, раскрытые в данном документе, могут дополнительно содержать один или несколько костимулирующих сигнальных доменов. Например, костимулирующие домены CD28 и/или 4-1BB можно применять для передачи полного сигнала пролиферации/выживания вместе с первичной передачей сигнала, опосредованной CD3 $\zeta$ . В некоторых примерах CAR, раскрытый в данном документе, содержит костимулирующую молекулу CD28. В других примерах CAR, раскрытый в данном документе, содержит костимулирующую молекулу 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления CAR включает сигнальный домен CD3 $\zeta$  и костимулирующий домен CD28. В других вариантах осуществления CAR включает

сигнальный домен CD3 $\zeta$  и костимулирующий домен 4-1BB. В еще одних вариантах осуществления CAR включает сигнальный домен CD3 $\zeta$ , костимулирующий домен CD28 и костимулирующий домен 4-1BB.

Следует понимать, что способы, описанные в данном документе, охватывают более одного подходящего CAR, который можно применять для получения генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих CAR, например клеток, которые известны из уровня техники или раскрыты в данном документе. Примеры можно найти, например, в PCT/IB2018/001619, поданной 11 мая 2018 г., которая опубликована как WO 2019/097305A2, соответствующие раскрытия которой включены в данный документ посредством ссылки для цели и заявленного объекта, упомянутых в данном документе. В другом примере CAR связывает CD19 (также известен как "CD19 CAR" или "CAR к CD19"). Аминокислотная последовательность иллюстративного CAR, который связывает CD19, представлена под SEQ ID NO: 37 (см. пример 7 ниже, таблица 11). В еще одном примере CAR связывает BCMA (также известен как "BCMA CAR" или "CAR к BCMA"). Аминокислотная последовательность иллюстративного CAR, который связывается с BCMA, представлена под SEQ ID NO: 61 (см. пример 8 ниже, таблицы 16 и 17).

#### *Векторы на основе AAV для доставки конструкций CAR в Т-клетки*

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

Аденоассоциированные вирусы входят в число вирусов, наиболее часто используемых для генной терапии, по нескольким причинам. Во-первых, AAV не вызывают иммунного ответа при введении млекопитающим, включая людей. Во-вторых, AAV осуществляют эффективную доставку в целевые клетки, в частности, когда учитывается выбор подходящего серотипа AAV. Наконец, AAV обладают способностью инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, поскольку геном может сохраняться в клетке-хозяине без интеграции. Эта особенность делает их идеальным кандидатом для генной терапии.

Нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, может быть разработана для вставки в представляющий интерес геномный сайт в Т-клетках хозяина. В некоторых вариантах

осуществления целевой геномный сайт может находиться в локусе типа "safe harbor".

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR (например, за счет донорной матрицы, которую может переносить вирусный вектор, такой как вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV)), может быть разработана таким образом, что она может быть вставлена в местоположение в пределах гена TRAC для нарушения гена TRAC в генетически сконструированных Т-клетках и экспрессии полипептида CAR. Нарушение TRAC приводит к утрате функции эндогенного TCR. Например, нарушение в гене TRAC может быть создано с помощью эндонуклеазы, такой как описанная в данном документе, и одной или нескольких gRNA, нацеливающих на одну или несколько геномных областей TRAC. С этой целью можно применять любую из gRNA, специфических в отношении гена TRAC и целевых областей, например gRNA, раскрытые в данном документе.

В некоторых примерах геномная делеция в гене TRAC и замена кодирующим сегментом CAR могут быть созданы посредством репарации, направляемой гомологией, или HDR (например, с применением донорной матрицы, которая может представлять собой часть вирусного вектора, такого как вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV)). В некоторых примерах целевая последовательность gRNA или ее часть удалены (например, SEQ ID NO: 17). В некоторых вариантах осуществления нарушение в гене TRAC может быть создано с помощью эндонуклеазы, раскрытой в данном документе, и одной или нескольких gRNA, нацеливающих на одну или несколько геномных областей TRAC, и вставки сегмента, кодирующего CAR, в ген TRAC.

Донорная матрица, раскрытая в данном документе, может содержать кодирующую последовательность CAR. В некоторых примерах последовательность, кодирующая CAR, может быть фланкирована двумя областями гомологии для обеспечения эффективной HDR в представляющем интерес местоположении в геноме, например, в гене TRAC, с применением технологии геномного редактирования CRISPR-Cas9. В этом случае обе нити ДНК в целевом локусе могут быть разрезаны ферментом Cas9 CRISPR, направляемым с помощью gRNA, специфичных в отношении целевого локуса. Затем происходит HDR для репарации двухнитевого разрыва (DSB) и вставки донорной ДНК, кодирующей CAR. Для того, чтобы это происходило правильно, донорную последовательность разрабатывают с фланкирующими остатками, которые комплементарны последовательности, окружающей сайт DSB в целевом гене (далее "плечи гомологии"), таком как ген TRAC. Эти плечи гомологии служат матрицей для репарации DSB и позволяют HDR быть практически безошибочным механизмом. Скорость репарации, направляемой гомологией (HDR), зависит от расстояния между мутацией и сайтом разрезания, поэтому важно выбрать перекрывающиеся или близлежащие целевые сайты. Матрицы могут содержать дополнительные последовательности, фланкированные гомологичными областями, или могут содержать последовательность, которая отличается от геномной последовательности, таким образом обеспечивая редактирование последовательности.

В качестве альтернативы донорная матрица может не иметь областей гомологии с

целевым местоположением в ДНК и может быть интегрирована посредством NHEJ-зависимого соединения концов после расщепления в целевом сайте.

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

Донорную матрицу можно вводить в клетку как часть векторной молекулы, имеющей дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. Более того, донорную матрицу можно вводить в клетку в виде депротеинизированной нуклеиновой кислоты, в виде комплекса нуклеиновой кислоты со средством, таким как липосома или полуксамер, или можно доставлять вирусами (например, аденовирусом, AAV, вирусом герпеса, ретровирусом, лентивирусом и лентивирусом с дефектной интегразой (IDLV)).

В некоторых вариантах осуществления донорная матрица может вставляться в сайт рядом с эндогенным промотором (например, ниже или выше), так что ее экспрессией может управлять эндогенный промотор. В других вариантах осуществления донорная матрица может содержать экзогенный промотор и/или энхансер, например, конститутивный промотор, индуцируемый промотор или тканеспецифический промотор для контроля экспрессии гена CAR. В некоторых вариантах осуществления экзогенный промотор представляет собой промотор EF1 $\alpha$ . Можно применять другие промоторы.

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

#### *Трансфекция Т-клеток*

Подходящее количество любого из вирусных векторов, таких как вектор на основе AAV, который кодирует конструкцию CAR, раскрытую в данном документе (например, CAR к CD19 или CAR к BCMA), можно инкубировать с подходящим количеством Т-клеток, таких как генетически отредактированные Т-клетки, раскрытые в данном документе, в течение подходящего периода, чтобы обеспечить проникновение вирусного вектора в Т-клетки. Например, процесс трансдукции может предусматривать применение диапазона оптимизированной множественности заражения (MOI), который обеспечивает

повышение процентного содержания CAR<sup>+</sup> Т-клеток. В некоторых случаях МОИ вектора на основе AAV в процессе трансдукции может составлять от приблизительно 1000 до приблизительно 150000, как, например, от приблизительно 10000 до приблизительно 80000. В некоторых примерах МОИ вектора на основе AAV, применяемого в процессе трансдукции, может составлять от приблизительно 1000 до приблизительно 150000, от приблизительно 5000 до приблизительно 100000, от приблизительно 10000 до приблизительно 100000, от приблизительно 10000 до приблизительно 90000, от приблизительно 10000 до приблизительно 80000, от приблизительно 10000 до приблизительно 70000, от приблизительно 10000 до приблизительно 60000, от приблизительно 10000 до приблизительно 50000, от приблизительно 10000 до приблизительно 40000, от приблизительно 10000 до приблизительно 30000, от приблизительно 10000 до приблизительно 20000, от приблизительно 20000 до приблизительно 80000, от приблизительно 30000 до приблизительно 80000, от приблизительно 40000 до приблизительно 80000, от приблизительно 50000 до приблизительно 80000, от приблизительно 60000 до приблизительно 80000 или от приблизительно 70000 до приблизительно 80000. В некоторых примерах МОИ вектора на основе AAV, применяемого в процессе трансдукции, может составлять приблизительно 1000, приблизительно 2500, приблизительно 5000, приблизительно 10000, приблизительно 15000, приблизительно 20000, приблизительно 25000, приблизительно 30000, приблизительно 31000, приблизительно 32000, приблизительно 33000, приблизительно 34000, приблизительно 35000, приблизительно 40000, приблизительно 50000, приблизительно 60000, приблизительно 70000, приблизительно 80000, приблизительно 90000, приблизительно 100000, приблизительно 110000, приблизительно 120000, приблизительно 130000, приблизительно 140000 или приблизительно 150000.

В некоторых вариантах осуществления вектор на основе AAV кодирует CAR к CD19 (например, раскрытую в примере 7 ниже), и МОИ такого вектора на основе AAV для применения в процессе трансдукции составляет приблизительно 20000. В других вариантах осуществления вектор на основе AAV кодирует CAR к BCMA (например, раскрытую в примере 8 ниже), и МОИ такого вектора на основе AAV для применения в процессе трансдукции составляет приблизительно 20000.

После трансдукции Т-клетки можно культивировать в подходящей среде для культивирования клеток в течение подходящего периода для восстановления. Генетически сконструированные Т-клетки, имеющие нокауты по генам TRAC и B2M и экспрессирующие CAR, можно размножить *in vitro*, как описано ниже.

#### (v) *Размножение Т-клеток*

Генетически сконструированные Т-клетки, раскрытые в данном документе, можно размножить *in vitro* в подходящих условиях для получения популяции генетически сконструированных Т-клеток масштабе, соответствующем клиническому применению. Условия культивирования клеток, применяемые на этой стадии размножения, предназначены, по меньшей мере частично, для достижения более высоких показателей

конечной плотности клеток за более короткие периоды инкубации (за счет чего снижается стоимость производства) и более активных Т-клеток для применения в клеточной терапии. Об активности могут свидетельствовать различные функции Т-клеток, например, пролиферация, уничтожение целевых клеток, продукция цитокинов, активация, миграция и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления стадию размножения Т-клеток можно осуществлять путем высевания популяции Т-клеток (например, генетически сконструированных Т-клеток, раскрытых в данном документе) в сосуд для культивирования клеток при плотности высевания, составляющей от приблизительно 150000 клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно 600000 клеток/см<sup>2</sup>, в сосуд для клеток. Например, Т-клетки можно высевать в количестве от приблизительно 300000 клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно 500000 клеток/см<sup>2</sup> в сосуд для клеток. В некоторых аспектах размножение Т-клеток осуществляют путем высевания популяции Т-клеток в сосуд для культивирования клеток при плотности высевания, составляющей по меньшей мере приблизительно 60000 клеток/см<sup>2</sup>, по меньшей мере приблизительно 62500 клеток/см<sup>2</sup> или по меньшей мере приблизительно 83000 клеток/см<sup>2</sup>. В некоторых аспектах размножение Т-клеток осуществляют путем высевания популяции Т-клеток в сосуд для культивирования клеток при плотности высевания, составляющей по меньшей мере приблизительно 150000 клеток/см<sup>2</sup>, по меньшей мере приблизительно 250000 клеток/см<sup>2</sup> или по меньшей мере приблизительно 300000 клеток/см<sup>2</sup>, или по меньшей мере приблизительно 400000 клеток/см<sup>2</sup>, или по меньшей мере приблизительно 500000 клеток/см<sup>2</sup>, или по меньшей мере приблизительно 600000 клеток/см<sup>2</sup>. В некоторых аспектах плотность высевания составляет приблизительно 250000 клеток/см<sup>2</sup>. В других аспектах плотность высевания составляет приблизительно 500000 клеток/см<sup>2</sup>. В других аспектах плотность высевания составляет приблизительно 600000 клеток/см<sup>2</sup>.

В некоторых вариантах осуществления стадию размножения Т-клеток можно осуществлять путем высевания популяции Т-клеток (например, генетически сконструированных Т-клеток, раскрытых в данном документе) в сосуд для культивирования клеток при плотности высевания, составляющей от приблизительно  $2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно  $7 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, и культивирования клеток в течение от приблизительно 6 дней до приблизительно 12 дней. В некоторых примерах размножение Т-клеток осуществляют путем высевания популяции Т-клеток в сосуд для культивирования клеток при плотности высевания, составляющей от приблизительно  $2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно  $7 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, от приблизительно  $2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, от приблизительно  $2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно  $4 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, от  $2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно  $3 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, от  $3 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> или от  $4 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, и культивирования клеток в течение от приблизительно 6 дней до приблизительно 12 дней, от приблизительно 6 дней до приблизительно 11 дней, от приблизительно 6 дней до приблизительно 10 дней, от

приблизительно 6 дней до приблизительно 9 дней, от приблизительно 6 дней до приблизительно 8 дней, от приблизительно 6 дней до приблизительно 7 дней, от приблизительно 7 дней до приблизительно 12 дней, от приблизительно 7 дней до приблизительно 11 дней, от приблизительно 7 дней до приблизительно 10 дней, от приблизительно 7 дней до приблизительно 9 дней, от приблизительно 7 дней до приблизительно 8 дней, от приблизительно 8 дней до приблизительно 12 дней, от приблизительно 8 дней до приблизительно 9 дней, от приблизительно 9 дней до приблизительно 12 дней, от приблизительно 10 дней до приблизительно 12 дней или от приблизительно 11 дней до приблизительно 12 дней. В некоторых вариантах осуществления размножение Т-клеток осуществляют путем высевания популяции Т-клеток в сосуд для культивирования клеток при плотности высевания, составляющей от приблизительно  $3 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, и культивирования клеток в течение от приблизительно 7 дней до приблизительно 9 дней.

В некоторых вариантах осуществления стадия размножения Т-клеток может включать пересев клеточной культуры (т. е. разделение клеточной культуры по новым сосудам для культивирования). В некоторых вариантах осуществления клеточную культуру можно пересевать в день 3, 4, 5, 6 или 7 после редактирования при отношении 1:4 (1 сосуд разделяют на 4 новых сосуда) для дополнительного размножения.

Размножение Т-клеток можно осуществлять в сосуде для статического культивирования, что обеспечивает размножение Т-клеток без замены среды. Например, Т-клетки можно размножать в сосуде для статического культивирования в течение от приблизительно 7 дней до приблизительно 12 дней или от приблизительно 7 дней до приблизительно 9 дней без замены среды.

*(vi) Деплеция TCR $\alpha\beta^+$  Т-клеток*

В некоторых вариантах осуществления TCR $\alpha\beta^+$  Т-клетки можно подвергать деплеции из размноженной популяции Т-клеток, раскрытой в данном документе, для получения популяции аллогенных Т-клеток, предназначенных для применения в клеточной терапии. Используемый в данном документе термин "деплеция TCR $\alpha\beta^+$  Т-клеток" относится к осуществлению деплеции TCR $\alpha\beta^+$  Т-клеток из популяции клеток, содержащей их. После деплеции TCR $\alpha\beta^+$  Т-клеток полученная популяция Т-клеток может характеризоваться очень низким уровнем TCR $\alpha\beta^+$  Т-клеток (например, менее 3% от общей популяции клеток или менее 2%, менее 1% или менее 0,5% от общей популяции клеток). В некоторых примерах полученная популяция Т-клеток может не содержать TCR $\alpha\beta^+$  Т-клетки, т. е. присутствие TCR $\alpha\beta^+$  Т-клеток невозможно определить за счет стандартного метода (например, в иммунном анализе с применением антитела, связывающегося с TCR $\alpha\beta^+$  или с помощью проточной цитометрии).

Деплецию TCR $\alpha\beta^+$  Т-клеток можно осуществлять с применением средства, которое распознает TCR $\alpha\beta^+$  Т-клетки, для захвата TCR $\alpha\beta^+$  Т-клеток, за счет чего их отделяют от клеток, не содержащих TCR $\alpha\beta^+$ , например, путем осуществления магнитного разделения клеток. Такие способы можно проводить путем приведения размноженных Т-клеток,

раскрытых выше, в контакт с гранулами, на которых иммобилизованы антитела к TCR $\alpha\beta$ , и сбора несвязавшихся клеток. Собранные таким образом несвязавшиеся клетки (клетки, не содержащие TCR $\alpha\beta^+$ ) вначале можно культивировать для обеспечения восстановления клеток, например, несвязавшиеся клетки можно культивировать на протяжении ночи для обеспечения восстановления клеток.

**(vii) Сбор генетически сконструированных T-клеток**

Генетически сконструированные T-клетки, полученные с помощью любого из способов, раскрытых в данном документе, затем можно собирать для путей применения в качестве терапевтических средств с помощью стандартных способов, известных из уровня техники. Например, сбор генетически сконструированных T-клеток может предусматривать сбор клеток, которые были подвергнуты деплеции по TCR $\alpha\beta^+$ . Собранную популяцию генетически сконструированных T-клеток можно применять в качестве лекарственной субстанции. Используемая в данном документе "лекарственная субстанция" относится к популяции генетически модифицированных T-клеток, которую можно вводить пациентам. Лекарственную субстанцию можно составлять для путей применения в качестве терапевтического средства, например, составлять в среде для хранения (например, CryoStor CS5) и подвергать криоконсервации для применения в дальнейшем.

Лекарственную субстанцию можно проверять на наличие одного или нескольких контаминантов, например, микоплазмы, вирусов человека (например, HIV, HBV, HCV, CMV) и бактериальных эндотоксинов. В качестве альтернативы или в дополнение к этому лекарственную субстанцию можно проверять на стерильность. Не содержащую контаминантов лекарственную субстанцию можно разделять на индивидуальные дозы для пациента. В качестве альтернативы или в дополнение к этому не содержащую контаминантов лекарственную субстанцию можно хранить для применения в качестве терапевтического средства.

Соответственно, в аспектах настоящего изобретения представлена популяция генетически сконструированных T-клеток (лекарственная субстанция). Популяция генетически сконструированных T-клеток имеет нарушенный ген TRAC, нарушенный ген  $\beta 2M$  и нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, например, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает антиген, экспрессируемый на патологической клетке. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает CD19. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает BCMA.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% популяции генетически модифицированных T-клеток, полученных с помощью способов, описанных в данном документе, экспрессируют CAR. В других аспектах эти экспрессирующие CAR клетки дополнительно не экспрессируют поверхностный TCR на обнаруживаемом уровне и/или поверхностный  $\beta 2M$  на обнаруживаемом уровне.

В других вариантах осуществления, в которых по меньшей мере 30% популяции генетически сконструированных Т-клеток, полученных с помощью способов, описанных в данном документе, экспрессируют CAR, такая популяция клеток содержит не более приблизительно 1,0%, не более приблизительно 0,5%, не более приблизительно 0,4% или не более приблизительно 0,15% Т-клеток, которые экспрессируют поверхностный TCR (например, TCR $\alpha/\beta^+$  клетки).

В других вариантах осуществления, в которых по меньшей мере 30% популяции генетически сконструированных Т-клеток, полученных с помощью способов, описанных в данном документе, экспрессируют CAR, такая популяция клеток содержит не более приблизительно 50%, не более приблизительно 40% или не более приблизительно 30% Т-клеток, которые экспрессируют поверхностный  $\beta 2M$ .

Также в объем настоящего изобретения входит популяция генетически сконструированных Т-клеток, полученная с помощью способов, описанных в данном документе, при этом клетки содержат фермент Cas9, gRNA, нацеливающуюся на ген TRAC, gRNA, нацеливающуюся на ген  $\beta 2M$ , и вектор AAV, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR (например, CAR к CD19 или CAR к BCMA).

## **II. Варианты терапевтического применения**

Популяцию генетически сконструированных Т-клеток, полученную с помощью способов, описанных в данном документе, можно вводить субъекту в терапевтических целях, например, для лечения рака, на который нацелена конструкция CAR, экспрессируемая в популяции генетически сконструированных Т-клеток.

Субъектом может быть любой субъект, которому требуется постановка диагноза, лечение или терапия. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком.

Неограничивающие примеры видов рака, которые можно лечить с применением популяции генетически сконструированных Т-клеток, полученной с помощью способов, описанных в данном документе, включают без ограничения множественную миелому, лейкоз (например, Т-клеточный лейкоз, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (B-ALL) и/или хронический лимфоцитарный лейкоз (С-CLL)), лимфому (например, В-клеточную неходжкинскую лимфому (B-NHL), лимфому Ходжкина и/или Т-клеточную лимфому) и/или светлоклеточную почечно-клеточную карциному (ccRCC), рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичников, рак шейки матки, рак молочной железы, рак почки, рак щитовидной железы, рак носоглотки, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), глиобластому и/или меланому.

Введение может включать введение (например, трансплантацию) популяции генетически сконструированных Т-клеток субъекту с помощью способа или пути, которые приводят к по меньшей мере частичной локализации популяции генетически сконструированных Т-клеток в требуемом сайте, таком как очаг опухоли, так что может(-гут) обеспечиваться требуемый(-ые) эффект(-ы). Популяцию генетически

сконструированных Т-клеток можно вводить любым подходящим путем, который приводит к доставке в требуемое местоположение в организме субъекта, где по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остаются жизнеспособными. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может составлять от всего нескольких часов, например, двадцати четырех часов, до нескольких дней, вплоть до нескольких лет или даже всей продолжительности жизни субъекта, т. е. при долговременном приживлении. Например, в некоторых аспектах, описанных в данном документе, эффективное количество популяции генетически сконструированных Т-клеток можно вводить за счет системного пути введения, такого как внутрибрюшинный или внутривенный путь.

В некоторых вариантах осуществления популяцию генетически сконструированных Т-клеток вводят системным путем, что относится к введению популяции клеток не непосредственно в целевой сайт, ткань или орган, а таким образом, что вместо этого они попадают в кровеносную систему субъекта и, следовательно, подвергаются метаболизму и другим подобным процессам. Подходящие способы введения включают инъекцию, инфузию, введение по каплям или проглатывание. Инъекция включает без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, внутрикапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, внутриспинномозговую и внутригрудинную инъекцию и инфузию. В некоторых вариантах осуществления путь является внутривенным.

Эффективное количество относится к количеству популяции генетически сконструированных Т-клеток, необходимому для предупреждения или облегчения по меньшей мере одного или нескольких признаков или симптомов медицинского состояния (например, рака), и относится к количеству популяции генетически сконструированных Т-клеток, достаточному для обеспечения требуемого эффекта, например, для лечения субъекта, у которого имеется медицинское состояние. Эффективное количество также включает количество, достаточное для предупреждения или задержки развития симптома заболевания, изменения хода развития симптома заболевания (например, без ограничения, замедления прогрессирования симптома заболевания) или устранения симптома заболевания. Понятно, что для любого данного случая подходящее эффективное количество может быть определено специалистом средней квалификации в данной области техники с применением стандартных экспериментов.

Эффективное количество популяции генетически сконструированных Т-клеток может составлять по меньшей мере  $10^2$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^2$  клеток, по меньшей мере  $10^3$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^3$  клеток, по меньшей мере  $10^4$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^4$  клеток, по меньшей мере  $10^5$  клеток, по меньшей мере  $2 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $3 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $4 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере

$5 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $6 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $7 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $8 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $9 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $2 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $3 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $4 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $6 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $7 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $8 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $9 \times 10^6$  клеток или величину, кратную этим значениям.

Эффективность лечения с применением популяции генетически сконструированных Т-клеток, произведенной, как описано в данном документе, может определять специалист средней квалификации в данной области техники. Лечение считается "эффективным", если любой или все признаки или симптомы, в качестве лишь одного примера представляющие собой уровни функциональной мишени, изменяются благоприятным образом (например, повышаются на по меньшей мере 10%), или происходит уменьшение или облегчение тяжести других признанных клинических симптомов или маркеров заболевания (например, рака). Эффективность также можно измерить по отсутствию ухудшения состояния субъекта, что оценивается по госпитализации или необходимости в медицинских вмешательствах (например, прогрессирование заболевания останавливается или по меньшей мере замедляется). Способы измерения этих показателей известны специалистам в данной области техники и/или описаны в данном документе. Лечение предусматривает любое лечение заболевания у субъекта и включает: (1) приостановку заболевания, например остановку или замедление прогрессирования симптомов; или (2) снижение степени проявления заболевания, например устранение симптомов; и (3) предупреждение или снижение вероятности развития симптомов.

Популяции генетически сконструированных Т-клеток, произведенные, как описано в данном документе, также можно применять в комбинированных видах терапии. Например, популяцию генетически сконструированных Т-клеток, произведенную, как описано в данном документе, можно применять совместно с другими терапевтическими средствами для лечения того же показания или для повышения эффективности популяции генетически сконструированных Т-клеток и/или снижения побочных эффектов популяции генетически сконструированных Т-клеток.

#### ***Общие методики***

При осуществлении настоящего изобретения на практике, если не указано иное, будут использоваться стандартные методики молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Такие методики полностью объяснены в литературе, такой как *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, второе издание (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed. 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and

P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds. 1993-8) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al. eds. 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, et al., eds. 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practice approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995); DNA Cloning: A practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds.(1985; Transcription and Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1986; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, (1986; и B. Perbal, A practical Guide To Molecular Cloning (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.).

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

#### **ПРИМЕРЫ**

Для более полного понимания описанного изобретения приведены следующие примеры. Примеры, описанные в настоящей заявке, предоставлены для иллюстрации способов и композиций, представленных в данном документе, и никоим образом не должны быть истолкованы как ограничивающие его объем.

#### **ПРИМЕР 1. Идентификация оптимизированных условий для обогащения Т-клеток**

В этом примере сообщается об идентификации оптимизированных условий для обогащения Т-клеток с применением автоматизированной системы обработки клеток для обогащения CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток из Лейкопаков.

#### **МЕТОДЫ**

##### *Подготовка Лейкопака и буфера*

Лейкопаки человека получали от NemaCare или Stem Express и обрабатывали для обогащения Т-клеток. Буфер PBS/EDTA (забуференный фосфатом солевой раствор, pH 7,2, дополненный с помощью 1 mM EDTA) дополняли 0,5% человеческого сывороточного альбумина (HSA), и его применяли для обработки, примирования, промывки и

элюирования во время отбора Т-клеток.

Доноров для получения Лейкопака подвергали скринингу в отношении следующего:

- поверхностный антиген гепатита В (EIA на HBsAg);
- антитело к вирусу гепатита С (EIA на HCV);
- антитело к вирусу иммунодефицита человека (HIV 1/2 плюс O);
- антитело к Т-лимфотропному вирусу человека (HTLV-I/II);
- тестирование на нуклеиновые кислоты HIV-1/HCV/HBV;
- тестирование на нуклеиновую кислоту WNV;
- антитело к *Toxoplasma cruzi* (избирательное тестирование на болезнь Шагаса, один тест на протяжении жизни для каждого донора);
- HIV/HBV/HCV;
- CMV.

Доноров, у которых выявили положительные результаты по любому из вышеперечисленных тестов, исключали. Демографические сведения о донорах, которых использовали в примерах, раскрытых в данном документе, показаны в **таблице 1**.

**Таблица 1.** Демографические и гематологические параметры доноров. Все доноры были мужского пола.

Партия	Поставщик	ID донора-источника	Возраст	Вес донора (фунты)	ВМІ	Этническая принадлежность	АВО/Rh	Объем продукта (мл)	WBC ( $\times 10^9$ )	Лимфоциты, %
1	НемаCare	D327083	26	144	19,0	Испаноамериканец	О-ПОЛ	279	9,77	79
2	НемаCare	141402	29	160	22,9	Европеоид	А-ПОЛ	302	13,59	75,9
3	НемаCare	141121	26	154	24,8	Испаноамериканец	О-ПОЛ	250	8,75	74,7
4	НемаCare	136723	20	130	20,9	Европеоид	А-ПОЛ	305	12,81	70,1
5	НемаCare	D64140	28	272	42,6	Испаноамериканец	А-ПОЛ	339	21,36	81,1

6	Stem Express	D001003 864	33	176	24,0	Европеоид	А-ПОЛ	140	8,14	70,9
7	НемаCare	141722	20	135	19,9	Испаноязычный	О-ПОЛ	308	13,24	78,5
8	НемаCare	D327737	36	200	26,4	Афроамериканец	В-ПОЛ	310	14,57	81,3
9	НемаCare	D326737	31	225	29,7	Афроамериканец	АВ-ПОЛ	314	10,99	77,9

#### *Гематологический анализ Лейкопак с помощью Sysmex*

Образцы из поступающих Лейкопак обрабатывали для гематологического анализа с помощью Sysmex XP300 (Sysmex, серийный №: B0628) в соответствии с инструкциями производителя. Подсчет лейкоцитов (WBC) применяли для расчета общей клеточной массы, загруженной в автоматизированную систему обработки клеток.

#### *Обогащение T-клеток*

Буфер для обработки, Лейкопак, микрогранулы для CD4 и микрогранулы для CD8 загружали в автоматизированную систему обработки клеток перед началом цикла. Клетки промывали и метили в камере и направляли в магнитную колонку для разделения. CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T-клетки захватывали и далее элюировали в целевой пакет в буфере для обработки.

#### *Подсчет и оценка жизнеспособности клеток*

Подсчет и оценку жизнеспособности клеток осуществляли с помощью COUNTESS<sup>®</sup> II (Life Technologies, №: по кат. AMQAX1000) с использованием профиля по умолчанию. Клетки (20 мкл) смешивали с трипановым синим (20 мкл) путем пипетирования несколько раз в направлении вверх и вниз без введения пузырьков. Смесь клеток/трипанового синего (10 мкл) загружали на предметные стекла камеры для подсчета клеток COUNTESS<sup>®</sup> II.

#### *Проточная цитометрия*

Приблизительно  $1 \times 10^6$  общих ядерных клеток блокировали с помощью 5 мкл Human TruStain FcX<sup>™</sup> в 95 мкл буфера для окрашивания (0,5% бычьего сывороточного альбумина (BSA)/DPBS)) при комнатной температуре (RT) в течение 10 минут. Далее клетки инкубировали с конъюгированным с Pacific blue антителом к CD45 человека (1:50), конъюгированным с BV510 антителом к CD3 человека (1:50), конъюгированным с APC-Cy7 антителом к CD4 человека (1:50), конъюгированным с PE-Cy7 антителом к CD8 человека (1:50), конъюгированным с APC антителом к CD19 человека (1:50), конъюгированным с FITC антителом к CD56 человека (1:50) и конъюгированным с PE антителом к CD33 человека (1:50) при 4°C в течение 30 минут. Затем на каждый образец наносили 1 мл лизирующего буфера на основе аммония-хлорида-калия (АСК), содержащего 5 мкл раствора 7-амино-актиномицина D (7-AAD) для окрашивания при оценке жизнеспособности. После инкубации с лизирующим АСК-буфером при комнатной температуре в течение 10 минут информацию о клетках получали с помощью проточного

цитометра NovoCyte-3000.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

*Лейкоциты (WBC) в образцах Лейкопак*

WBC для протестированных Лейкопак находится в диапазоне от  $8,14 \times 10^9$  до  $21,36 \times 10^9$  клеток, при этом число лимфоцитов находилось в диапазоне от  $5,77 \times 10^9$  до  $17,32 \times 10^9$ .

*Обогащение по CD4 и CD8 - чистота, жизнеспособность, извлечение и выход клеток*

Среди 9 протестированных партий четыре оценивали с помощью программы А, а пять оценивали с помощью программы В. Все партии приводили к выходу Т-клеток с чистотой >90% и жизнеспособностью >90% (таблица 2). Извлечение клеток по программе А составляло 31%, тогда как извлечение клеток по программе В составляло 55,69%.

**Таблица 2. Результаты обогащения по CD4 и CD8**

Партия	Программа	Лейкопак, % CD3	Нецелевые клетки, % CD3	Целевая клетка			
				Число клеток ( $\times 10^9$ )	% CD3	Жизнеспособ ность (%)	Извлече ние (%)
1	А	73,20	50,80	1,32	96,20	96,50	29,24
2		72,30	60,40	2,76	96,30	93,50	27,00
3		64,90	46,00	2,32	96,80	95,00	39,15
4		63,50	55,00	2,59	89,70	94,00	30,77
<b>Среднее (А)</b>		<b>68,48</b>	<b>53,05</b>	<b>2,25</b>	<b>94,75</b>	<b>94,75</b>	<b>31,54</b>
5	В	70,30	15,70	6,00	94,50	93,00	39,75
6		56,00	3,17	2,14	92,80	96,00	47,10
7		69,00	16,80	4,68	96,60	93,00	49,10
8		59,40	15,20	6,82	92,60	96,00	75,87
9		55,50	11,20	3,88	93,60	98,00	61,65
<b>Среднее (В)</b>		<b>62,04</b>	<b>12,41</b>	<b>4,70</b>	<b>94,02</b>	<b>95,20</b>	<b>54,69</b>

В совокупности эти результаты демонстрируют, что Т-клетки из Лейкопак здоровых доноров (HD) обогащались по CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеткам с высокой чистотой (>90%) и высокой жизнеспособностью (>90%).

### **ПРИМЕР 2. Идентификация оптимизированных условий для активации Т-клеток**

В этом примере сообщается об идентификации оптимизированных условий для активации Т-клеток с применением коллоидной полимерной наноматрицы, конъюгированной с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28.

*Идентификация оптимизированных условий для активации Т-клеток в сосуде для*

*статического культивирования*

Вкратце, криоконсервированные Т-клетки из Лейкопаков здоровых доноров размораживали и активировали с помощью рекомбинантных гуманизированных агонистов CD3 и CD28, конъюгированных с полимерной наноматрицей, в течение 48 часов в Т-колбе в качестве контроля или сосуде для статического культивирования. Активацию Т-клеток оценивали путем отслеживания поверхностной экспрессии маркеров активации клеток CD25 и CD69 и путем отслеживания пролиферации клеток. В случае активации в сосудах для статического культивирования тестировали различные условия активации Т-клеток, в том числе плотность высевания клеток, объем среды и рекомбинантные гуманизированные агонисты CD3 и CD28, конъюгированные с полимерной наноматрицей ("агонисты CD3/CD28") (таблица 3). Активацию Т-клеток оценивали путем отслеживания поверхностной экспрессии маркеров активации клеток CD25 и CD69 и путем отслеживания пролиферации клеток. Активацию Т-клеток в Т-колбе применяли в качестве положительного контроля (РС) (таблица 3).

**Таблица 3. Тестируемые условия активации Т-клеток**

Условие	Сосуд	Число клеток на см <sup>2</sup>	Объем среды (мл)	Плотность клеток на мл	Агонисты CD3/CD28 (мкл на 1 × 10 <sup>6</sup> клеток)	Отношение агонистов CD3/CD28 к среде
1	Сосуд для статического культивирования	1,00×10 <sup>7</sup>	8	2,50×10 <sup>6</sup>	40	1:10
2		1,00×10 <sup>7</sup>	4	5,00×10 <sup>6</sup>	40	1:5
3		1,00×10 <sup>7</sup>	2	1,00×10 <sup>7</sup>	40	1:2,5
4		1,00×10 <sup>7</sup>	4	5,00×10 <sup>6</sup>	8	1:25
5		1,00×10 <sup>7</sup>	2	1,00×10 <sup>7</sup>	4	1:25
6		2,00×10 <sup>6</sup>	4	1,00×10 <sup>6</sup>	40	1:25
7		2,00×10 <sup>6</sup>	2	2,00×10 <sup>6</sup>	40	1:12,5
8		2,00×10 <sup>6</sup>	2	2,00×10 <sup>6</sup>	20	1:12,5
Положительный контроль (РС)	Т-колба		10	1,00×10 <sup>6</sup>	40	1:25

Как показано на **фиг. 1А**, процентная доля клеток, экспрессирующих CD25 и CD69, была одинаковой среди протестированных условий. Немного более многочисленную (~ на 10% выше) популяцию CD69<sup>+</sup> клеток и CD25+CD69<sup>+</sup> клеток наблюдали при условии 3 (**фиг. 1А**).

Однако скорость размножения клеток не коррелировала с уровнем экспрессии CD69, а скорее коррелировала с уровнем экспрессии CD25, измеренным по средней

интенсивности флуоресценции (MFI) CD25 (фиг. 1B). Среди протестированных условий условие 7 характеризовалось наиболее подобной корреляцией между MFI CD25 и размножением клеток при сравнении с положительным контролем (фиг. 1B). CD25 и CD69 представляют собой маркеры активации Т-клеток, при этом раннее повышение экспрессии и позднее повышение экспрессии коррелируют со статусом активации.

В целом, эти результаты демонстрируют, что условие 7 из **таблицы 3** приводило к наилучшему эффекту активации Т-клеток (условие 7:  $2,00 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>;  $2,00 \times 10^6$  клеток/мл; 40 мкл коллоидной полимерной наноматрицы, конъюгированной с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28/1  $\times 10^6$  клеток; и отношение коллоидной полимерной наноматрицы, конъюгированной с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28, к среде составляет 1:12,5) в сосуде для статического культивирования.

*Валидация необязательных условий активации Т-клеток при мелкомасштабном производственном процессе*

Следующим шагом идентифицированные условия активации Т-клеток (условие 7:  $2,00 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>;  $2,00 \times 10^6$  клеток/мл; 40 мкл коллоидной полимерной наноматрицы, конъюгированной с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28/1  $\times 10^6$  клеток; и отношение коллоидной полимерной наноматрицы, конъюгированной с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28, к среде составляет 1:12,5), тестировали в мелкомасштабном производственном процессе (в сосуде для статического культивирования), и активированные Т-клетки исследовали в отношении эффективности их генного редактирования по критерию экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), нокаута константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC) и/или нокаута бета-2-микроглобулина ( $\beta 2M$ ). Активацию и редактирование Т-клеток в Т-колбе (Колба) сравнивали с таковыми в сосуде для статического культивирования клеток (Сосуд). Подвергнутые электропорации TRAC и  $\beta 2M$  Т-клетки (EP) и необработанные Т-клетки (UT) применяли в качестве контроля.

#### Мелкомасштабный производственный процесс

Флаконы для криоконсервации извлекали из хранилища с жидким азотом и размораживали на водяной бане до тех пор, пока не оставалось небольшое количество замороженного материала. Затем клетки добавляли по каплям к 10X объему полной ростовой среды (X-VIVO™ 15 (Lonza), 5% человеческой сыворотки крови АВ, 100 ЕД/мл IL2, 100 ЕД/мл IL7) и осаждали центрифугированием при 300g в течение 10 минут при комнатной температуре. Клетки ресуспендировали до концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл и подвергали активации, опосредованной коллоидной полимерной наноматрицей, конъюгированной с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28, что улучшало последующую модификацию. Вкратце, выделенные Т-клетки активировали с помощью рекомбинантных CD3 и CD28, ковалентно прикрепленных к коллоидной полимерной наноматрице. Коллоидную полимерную наноматрицу, конъюгированную с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28, наносили на клетки при

отношении 1:25 или в количестве 40 мкл для  $1 \times 10^6$  клеток в необработанном флаконе. Клетки выдерживали в коллоидной полимерной наноматрице, конъюгированной с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28, в течение 2 суток в инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 часов. После инкубации клетки центрифугировали при 300g в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем клеточный осадок ресуспендировали в полной ростовой среде и культивировали на протяжении ночи при концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл перед генной модификацией.

После культивирования на протяжении ночи в полной среде без коллоидной полимерной наноматрицы, конъюгированной с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28, общее число клеток и жизнеспособность клеток определяли количественно путем добавления трипанового синего и подсчета на цитометре COUNTESS<sup>®</sup>. Затем клетки центрифугировали при 300g в течение 10 минут при комнатной температуре. Клеточные осадки промывали в 10 мл буфера для электропорации и снова центрифугировали. Во время центрифугирования клеток готовили рибонуклеопротеиновые (RNP) комплексы. Проводили образование двух отдельных RNP-комплексов. Проводили образование одного RNP, содержащего sgRNA для B2M и Cas9 в концентрациях, составляющих 150 мкг/мл и 150 мкг/мл соответственно. Проводили образование другого RNP, содержащего sgRNA и Cas9 в концентрациях, составляющих 150 мкг/мл и 150 мкг/мл соответственно. Образование RNP-комплексов, содержащие sgRNA и Cas9, проводили путем инкубации при комнатной температуре в течение 10 минут. Проводили образование одного RNP-комплекса, содержащего Cas9 (Cas9; SEQ ID NO: 1) и gRNA, нацеливающуюся на ген  $\beta$ 2M (B2M-1; SEQ ID NO: 6), и проводили образование другого RNP-комплекса, содержащего Cas9 (Cas9; SEQ ID NO: 1) и gRNA, нацеливающуюся на ген TCR (TA-1; SEQ ID NO: 2). После центрифугирования клеточные осадки ресуспендировали в буфере для электропорации до концентрации  $400 \times 10^6$  клеток/мл. С помощью полученной клеточной суспензии получали дополнительные разведения с конечными концентрациями клеток, составляющими  $300 \times 10^6$  клеток/мл,  $200 \times 10^6$  клеток/мл,  $150 \times 10^6$  клеток/мл и  $100 \times 10^6$  клеток/мл. Отдельные RNP-комплексы объединяли и переносили пипеткой в кюветы для электропорации. Клетки при различных концентрациях добавляли к RNP-комплексам и пипетировали в направлении вверх и вниз 5 раз.

Клетки подвергали электропорации с применением системы для трансфекции на основе проточной электропорации. После проведения электропорации в каждой отдельной кювете аликвоты раствора клеток и RNP распределяли в необработанный 12-луночный планшет, при этом каждая лунка содержала 500 мкл среды X-VIVO<sup>™</sup> 15 (без человеческой сыворотки крови AB, IL2 и IL7). Клетки оставляли постоять в инкубаторе в течение 20 минут. Общее число клеток и жизнеспособность клеток определяли количественно путем добавления трипанового синего и подсчета на цитометре COUNTESS<sup>®</sup> или NC-200.

Исходя из общего числа клеток после отстаивания, может потребоваться

дополнительное разведение клеток с помощью X-VIVO™ 15 (без человеческой сыворотки крови АВ, IL2 или IL7) для достижения требуемой концентрации. Общее число клеток необходимо для расчета объема AAV, необходимого для осуществления трансдукции.

$$\text{необходимое количество мкл AAV} = \frac{(\text{общее число клеток}) (\text{требуемая MOI (т. е. 20000)}) / (\text{vgs вируса/мл (т. е. } 1,5 \times 10^{13}))}{1}$$

AAV и клеточную суспензию смешивали и оставляли инкубироваться в необработанной колбе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 1 часа. Все содержимое, включая AAV, добавляли в сосуд для статического культивирования, содержащий 100 мл полной среды. Сосуд для статического культивирования инкубировали в течение 3 дней для обеспечения размножения клеток.

После электропорации в каждую лунку сосуда для статического культивирования заполняли 100 мл полной ростовой среды. Подвергнутые генной модификации клетки высевали при концентрации, составляющей от  $5 \times 10^5$  клеток/мл до  $1 \times 10^6$  клеток/мл в полной ростовой среде. IL2 или IL7 восполняли один раз в три-четыре дня до конечной рабочей концентрации 100 ЕД/мл. Общее число клеток определяли количественно один раз в три-четыре дня путем добавления трипанового синего и подсчета на цитометре COUNTESS®. Клетки поддерживали в культуре в течение девяти-двенадцати дней после электропорации для достижения максимального общего числа клеток, исходя из концентрации насыщения, составляющей  $30 \times 10^6$  клеток/мл. Как только клетки достигали этого порогового значения, проводили деплецию любых оставшихся неотредактированными клеток, которые экспрессировали TCR-альфа или бета, для удаления этих клеточных примесей.

Во время фазы размножения в сосуде для статического культивирования клетки могут достигать фазы плато, при этом достигается максимальное число клеток в сосуде для статического культивирования. На этой стадии общая клеточная популяция содержала клетки, экспрессирующие TCR-альфа и бета, на уровне 6% или меньше. Положительные по TCR-альфа и бета клетки можно подвергать деплеции из популяции, поскольку они могут содействовать реакции "трансплантат против хозяина". В сосуде для статического культивирования осуществляли уменьшение объема с удалением 90% объема, при этом оставшиеся 10% объема содержали клетки. Клетки загружали в пакет для переливания, который стерильным образом приваривали к комплекту трубочек, применяемому для осуществления деплеции. Положительные по TCR-альфа и бета клетки удаляли из основной популяции с применением набора для деплеции TCR-альфа-бета, содержащего конъюгированное с биотином антитело к TCR-альфа-бета, которое может захватываться гранулами с антителами к биотину. Клетки, подвергнутые деплеции в отношении положительных по TCR-альфа-бета клеткам, элюировали в целевой пакет и переносили обратно в сосуд для статического культивирования и культивировали в течение еще одного дня. Затем клетки подвергали криоконсервации в CS5 и хранили при -145°C.

Клетки, свежие из культуры или размороженные из криопробирок, промывали в

буфере для окрашивания и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут. В качестве отрицательного контроля  $1 \times 10^6$  клеток инкубировали с антителами Fab-биотин или IgG-биотин. Клетки промывали буфером для окрашивания и инкубировали с мышинным антителом к IgG для захвата избытка первичных антител. Клетки снова промывали и инкубировали с полной панелью вторичных антител (CD45, CD5, CD4, CD8, B2M, TCR, стрептавидин-APC) и красителем для оценки жизнеспособности. Клетки промывали последний раз буфером для окрашивания и анализировали на проточном цитометре с захватом различных окрашенных популяций.

Проточную цитометрию применяли для количественного определения различных популяций, присутствующих в образцах технологического процесса, а также в криоконсервированном продукте. Стратегию гейтирования, описанную в данном документе, применяли для разграничения субпопуляций. Вкратце, применяемая стратегия основана на первоначальном гейтировании популяции лимфоцитов, отборе популяций синглетных клеток и гейтировании CD45<sup>+</sup> или CD5<sup>+</sup> популяций. Эффективность редактирования определяли путем визуализации клеток, окрашиваемых как B2M<sup>+</sup> и TRAC<sup>+</sup>, в виде доли от исходной CD45<sup>+</sup> или CD5<sup>+</sup> популяции. Подобным образом, соотношения CD4 и CD8 субпопуляций наносили на график в виде доли от CD45<sup>+</sup> или CD5<sup>+</sup> популяции. Изотипические контроли применяли для гейтирования по экспрессии CAR<sup>+</sup> в канале APC.

#### Результаты

В мелкомасштабном производственном процессе, раскрытом в данном документе, Т-клетки активировали в сосуде для статического культивирования и в Т-колбе при одинаковых условиях активации (условие 7), а затем полученные активированные Т-клетки подвергали электропорации в присутствии двух рибонуклеопротеиновых (RNP) комплексов с применением системы для трансфекции на основе проточной электропорации. После электропорации клетки трансдуцировали вектором на основе гAAV для экспрессии CAR к CD19 (CAR к CD19; SEQ ID NO: 53) при множественности заражения (MOI), составляющей 20000, и размножали. Эффективность нокаута TCR $\alpha\beta$  и  $\beta$ 2M, экспрессию CAR к CD19 и размножение клеток оценивали во время размножения клеток. Деплецию TCR $\alpha\beta$  осуществляли с применением автоматизированной системы обработки клеток. Буфер для обработки, клеточный продукт и набор для TCR $\alpha\beta$ , который содержит моноклональные антитела к TCR $\alpha/\beta$ , конъюгированные с биотином, загружали в автоматизированную систему обработки клеток перед проведением цикла. Клетки промывали и метили в камере и направляли в магнитную колонку для разделения. Несвязавшиеся клетки (TCR $\alpha\beta$ ) собирали в целевой пакет в буфере для обработки.

Полученные таким образом клетки анализировали с помощью проточной цитометрии для проверки эффективности активации Т-клеток (в виде % CD25<sup>+</sup>, % CD69<sup>+</sup> и интенсивности флуоресценции или MFI), эффективности генного редактирования (%  $\alpha\beta$  и %  $\beta$ 2M), эффективности деплеции TCR $\alpha\beta$  и эффективности экспрессии CAR. См. **таблицу 4** ниже.

#### **Таблица 4. Проточные панели для проточной цитометрии.**

Панель	Цель	Неконъюгированное антитело	Неконъюгированное антитело
Панель активации Т-клеток	Статус активации Т- клеток: % CD25, средняя интенсивность флуоресценции CD25 (MFI), % CD69		CD45-Pacific Blue; CD5-FITC; CD4-APC- Cy7; CD3-BV510; CD4-APC-Cy7; CD8- Percp5.5; CD25-PE; CD69-APC; 7-AAD
	Результаты редактирования и эффективность деплеции TCR $\alpha\beta$ : % $\alpha\beta^+$ , % $\beta$ 2M и % CAR $^+$	Fab' к мышиному антителу, конъюгированный с биотином	CD45-Pacific Blue; CD5-FITC; CD4-APC- Cy7; CD8-Percp5.5; TCRab-PE; B2M-PE- Cy7; Live-Dead-HV500
Уменьшенная панель CAR (после размораживания)	Результаты редактирования: % CAR $^+$	Fab' к мышиному антителу, конъюгированный с биотином	CD45-Pacific Blue; стрептавидин-APC; Live-Dead-HV500
Панель TCR (после размораживания)	Результаты редактирования: % TCR $\alpha\beta^+$ , % $\beta$ 2M-		CD45-Pacific Blue; CD5-FITC; CD4-APC- Cy7; CD8-Percp5.5; TCRab-PE; B2M-PE- Cy7; Live-Dead-HV500

Вкратце, в общей сложности от  $0,5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^6$  клеток инкубировали с первичным неконъюгированным антителом для полной панели CAR и уменьшенной панели CAR при 4°C в течение 20 мин. Несвязавшееся антитело удаляли промывкой с помощью 1 мл буфера для окрашивания (DPBS/0,5% BSA), а затем клетки инкубировали с 1 мкг контрольного мышинового IgG в 100 мкл буфера для окрашивания при комнатной температуре (RT) в течение 10 мин. Затем клетки окрашивали с помощью конъюгированных антител (все панели), включая краситель для фиксации мертвых клеток LIVE/DEAD™ (Thermo Fisher) (кроме панели активации Т-клеток), при 4°C в течение 30 мин в защищенном от света месте. После инкубации клетки промывали буфером для окрашивания и ресуспендировали в буфере для окрашивания, за исключением панели

активации Т-клеток, которую ресуспендировали в буфере для окрашивания, содержащем 7-AAD.

Т-клетки, активированные в сосуде для статического культивирования, продемонстрировали сопоставимую или более высокую эффективность нокаута TCR $\alpha\beta$  и  $\beta$ 2M и % экспрессии CAR по сравнению с Т-клетками, активированными в Т-колбах (**фиг. 2A-2D**). Редактирование сохранялось на протяжении 12-дневного периода времени, в течение которого отслеживали эффективность редактирования (**фиг. 2A-2D**). Повышенный уровень % экспрессии CAR в необработанных Т-клетках (UT) в день 9 был результатом технической проблемы во время проточной цитометрии и не соответствовал % экспрессии CAR, измеренному в дни 3, 6 и 12 (**фиг. 2D**).

Т-клетки, активированные в сосуде для статического культивирования, демонстрировали значительно более высокую кратность размножения после редактирования по сравнению с Т-клетками, активированными в Т-колбах (98,66-кратное по сравнению с 58,46-кратным; **фиг. 3**). Кратность размножения после редактирования у необработанных Т-клеток (84,61-кратное) и подвергнутых электропорации имитационным контролем Т-клеток (71,77-кратное) была выше, чем наблюдаемая у Т-клеток, активированных в Т-колбе (58,46-кратное), но ниже, чем наблюдаемая у Т-клеток, активированных в сосуде для статического культивирования (98,66-кратное) (**фиг. 3**).

В совокупности эти результаты демонстрируют, что идентифицированные оптимальные условия для активации Т-клеток показали аналогичную высокую эффективность активации Т-клеток в мелкомасштабном производственном процессе (представленном сосудом для статического культивирования) по сравнению с контрольной Т-колбой. Кроме того, полученные активированные Т-клетки при получении в сосуде для статического культивирования показали сопоставимую или более высокую эффективность редактирования, эффективность экспрессии CAR и большее размножение клеток после редактирования по сравнению с активированными Т-клетками при производстве в Т-колбах.

### **ПРИМЕР 3. Идентификация оптимизированных условий для электропорации Т-клеток.**

В этом примере сообщается об идентификации оптимизированных условий для генного редактирования Т-клеток путем электропорации, включая диапазон концентраций Т-клеток для оптимального зависящего от CRISPR-Cas9 генного редактирования в локусах TRAC и  $\beta$ 2M. В этом примере фиксированные концентрации sgRNA и Cas9 вводили к возрастающим концентрациям Т-клеток путем электропорации, а эффективность редактирования определяли с помощью проточной цитометрии.

*Концентрация клеток, составляющая от  $100 \times 10^6$  клеток/мл до  $300 \times 10^6$  клеток/мл, обеспечивает эффективное редактирование*

При применении фиксированной концентрации sgRNA для  $\beta$ 2M (B2M-1; SEQ ID NO: 6), sgRNA для TRAC (TA-1, SEQ ID NO: 2) и CAS9 (SEQ ID NO: 1) из расчета 150 мкг/мл, 150 мкг/мл и 300 мкг/мл соответственно осуществляли электропорацию с

возрастающей концентрацией клеток (от  $100 \times 10^6$  клеток/мл до  $400 \times 10^6$  клеток/мл). Эффективность редактирования отслеживали один раз в три дня после генного редактирования с применением проточной цитометрии. Информация о концентрациях в каждом образце приведена в **таблице 5**.

**Таблица 5.** Концентрации клеток для электропорации.

<b>Концентрация клеток (<math>10^6</math>/мл)</b>	<b>B2M-1 256117 (мкг/мл)</b>	<b>TA-1 256116 (мкг/мл)</b>	<b>CAS9 E0417 (мкг/мл)</b>	<b>Кассета</b>	<b>Объем (мкл)</b>
100	150	150	150	Объем 100 мкл	100
150	150	150	150	Объем 100 мкл	100
200	150	150	150	Объем 100 мкл	100
300	150	150	150	Объем 100 мкл	100
200	150	150	150	Объем 100 мкл	50
300	150	150	150	Объем 100 мкл	50
400	150	150	150	Объем 100 мкл	50

При концентрациях клеток, находящихся в диапазоне от  $100 \times 10^6$  клеток/мл до  $300 \times 10^6$  клеток/мл, B2M(-) и TCR(-) субпопуляции среди отредактированных клеток составляли >80% и >98% соответственно (**фиг. 4А-4В**). Экспрессия CAR<sup>+</sup> составляла >40%, если клетки подвергали электропорации при концентрациях, находящихся в диапазоне от  $100 \times 10^6$  клеток/мл до  $300 \times 10^6$  клеток/мл (**фиг. 4С**). В случае концентрации клеток, составляющей  $400 \times 10^6$  клеток/мл, B2M(-) и TCR(-) субпопуляции составляли <80% и <87% соответственно (**фиг. 4D-4E**). Экспрессия CAR<sup>+</sup> также была незначительно снижена в клетках, подвергнутых электропорации при плотности, составляющей  $400 \times 10^6$  клеток/мл (**фиг. 4F**).

В целом, эти результаты демонстрируют, что диапазон концентрации клеток от  $100 \times 10^6$  клеток/мл до  $300 \times 10^6$  клеток/мл обеспечивает эффективное редактирование эндогенных локусов β2М и TCR.

**ПРИМЕР 4. Идентификация оптимизированных условий для трансдукции Т-клеток.**

В этом примере сообщается об идентификации диапазона МОИ для оптимальной

трансдукции Т-клеток с помощью вектора на основе гAAV, кодирующего химерный антигенный рецептор, что приводит к экспрессии CAR<sup>+</sup> в Т-клетках. В этом примере Т-клетки трансдуцировали с помощью вектора на основе гAAV при возрастающей MOI, и экспрессию CAR<sup>+</sup> определяли количественно с помощью проточной цитометрии.

Вкратце, криоконсервированные Т-клетки из Лейкопака от здорового донора размораживали и активировали в течение 48 часов. Клетки подвергали электропорации в общем объеме при концентрации клеток, составляющей  $1 \times 10^6$ , в присутствии RNP-комплексов, содержащих Cas9 и sgRNA, нацеливающуюся на TCR (TA-1; SEQ ID NO: 2/Cas9; SEQ ID NO: 1), и Cas9 и sgRNA, нацеливающуюся на  $\beta$ 2M (B2M-1; SEQ ID NO: 6/Cas9; SEQ ID NO: 1), с 150 мкг/мл sgRNA и 150 мкг/мл в каждом комплексе (таблица 6). См. также **примеры 1-3** выше.

После электропорации клетки ресуспендировали и оставляли отстояться в инкубаторе в течение 20 минут. Затем подвергнутые электропорации клетки разделяли на различные аликвоты и проводили трансдукцию с помощью гAAV при возрастающей MOI в течение 1 часа при 37°C (таблица 6). Экспрессию CAR<sup>+</sup> определяли с помощью проточной цитометрии после электропорации и трансдукции в дни 3, 6, 10 и 13.

**Таблица 6.** Тестируемые условия трансдукции Т-клеток.

	<b>B2M-1 256162 (мкг/мл)</b>	<b>TA-1 256161 (мкг/мл)</b>	<b>CAS9 E0417 (мкг/мл)</b>	<b>Кювета</b>	<b>Объем</b>	<b>MOI (vg/клетка)</b>
1	150	150	150	Объем 400 мкл	400	80К
2	150	150	150	Объем 400 мкл	400	40К
3	150	150	150	Объем 400 мкл	400	20К
4	150	150	150	Объем 400 мкл	400	10К
5	150	150	150	Объем 400 мкл	400	5К
6	150	150	150	Объем 400 мкл	400	1,25К
7	Необработанные	Необработанные	Необработанные	NA	NA	NA

Как показано на **фиг. 5А**, MOI, составляющая 20 тыс., была достаточной для достижения экспрессии CAR<sup>+</sup>, составляющей по меньшей мере 50% на протяжении тестируемого периода времени. Экспрессия CAR<sup>+</sup> характеризовалась насыщением при значениях MOI, составляющих 10 тыс., 20 тыс., 40 тыс. и 80 тыс. (**фиг. 5А**). Изменяющиеся значения MOI не оказывали эффекта на жизнеспособность клеток и размножение клеток (данные не показаны). Отличия в экспрессии CAR<sup>+</sup> не были обусловлены неэффективностью генного редактирования, поскольку осуществляли электропорацию в общем объеме, и нокдаун B2M и TRAC был однородным во всех образцах, за исключением необработанных клеток (данные не показаны). Значения MOI от 1,25 тыс. до 10 тыс., по-видимому, проявляют линейную корреляцию со снижением

экспрессии CAR<sup>+</sup> (**фиг. 5A**). Дополнительные эксперименты, в которых Т-клетки трансдуцировали при пошаговым возрастанием MOI от 0 тыс. до 23 тыс., показали линейную корреляцию между экспрессией CAR<sup>+</sup> и MOI в диапазоне, составляющем от 0,12 тыс. до 4,7 тыс. (**фиг. 5B**).

В совокупности эти результаты демонстрируют, что экспрессия CAR<sup>+</sup> характеризовалась насыщением в Т-клетках, трансдуцированных при MOI от 10 тыс. до 80 тыс., и что экспрессия CAR<sup>+</sup> проявляла линейную корреляцию с MOI в Т-клетках, трансдуцированных при MOI от 0,12 тыс. до 4,7 тыс.

**ПРИМЕР 5. Идентификация оптимизированных условий для размножения Т-клеток.**

В этом примере сообщается об идентификации необязательных значений плотности высевания клеток для наилучшего размножения Т-клеток. В этом примере Т-клетки высевали при возрастающих значениях плотности, и размножение клеток отслеживали с течением времени.

Вкратце, криоконсервированные Т-клетки из Лейкопака от здорового донора размораживали и активировали в течение 48 часов. Затем клетки подвергали электропорации в присутствии RNP-комплексов, содержащих Cas9 и sgRNA, нацеливающуюся на TCR (TA-1; SEQ ID NO: 2/Cas9; SEQ ID NO: 1), и Cas9 и sgRNA, нацеливающуюся на  $\beta$ 2M (B2M-1; SEQ ID NO: 6/Cas9; SEQ ID NO: 1), с 150 мкг/мл sgRNA и 150 мкг/мл в каждом комплексе. После электропорации клетки трансдуцировали с помощью gAAV из расчета MOI, составляющей 20000, а затем размножали в сосуде для статического культивирования. Подробности см. в **примерах 1-4** выше.

После редактирования клетки высевали в сосуд для статического культивирования из расчета  $5 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> (50000),  $1 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> (100000),  $2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> (200000),  $3 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> (300000) и  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> (500000) для размножения не более 12 дней. Подсчет клеток и оценку их жизнеспособности проводили один раз в 3 дня. Кратность размножения рассчитывали в виде соотношения числа конечных клеток и числа исходных клеток.

Как показано на **фиг. 6A-6B**, клетки, посеянные при плотности  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, достигали плато роста через 9 дней. К дню 12 клетки, посеянные при плотности  $3 \times 10^5$ /см<sup>2</sup>, достигали числа клеток, сопоставимого с числом, достигаемым клетками, посеянными из расчета  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, в день 9 (**фиг. 6A-6B**). Клетки, посеянные при значениях плотности, составляющих  $2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> и  $1 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, показали умеренное размножение без достижения плато роста к дню 12 (**фиг. 6A-6B**). Среди протестированных значений плотности высевания наиболее низкие уровни пролиферации наблюдали для клеток, посеянных при плотности  $5 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> (**фиг. 6A-6B**). Клетки, посеянные при плотности, составляющей  $1 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, показали более устойчивый показатель кратности размножения (223,4-кратное) по сравнению с клетками, посеянными при значениях плотности, составляющих  $2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> (185,5-кратное) и  $3 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> (164,6-кратное) (**фиг 6C**), хотя они приводили к меньшим значениям общего

числа клеток. Показатель кратности размножения клеток, высеванных из расчета либо  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, либо  $5 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>, был в примерно 100 раз выше (**фиг. 6С**).

В целом, эти результаты демонстрируют, что диапазон значений плотности высевания клеток от  $3 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> до  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> обеспечивал эффективное размножение Т-клеток после редактирования.

#### **ПРИМЕР 6. Идентификация оптимизированных условий для деплеции по TCRαβ.**

В этом примере сообщается об идентификации условий для оптимальной деплеции TCRαβ<sup>+</sup> клеток, которые сохраняются после редактирования. Опосредованное CRISPR-Cas9 геновое редактирование, как правило, приводит к устранению экспрессии TCRαβ в >90% Т-клеток. Для сведения к минимуму возможности реакции "трансплантат против хозяина" (GvHD), содержание оставшихся TCRαβ<sup>+</sup> Т-клетки можно дополнительно уменьшать за счет процесса деплеции по TCRαβ<sup>+</sup>.

Вкратце, клетки инкубировали с конъюгированным с биотином антителом к TCRαβ, и микрогранулами с антителом к биотину. После удаления избытка несвязавшегося антитела и микрогранул клетки пропускали через магнитную колонку, и меченые TCRαβ<sup>+</sup> клетки захватывались на колонке. Несвязавшиеся TCRαβ<sup>-</sup> клетки элюировались в целевой пакет с 0,5% HSA в буфере PBS/EDTA. Элюированные клетки культивировали на протяжении ночи для восстановления клеток, а затем их собирали для составления лекарственного продукта.

Четыре партии продукта на основе Т-клеток, экспрессирующих CAR, обрабатывали для деплеции по TCRαβ. Три партии получали из полномасштабного процесса, а одну партию (СТХ110-18-01) создавали из процесса среднего размера. Число вводимых клеток варьировалось от  $7,4 \times 10^9$  клеток до  $32,0 \times 10^9$  клеток вследствие изменчивости доноров и масштаба размножения (**таблица 7**). Показатель извлечения числа клеток после деплеции находился в диапазоне от 75% до 113,33% (**таблица 7**). Показатель извлечение числа клеток, составляющий 100% или 113%, мог быть вызван недооценкой числа введенных клеток (**таблица 7**). Жизнеспособность вводимых и извлеченных клеток превышала 90%, за исключением вводимых клеток из партии СТХ110-18-01 (84,5%) (**таблица 7**). Средний процент TCRαβ<sup>+</sup> во вводимых и извлеченных клетках составил 2,06% и 0% соответственно.

**Таблица 7.** Деплеция по TCRαβ четырех партий лекарственного продукта

Партия	Вводимые клетки			Извлеченные клетки					
	Число клеток (×10 <sup>9</sup> )	Жизнеспособность (%)	Число TCRαβ+ клеток (%)	Число TCRαβ+ клеток (×10 <sup>9</sup> )	Число клеток (×10 <sup>9</sup> )	Жизнеспособность (%)	Извлечение (%)	Число TCRαβ+ клеток (%)	Число TCRαβ+ клеток (×10 <sup>9</sup> )
СТХ110-	7,40	84,50	1,98	0,15	6,32	93,00	85,41	0,000	0,00

Партия	Вводимые клетки				Извлеченные клетки				Число TCRαβ + клетки (×10 <sup>9</sup> )
	Число клеток (×10 <sup>9</sup> )	Жизнеспособность (%)	% TCRαβ+	Число TCRαβ+ клеток (×10 <sup>9</sup> )	Число клеток (×10 <sup>9</sup> )	Жизнеспособность (%)	Извлечение (%)	% TCRαβ+	
<b>18-01</b>									
СТХ110-18-02	32,00	93,50	0,71	0,23	24,00	96,00	75,00	0,000	0,00
СТХ110-18-03	8,48	93,50	2,76	0,23	9,61	97,00	113,33	0,000	0,00
СТХ110-18-04	14,30	92,00	2,78	0,40	14,40	96,00	100,70	0,003	0,00
<b>Среднее</b>	<b>15,55</b>	<b>90,88</b>	<b>2,06</b>	<b>0,25</b>	<b>13,58</b>	<b>95,50</b>	<b>93,61</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>

Таким образом, эти результаты демонстрируют эффективную деплецию по TCRαβ из Т-клеток, экспрессирующих CAR, в которых ген TRAC и ген β2М были нарушены генетическим образом.

**ПРИМЕР 7. Разработка производственного процесса для получения генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих CAR к CD19 и имеющих генетически нарушенные гены TRAC и β2М (СТХ110)**

#### *Обзор*

СТХ110 представляет собой средство иммунотерапии на основе Т-клеток, направленных на CD19, состоящее из аллогенных Т-клеток, которые являются генетически модифицированными *ex vivo* с применением компонентов системы генного редактирования CRISPR/Cas9 (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR-ассоциированный белок 9) (sgRNA и нуклеаза Cas9).

Модификации включают целевое нарушение генов TRAC и β2М. Нарушение локуса TRAC приводит к утрате экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) и предназначено для снижения вероятности реакции "трансплантат против хозяина" (GvHD), в то время как нарушение локуса β2М приводит к отсутствию экспрессии белков главного комплекса гистосовместимости I типа (MHC I) и предназначено для улучшения персистенции за счет снижения вероятности отторжения хозяином. Добавление CAR к CD19 направляет модифицированные Т-клетки к опухолевым клеткам, экспрессирующим CD19.

CAR состоит из scFv-фрагмента антитела к CD19, трансмембранного домена CD8, костимулирующего домена CD28 и сигнального домена CD3ζ. Экспрессией CAR в СТХ110 управляет промотор EF-1α.

Иллюстративный производственный процесс для получения СТХ110 показан на

**фиг. 7А.***Постепенное изменение производственного процесса*

Производственный процесс для СТХ110 осуществляли в трех масштабах получения, включая исследовательский масштаб, опытный масштаб и клинический масштаб. Процесс исследовательского масштаба осуществляли в небольшом масштабе, и процесс исследовательского масштаба увеличивали и переводили в процесс опытного масштаба и процесс клинического масштаба. Мероприятия по первоначальной разработке (4 серии) проводили с применением исходных материалов лабораторной степени чистоты для лекарственной субстанции, чтобы проверить возможность реализации и скорректировать рабочие параметры. Впоследствии, для процесса клинического масштаба, который функционально идентичен процессу опытного масштаба, использовали применение исходных материалов из источников, полученных в соответствии с GMP (sgRNA, Cas9 и rAAV-138), и количественных критериев соответствия.

*Выбор исходных материалов*

Исходные материалы для получения СТХ110 включают:

- Лейкопаки, собранные от здоровых доноров,
- бактериальную нуклеазу Cas9,
- две одиночные направляющие РНК (sgRNA), TA-1, которая нацеливается на locus TRAC, и  $\beta 2M$ -1, которая нацеливается на locus  $\beta 2M$ , и
- вектор на основе рекомбинантного AAV-6 (rAAV-138), который кодирует ген CAR к CD19.

Информация о структуре компонентов, применяемых при создании генетических модификаций СТХ110, а также отредактированных локусов генов TRAC и  $\beta 2M$ , представлен ниже:

Аминокислотная последовательность нуклеазы Cas9 (SEQ ID NO:1):

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDS  
 GETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLVEEDKKHE  
 RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL  
 NPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKK  
 NGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAQLSKDQTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAA  
 KNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPKEYKEIFFDQ  
 SKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI  
 HLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETTP  
 WNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKLNPNKVLPHSLLEYFTVYNELTKVKYVTEG  
 MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLG  
 TYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLK  
 RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQ  
 VSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQ  
 KGQKNSRERMKRIEELGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDI

NRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLN  
 AKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEND  
 KLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLES  
 EFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETN  
 GETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKD  
 WDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEA  
 KGYKEVKKDLIIPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYE  
 KLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKR VILADANLDKVLSAYNKHRDKPIR  
 EQAENIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQL  
 GGD

Таблица 8. Последовательности sgRNA и последовательности целевых генов

		Последовательности sgRNA	SEQ ID NO:
<b>sgRNA для TRAC (TA-1)</b>	Модифицированная	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcua gaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaa guggcaccgagucggugcU*U*U*U	2
	Немодифицированная	AGAGCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuaaga auagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaagu ggcaccgagucggugcUUUU	3
	Спейсер	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCC	4
<b>sgRNA для TRAC</b>	Немодифицированная	AGAGCAACAGUGCUGUGGCC	5
	Модифицированная	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcua gaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaa guggcaccgagucggugcU*U*U*U	6
<b>sgRNA для <math>\beta</math>2M (B2M-1)</b>	Немодифицированная	GCUACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcuaaga auagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaagu ggcaccgagucggugcUUUU	7
	Спейсер	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCC	8
<b>sgRNA для <math>\beta</math>2M</b>	Немодифицированная	GCUACUCUCUCUUUCUGGCC	9
	Модифицированная		
<b>Целевые последовательности (PAM)</b>			
<b>sgRNA для TRAC</b>		AGAGCAACAGTGCTGTGGCC(TGG)	10



ый ген TRAC	TGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT	
Отредактированн	AAGAGCAACAGTGCTGTGTGCCTGGAGCAACAAATC	24
ый ген TRAC	TGACT	

**Таблица 10.** Отредактированная последовательность гена  $\beta 2M$

<b>Описание</b>	<b>Последовательность</b> (делеции обозначены с помощью тире (-); вставки обозначены <b>жирным шрифтом</b> )	<b>SEQ ID NO:</b>
Отредактирова нный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT- GCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCC GCT	25
Отредактирова нный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTC-- GCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCC GCT	26
Отредактирова нный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTT----- CTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCC GCT	27
Отредактирова нный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGG <b>ATAGCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCT</b> CCCGCT	28
Отредактирова нный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGC----- GCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCC GCT	29
Отредактирова нный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGT GGCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCC CGCT	30

**Таблица 11.** Последовательности компонентов конструкции CAR к CD19

<b>Название</b>	<b>Последовательность</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
Трансмембранный домен CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY	31
Нуклеотидная последовательность CD28	TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACA TGAATATGACTCCTCGCCGGCCTGGGCCGACAA GAAAACATTACCAACCCTATGCCCCCCCACGAG ACTTCGCTGCGTACAGGTCC	32
Аминокислотная последовательность	SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDF AAYRS	33

## CD28

Нуклеотидная последовательность CD3-дзета	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCG GCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAAC GAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGAC GTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAA ATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAA GAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAG ATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAG GGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGC CTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGAT ACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTC CCAGA	34
Аминокислотная последовательность CD3-дзета	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQLSTATKDTY DALHMQALPPR	35
CAR к CD19 Нуклеиновая кислота FMC63-28Z (FMC63- CD8[tm]- CD28[космтимулиру ющий домен]-CD3z)	ATGCTTCTTTTGGTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGA ACTTCCTCATCCAGCGTTCTTGCTGATCCCCGAT ATTCAGATGACTCAGACCACAGTAGCTTGTCTG CCTCACTGGGAGACCGAGTAACAATCTCCTGCA GGGCAAGTCAAGACATTAGCAAATACCTCAATT GGTACCAGCAGAAGCCCGACGGAACGGTAAAAC TCCTCATCTATCATAACGTCAAGGTTGCATTCCGG AGTACCGTCACGATTTTCAGGTTCTGGGAGCGGA ACTGACTATTCCTTGACTATTTCAAACCTCGAGC AGGAGGACATTGCGACATATTTTTGTCAACAAG GTAATACCCTCCCTTACACTTTCGGAGGAGGAAC CAAACCTCGAAATTACCGGGTCCACCAGTGGCTCT GGGAAGCCTGGCAGTGGAGAAGGTTCCACTAAA GGCGAGGTGAAGCTCCAGGAGAGCGGCCCCCGGT CTCGTTGCCCCAGTCAAAGCCTCTCTGTAACGT GCACAGTGAGTGGTGTATCATTGCCTGATTATGG CGTCTCCTGGATAAGGCAGCCCCCGCGAAAGGG TCTTGAATGGCTTGGGGTAATATGGGGCTCAGAG ACAACGTATTATAACTCCGCTCTCAAAGTCGCT	36

TGACGATAATAAAAGATAACTCCAAGAGTCAAG  
TTTTCCTTAAAATGAACAGTTTGCAGACTGACGA  
TACCGCTATATATTATTGTGCTAAACATTATTAC  
TACGGCGGTAGTTACGCGATGGATTATTGGGGG  
CAGGGGACTTCTGTCACAGTCAGTAGTGCTGCTG  
CCTTTGTCCCGGTATTTCTCCCAGCCAAACCGAC  
CACGACTCCC GCCCGCGCCCTCCGACACCCGCT  
CCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCC  
CCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTG  
TTCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATAT  
TTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGC  
GTCCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTG  
TAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGGAGTAGGTT  
GTTGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCTCGC  
CGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCC  
TATGCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGT  
CCCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCC  
GGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAA  
CGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGA  
CGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGA  
AATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCA  
AGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAA  
GATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAA  
GGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATG  
GCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAG  
ATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCC  
TCCCAGA

CAR к CD19

Аминокислотная

последовательность

FMC63-28Z (FMC63-  
CD8[tm]-

CD28[костимулирую  
щий домен]-CD3z)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTTSSLSASL  
GDRV TISCRASQDISKYL N WYQQKPDGTVKLLIYH  
TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYF  
CQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGST  
KGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG  
VSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLT  
IKDNSKSKVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGG  
SYAMDYWGQGTSVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTP

37

	APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSK RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFA AYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	
Левый ITR (5' ITR) (альтернативный)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA GGCCGCCCGGGCGTCGGGGCGACCTTTGGTCGCCC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGG AGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGGTTCCT	38
Правый ITR (3' ITR) (альтернативный)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTC TCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGA CCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGG GCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGC CTGCAGG	39
TRAC-LHA (800 п. о.)	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGG CCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTA GACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAACCTC TATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGAT AGATTTCCCAACTTAATGCCAACATAACCATAAAC CTCCCATTTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGG AGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCT TTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCT GCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGAT CCTATTAAATAAAAAGAATAAGCAGTATTATTA GTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAG GCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCAT GGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGT CCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTT CTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACC GTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGT CCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGG GGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCC TGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCTG	40

ACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATC  
 CAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTT  
 GATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGAT  
 TCTGATGTGTATATCACAGACAAAAGTGTGCTAG  
 ACATGAGGTCTATGGACTTCA

TRAC-RHA (800 п. о.) TGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAAC 41

GCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCT  
 TCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGC  
 CTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCC  
 AGGTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTA  
 AACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCA  
 TTGCCACCAAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAG  
 TGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACG  
 GGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGA  
 GAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCA  
 GAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTT  
 GCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGC  
 CCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTG  
 TCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCA  
 GTCTCACGCAGTCACTCATTAAACCCACCAATCAC  
 TGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTG  
 AAGTGGAGGAATTA AAAAAGTCAGATGAGGGGTG  
 TGCCCAGAGGAAGCACCAATTCTAGTTGGGGGAG  
 CCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTT  
 CAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAA  
 AACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGG  
 GCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGC  
 CCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGG  
 CCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGG

EF1 $\alpha$  GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACA 42

TCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGG  
 GTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGG  
 CGCGGGGTAAACTGGGAAAAGTGATGTCGTGTAC  
 TGGCTCCGCCTTTTTCCCAGGGTGGGGGAGAAC  
 CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCT

TTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTA  
 AGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCT  
 TTACGGGTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTAC  
 TTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCG  
 AGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGA  
 GGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGC  
 TTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCG  
 CCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGT  
 CTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAA  
 ATTTTGTATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGG  
 CAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTG  
 CACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCG  
 GCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTT  
 CGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGA  
 GAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGC  
 CTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTAT  
 CGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTC  
 GGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCT  
 TCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAG  
 GACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTC  
 ACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCTC  
 AGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGG  
 GCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCT  
 TTTGGAGTACGTGCTCTTAGGTTGGGGGGAGGG  
 GTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGG  
 GTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTG  
 ATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTT  
 TGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTG  
 GTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTG  
 A

Сигнальный пептид	ATGCTTCTTTTGGTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGA	43
GM-CSF	ACTTCCTCATCCAGCGTTCTTGCTGATCCCC	
Сигнальный пептид	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	44
GM-CSF		
scFv-фрагмент	GATATTCAGATGACTCAGACCACCAGTAGCTTGT	45

антитела к CD19

CTGCCTCACTGGGAGACCGAGTAACAATCTCCTG  
 CAGGGCAAGTCAAGACATTAGCAAATACCTCAA  
 TTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGAACGGTAAA  
 ACTCCTCATCTATCATACGTCAAGGTTGCATTCC  
 GGAGTACCGTCACGATTTTCAGGTTCTGGGAGCG  
 GAACTGACTATTCCTTGACTATTTCAAACCTCGA  
 GCAGGAGGACATTGCGACATATTTTTGTCAACAA  
 GGTAATACCCTCCCTTACACTTTCGGAGGAGGAA  
 CCAAACTCGAAATTACCGGGTCCACCAGTGGCTC  
 TGGGAAGCCTGGCAGTGGAGAAGGTTCCACTAA  
 AGGCGAGGTGAAGCTCCAGGAGAGCGGCCCCCGG  
 TCTCGTTGCCCCCAGTCAAAGCCTCTCTGTAACG  
 TGCACAGTGAGTGGTGTATCATTGCCTGATTATG  
 GCGTCTCCTGGATAAGGCAGCCCCCGCGAAAGG  
 GTCTTGAATGGCTTGGGGTAATATGGGGCTCAGA  
 GACAACGTATTATAACTCCGCTCTCAAAAGTCGC  
 TTGACGATAATAAAAGATAACTCCAAGAGTCAA  
 GTTTTCCTTAAAATGAACAGTTTGCAGACTGACG  
 ATACCGCTATATATTATTGTGCTAACATTATTA  
 CTACGGCGGTAGTTACGCGATGGATTATTGGGG  
 GCAGGGGACTTCTGTACAGTCAGTAGT

Аминокислотная

последовательность

scFv-фрагмента

антитела к CD19

Линкер подчеркнут

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWY  
 QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYS  
 LTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGS  
TSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSL  
 VTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGS  
 ETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD  
 AIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS

46

Внеклеточная часть

CD8a+трансмембранн

ая часть CD8a+5'

линкер (подчеркнут)

GCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCCAGCCA  
 AACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGAC  
 ACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGT  
 CTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGG  
 GGTGCTGTTCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTT  
 GTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTAC  
 GTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACCTCGTTATTA

47

		TGTATTGTAATCACAGGAATCGC	
Внеклеточная часть	CD8a+трансмембранная часть CD8a (без линкера)	TTTGTCCCGGTATTTCTCCCAGCCAAACCGACCA CGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCC CACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCC GAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTT CATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTT ACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGT CCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTA ATCACAGGAATCGC	48
Внеклеточная часть	CD8a+трансмембранная часть CD8a	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS LVITLYCNHRNR	49
VH CD19		EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTIK DNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSY AMDYWGQGTSVTVSS	50
VL CD19		DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N WY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG TKLEIT	51
Линкер CD19		GSTSGSGKPGSGEGSTKG	52
rAAV		CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA GGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGG AGTGGCCA ACTCCATCACTAGGGGTTCTTGCGGC CGCACGCGTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACT TGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGC TGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTT CAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTG GTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACA TACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCAGCC TAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATG TACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTCCCATGCCT GCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTT TTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAGAATAAGC AGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTT CAGGTTTCC	53

TTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTT  
CACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATA  
GCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACG  
AGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATA  
AAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGA  
GCCCCGCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTC  
CAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGAT  
CATGTCCTAACCCTGATCCTCTTGTCCCACAGAT  
ATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGA  
GAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCT  
ATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCA  
CAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGAC  
AAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCA  
GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACA  
TCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGG  
GTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGG  
CGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAC  
TGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC  
CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCT  
TTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTA  
AGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCT  
TTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTAC  
TTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCG  
AGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGA  
GGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGC  
TTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCG  
CCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGT  
CTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAA  
ATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGG  
CAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTG  
CACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCG  
GCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTT  
CGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGA  
GAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGC  
CTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGCGTGTAT

CGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTC  
GGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCT  
TCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAG  
GACGCGGCCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTC  
ACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTC  
AGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGG  
GCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCT  
TTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGG  
GTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGG  
GTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTG  
ATGTAATTCTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTTGAGTT  
TGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTG  
GTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTG  
ACCACCATGCTTCTTTTGGTTACGTCTCTGTTGCT  
TTGCGAACTTCCTCATCCAGCGTTCTTGCTGATC  
CCCGATATTCAGATGACTCAGACCACCAGTAGCT  
TGTCTGCCTCACTGGGAGACCGAGTAACAATCTC  
CTGCAGGGCAAGTCAAGACATTAGCAAATACCT  
CAATTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGAACGGT  
AAAACCTCCTCATCTATCATACGTCAAGGTTGCAT  
TCCGGAGTACCGTCACGATTTTCAGGTTCTGGGA  
GCGGAACTGACTATTCCTTGACTATTTCAAACCT  
CGAGCAGGAGGACATTGCGACATATTTTTGTCAA  
CAAGGTAATAACCCTCCCTTACACTTTCGGAGGAG  
GAACCAAACCTCGAAATTACCGGGTCCACCAGTG  
GCTCTGGGAAGCCTGGCAGTGGAGAAGGTTCCA  
CTAAAGGCGAGGTGAAGCTCCAGGAGAGCGGCC  
CCGGTCTCGTTGCCCCAGTCAAAGCCTCTCTGT  
AACGTGCACAGTGAGTGGTGTATCATTGCCTGAT  
TATGGCGTCTCCTGGATAAGGCAGCCCCCGCGA  
AAGGGTCTTGAATGGCTTGGGGTAATATGGGGC  
TCAGAGACAACGTATTATAACTCCGCTCTCAAAA  
GTCGCTTGACGATAATAAAAAGATAACTCCAAGA  
GTCAAGTTTTCTTAAAATGAACAGTTTGCAGAC  
TGACGATACCGCTATATATTATTGTGCTAAACAT

TATTACTACGGCGGTAGTTACGCGATGGATTATT  
GGGGGCAGGGGACTTCTGTACAGTCAGTAGTG  
CTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCCAGCCAA  
ACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACA  
CCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTC  
TTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGG  
GTGCTGTTCATAACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTG  
TGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACG  
TGCGGCGTCCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTTT  
GTATTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGGAG  
TAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACT  
CCTCGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTAC  
CAACCCTATGCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGT  
ACAGGTCCCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAG  
ACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGC  
TGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGG  
AGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAG  
ACCCGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGA  
ATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGA  
AGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAG  
GTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTC  
ACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAA  
CCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGG  
CCCTGCCTCCCAGATAATAATAAAAATCGCTATCC  
ATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGT  
GGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACG  
CCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTT  
CTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCC  
TTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCA  
GGTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAA  
AACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCAT  
TGCCACCAAACCCCTCTTTTTACTAAGAAACAGT  
GAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACG  
GGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGA  
GAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAACCT

GAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTT  
 GCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGC  
 CCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTG  
 TCTGCCAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCA  
 GTCTCACGCAGTCACTCATTAAACCCACCAATCAC  
 TGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTG  
 AAGTGGAGGAATTA AAAAGTCAGATGAGGGGTG  
 TGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAG  
 CCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTT  
 CAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAA  
 AACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGG  
 GCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGC  
 CCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGG  
 CCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGTAACCA  
 CGTGCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTA  
 GGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCT  
 CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGAC  
 CAAAGGTCGCCCAGCGCCCGGGCTTTGCCCGGG  
 CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCC  
 TGCAGG

LHA-RHA

GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGG  
 CCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTA  
 GACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAACCTC  
 TATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGAT  
 AGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAAC  
 CTCCCATTCTGCTAATGCCAGCCTAAGTTGGGG  
 AGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCT  
 TTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCT  
 GCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGAT  
 CCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAA  
 GTAGCCCTGCATTTCAAGTTTCCTTGAGTGGCAG  
 GCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCAT  
 GGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGT  
 CCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTT  
 CTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACC

54

GTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGT  
CCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTGG  
GGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCC  
TGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCTG  
ACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATC  
CAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTT  
GATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGAT  
TCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAG  
ACATGAGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTGCCC  
GTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCC  
CCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGCAATTGAA  
CCGGTGCCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACT  
GGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTT  
TCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGC  
AGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGG  
TTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTG  
GTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGG  
CCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGC  
AGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGG  
AAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTA  
AGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCC  
TGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATC  
TGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCG  
ATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACC  
TGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTT  
GTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTT  
CGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCC  
GTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGG  
GCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGG  
GGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCC  
TGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGG  
GCGGCAAGGCTGGCCCGGTCCGGCACCAAGTTGCG  
TGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCT  
GCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGCGCTCG  
GGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGG

AAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCAT  
GTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGC  
ACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTC  
GTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATG  
GAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAA  
GTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCT  
TGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTC  
ATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTT  
TTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGACCACCATGCTTC  
TTTTGGTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGAACTTCCT  
CATCCAGCGTTCTTGCTGATCCCCGATATTCAGA  
TGACTCAGACCACCAGTAGCTTGTCTGCCTCACT  
GGGAGACCGAGTAACAATCTCCTGCAGGGCAAG  
TCAAGACATTAGCAAATACCTCAATTGGTACCAG  
CAGAAGCCCGACGGAACGGTAAAACCTCCTCATC  
TATCATACGTCAAGGTTGCATTCCGGAGTACCGT  
CACGATTTTCAGGTTCTGGGAGCGGAACTGACTA  
TTCCTTGACTATTTCAAACCTCGAGCAGGAGGAC  
ATTGCGACATATTTTTGTCAACAAGGTAATACCC  
TCCCTTACACTTTCGGAGGAGGAACCAAACCTCGA  
AATTACCGGGTCCACCAGTGGCTCTGGGAAGCCT  
GGCAGTGGAGAAGGTTCCACTAAAGGCGAGGTG  
AAGCTCCAGGAGAGCGGCCCCGGTCTCGTTGCC  
CCCAGTCAAAGCCTCTCTGTAACGTGCACAGTGA  
GTGGTGTATCATTGCCTGATTATGGCGTCTCCTG  
GATAAGGCAGCCCCCGCGAAAGGGTCTTGAATG  
GCTTGGGGTAATATGGGGCTCAGAGACAACGTA  
TTATAACTCCGCTCTCAAAGTCGCTTGACGATA  
ATAAAAGATAACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTA  
AAATGAACAGTTTGCAGACTGACGATACCGCTA  
TATATTATTGTGCTAAACATTATTACTACGGCGG  
TAGTTACGCGATGGATTATTGGGGGCAGGGGAC  
TTCTGTCACAGTCAGTAGTGCTGCTGCCTTTGTC  
CCGGTATTTCTCCCAGCCAAACCGACCACGACTC  
CCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCAT

CGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCA  
TGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTCATA CGA  
GGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTG  
GGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTG  
TTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAG  
GAATCGCTCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCC  
GATTACATGAATATGACTCCTCGCCGGCCTGGGC  
CGACAAGAAAACATTACCAACCCTATGCCCCC  
CACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCGAGTGA  
AGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCA  
GCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAA  
TTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGAT  
AAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGG  
TAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACT  
CTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGA  
GGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACG  
ACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCA  
AGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGA  
TGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAA  
TAATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGT  
GTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGAC  
TTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATT  
TTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAA  
GGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTT  
GCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCT  
GGTCAATGATGTCTAAACTCCTCTGATTGGTGG  
TCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAACCCTCTT  
TTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTCTGGCAGT  
CCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAA  
GAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGC  
CTCAGTCTCTCCA ACTGAGTTCCTGCCTGCCTGC  
CTTTGCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCTTCT  
AGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCT  
CTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTC  
CCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCA

TTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATG  
 AATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA  
 AGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACC  
 ATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGA  
 AAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTT  
 AACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGA  
 CAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGC  
 TACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGG  
 AGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTC  
 AATGAGAAAGG

(i) Фактические результаты редактирования клеток среди разных здоровых доноров

Т-клетки от здоровых доноров (мужчины, n=10) выделяли из Лейкопаков и замораживали в криопробирках. Эффективность редактирования оценивали на размороженных клетках каждого донора с применением следующих концентраций компонентов системы генного редактирования: Cas9 (300 мкг/мл), TA-1 (75 мкг/мл) и B2M-1 (150 мкг/мл и 200 мкг/мл).

Более 40% отредактированных клеток от всех доноров экспрессировали CAR. Показатели нокаута  $\beta 2M$  и TRAC превышали 80% и 95% от общей популяции клеток соответственно (таблица 12). Все изоляты Т-клеток от разных доноров считались приемлемыми для производства CTX110, что свидетельствует о надежном процессе получения.

**Таблица 12.** Результаты редактирования у 10 доноров-мужчин.

Донор	Группа крови	Возраст	ВМІ	% TCR $\alpha\beta$	% B2M	% CAR <sup>+</sup>	Кратность размножения
<b>TA-1=75 мкг/мл, B2M-1=150 мкг/мл, Cas9=300 мкг/мл</b>							
1	A+	49	40,1	99,00	89,00	46,30	13,41
2	A+	28	42,6	99,99	95,00	68,20	62,64
3	A+	36	29	99,00	85,00	66,30	63,00
4	A+	33	24	99,96	91,00	53,10	42,16
<b>TA-1=75 мкг/мл, B2M-1=200 мкг/мл, Cas9=300 мкг/мл</b>							
40	A-	19	25,2	95,00	82,33	49,00	53,57
41	A+	31	24	98,00	86,33	59,67	76,07
43	O+	29	25,7	96,00	81,67	59,00	69,83
A	O+	23	24,4	98,00	86,67	63,00	63,53
44	O+	30	26,5	98,00	83,00	60,00	76,37
45	A+	35	27,2	97,00	84,33	62,00	59,40

Донор	Группа крови	Возраст	ВМІ	% TCRαβ <sup>+</sup>	% В2М <sup>+</sup>	% CAR <sup>+</sup>	Кратность размножения
Среднее				98,00	86,43	58,66	58,00
SD				1,54	3,98	6,78	17,72
%CV				1,57	4,61	11,55	30,56

Сокращения. В2М=β2-микроглобулин, ВМІ=индекс массы тела, CAR=химерный антигенный рецептор, CV=коэффициент вариации, SD=стандартное отклонение, TCRαβ=альфа-цепь Т-клеточного рецептора+бета-цепь Т-клеточного рецептора.

(ii) Нуклеаза Cas9

В этом примере применяли нуклеазу Cas9 под SEQ ID NO:1. Результаты, обобщенные в **таблице 14** ниже, указывают, что присутствовали сходные уровни TCRαβ<sup>+</sup> и В2М<sup>+</sup> клеток, а также двойных отрицательных клеток.

(iii) Вектор на основе гAAV-138

Вектор на основе гAAV-138, раскрытый выше, применяли для оценки влияния MOI на достижение требуемой экспрессии CAR<sup>+</sup>. Клетки трансдуцировали при возрастающей MOI и определяли количественно экспрессию CAR<sup>+</sup>. См. **пример 4** выше. Данные, представленные на **фиг. 7В**, поддерживают выбор MOI, составляющей 20000.

Для увеличения масштаба разработки проводили исследование для проверки пригодности выбранной MOI с исходными материалами, отмеченными выше. Клетки трансдуцировали при значениях MOI, находящихся в диапазоне от 0 до 23000. После электропорации и вирусной инфекции с последующим 11-дневным размножением экспрессию CAR<sup>+</sup> определяли количественно с помощью проточной цитометрии. Результаты представлены на **фиг. 7С**. Экспрессия CAR<sup>+</sup>, которая зависит от дозы AAV, находилась в диапазоне от 2,1% CAR<sup>+</sup> при MOI, составляющей 0, до 56,2% CAR<sup>+</sup> при MOI, составляющей 23000. Экспрессия CAR<sup>+</sup> достигала насыщения при MOI, составляющей 4700.

Экспрессия CAR у клеток, инфицированных с помощью вектора в соответствии GMP, гAAV-138 (при MOI, составляющей 23000), была сопоставима с экспрессией, полученной с вектором не в соответствии с GMP (при MOI, составляющей 20000), 56,2% и 55,4% соответственно. MOI, составляющую 20000, выбрали для увеличения масштаба производства.

(iv) In situ образование рибонуклеопротеинового комплекса (RNP)

При применении фиксированной концентрации клеток осуществляли электропорацию с возрастающими концентрациями RNP комплексов, составленных путем инкубации Cas9 (SEQ ID NO: 1) с sgRNA, нацеливающейся на TCR (TA-1, SEQ ID NO: 2), и sgRNA, нацеливающейся на β2М (B2M-1; SEQ ID NO 6). In situ образование комплексов TA-1/Cas9 и β2М/Cas9 оценивали с применением конечной объединенной концентрации нуклеазы Cas9, составляющей 300 мкг/мл (эквивалентна конечной концентрации нуклеазы Cas9, составляющей 150 мкг/мл, объединенной с каждой направляющей). Конечные

концентрации TA-1 и B2M-1 варьировали от 37,5 мкг/мл до 300 мкг/мл.

Как показано на **фиг. 7D**, концентрации sgRNA для TA-1 от 37,5 мкг/мл до 75 мкг/мл приводили к более высокому редактированию TCR $\alpha\beta$ . Концентрации sgRNA для TA-1 от 150 мкг/мл до 300 мкг/мл не обеспечивали дополнительное редактирование TCR $\alpha\beta$  и приводили к снижению редактирования B2M. Среди протестированных концентраций 75 мкг/мл sgRNA для TA-1 обеспечивала наиболее высокую эффективность редактирования TCR $\alpha\beta$ ,  $\beta$ 2M и двойного нокаута (DKO) TCR $\alpha\beta$  и  $\beta$ 2M. Как показано на **фиг. 7E**, концентрации sgRNA для B2M-1 от 75 мкг/мл до 150 мкг/мл приводили к более высокому редактированию  $\beta$ 2M, что предполагает, что эффективное редактирование может достигаться с применением концентрации sgRNA для B2M-1, которая является более высокой, чем концентрация sgRNA для TA-1.

В целом, эти результаты демонстрируют эффективное редактирование T-клеток с применением конечных концентраций Cas9, sgRNA для TA-1 и sgRNA для B2M-1, составляющих 0,3 мг/мл, 0,08 мг/мл и 0,2 мг/мл соответственно. Для достижения этих концентраций готовили смеси sgRNA для TA-1/Cas9 и sgRNA для B2M-1/Cas9 при молярных отношениях, составляющих 2,7:1 и 6,7:1 соответственно.

Для определения процента свободной Cas9, обнаруживаемой в RNP-комплексах, смеси sgRNA для TA-1 (TA-1; SEQ ID NO: 2) и Cas9 (Cas9; SEQ ID NO: 1), и sgRNA для B2M-1 (B2M-1; SEQ ID NO: 6) и Cas9 (Cas9; SEQ ID NO: 1) готовили при молярных отношениях, составляющих 2,7:1 и 6,7:1 соответственно. Смеси инкубировали в течение 10 минут, а затем анализировали с помощью СЕХ HPLC для количественного определения количества свободной Cas9. Как показано в **таблице 13**, низкий процент свободной Cas9, обнаруженный в смесях, свидетельствует об эффективном составлении RNP-комплексов.

**Таблица 13.** Процент свободной Cas9 в RNP-комплексах.

	<b>Свободная Cas9 (%)</b>
B2M-1	16 $\pm$ 2 (n=9)
TA-1	3 $\pm$ 2 (n=9)

Эти результаты демонстрируют, что инкубация Cas9 и sgRNA приводит к тому, что большая часть Cas9 содержится в пределах RNP-комплекса.

#### *Разработка производственного процесса*

##### (i) Исследовательский процесс

В общей сложности 22 исследовательские партии получили в процессах исследовательского масштаба с применением T-клеток от 17 здоровых добровольцев. Условия, идентифицированные для процесса исследовательского масштаба, проверяли и корректировали для увеличения масштаба, чтобы осуществить процесс опытного масштаба. В конечном итоге, самые важные исходные материалы из источников, полученных в соответствии с GMP, оценивали в отношении подготовки клинических материалов в процессе клинического масштаба. Фактически, процесс опытного масштаба

и процесс клинического масштаба являются функционально идентичными.

Процесс исследовательского масштаба проводили в соответствии с теми же стадиями, что и процесс, проиллюстрированный на **фиг. 7А**. Вкратце, Т-клетки либо из замороженных флаконов с РВМС (партии 1-14, 16, 21, 22), либо из замороженных Т-клеток, обогащенных из продуктов лейкофереза (партии 12-15, 17-20), активировали с помощью частиц коллоидной наноматрицы, конъюгированных с агонистами CD3/CD28 в течение 2-3 дней в "среде для Т-клеток", состоящей из X-VIVO™ 15 без гентамицина или фенолового красного, 5% человеческой сыворотки крови АВ, rhIL-2 и rhIL-7. На 2<sup>-ой</sup> или 3<sup>-ий</sup> день коллоидную полимерную наноматрицу, конъюгированную с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28, либо разбавляли свежей средой, либо удаляли путем промывки клеток и центрифугирования. На следующий день Т-клетки подвергали электропорации с помощью Cas9 и sgRNA с применением систем для трансфекции на основе электропорации, включая системы для трансфекции на основе проточной электропорации.

Через примерно 20-60 минут после электропорации клетки оставляли необработанными или инфицировали с помощью AAV6 гAAV-138 при MOI, составляющем либо 20000, либо 50000 генокопий на клетку. Через примерно 1 час после инфицирования клетки промывали и высевали в среду для Т-клеток.

Через примерно 1 неделю после редактирования генома клетки оценивали в отношении нокаута TCR $\alpha\beta$ / $\beta$ 2M и экспрессии CAR с помощью проточной цитометрии. Впоследствии рассчитывали процентную долю клеток, которые были TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup>, B2M<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> и CAR<sup>+</sup>.

Процентная доля клеток, которые утратили поверхностную экспрессию TCR $\alpha\beta$  и B2M после генного редактирования и которые экспрессировали обнаруживаемый CAR на клеточной поверхности, оценивали с помощью проточной цитометрии для каждого процесса (**таблица 14**). Во всех исследовательских партиях (n=22) 43 ± 16% (18-72%) клеток достигали требуемой поверхностной экспрессии CAR к CD19, при этом также проявляли утрату поверхностной экспрессии TCR $\alpha\beta$  (98 ± 0,66%, 97-99%) и B2M (79 ± 9,6%, 54-86%) (**таблица 14**). Аналогичные результаты получали для процесса опытного масштаба и процесса клинического масштаба (**таблица 14**). В среднем процентная доля клеток, которые подверглись полному редактированию (TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup>B2M<sup>-</sup>CAR<sup>+</sup>) в исследовательских партиях составила 31 ± 13% (15-59%).

Поверхностная экспрессия CD3 $\zeta$  является зависимой от образования комплекса с TCR. Таким образом, он выступает функциональным биохимическим маркером утраты TCR в дополнение к маркеру, представляющему собой TCR $\alpha\beta$ . Утрата поверхностной экспрессии CD3 $\zeta$  в среднем составляла 96 ± 3,5% (85-99%) в исследовательских партиях.

Частоты CD4/CD8 у субпопуляций сравнивали с контрольными Т-клетками, обработанными с помощью электропорации без компонентов системы генного редактирования. В случае исследовательских партий отредактированные клетки (TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup>B2M<sup>-</sup>CAR<sup>+</sup>, партии 1-11, 16-22) содержали в среднем 50 ± 12% CD4 клеток и 45 ± 14%

CD8 клеток. Подвергнутые электропорации и контрольные Т-клетки (партии 1-11, 16-21) содержали  $57 \pm 12\%$  CD4 клеток и  $40 \pm 12\%$  CD8 клеток. Статистически значимых отличий между частотами CD4 или CD8 при сравнении отредактированных и контрольных Т-клеток не наблюдали (непарный двусторонний t-критерий Стьюдента).

(ii) Опытный и клинический процессы

Исследовательский процесс переводили на аппаратуру в соответствии с GMP для увеличения масштаба и производства клинического материала. Условия, идентифицированные для исследовательского процесса, проверяли и корректировали для увеличения масштаба (опытный процесс). Наконец, самые важные исходные материалы из источников, полученных в соответствии с GMP, оценивали (клинический процесс) в отношении подготовки клинических материалов. Фактически, опытный и клинический процессы являются функционально идентичными. Результаты представлены в **таблице 14** ниже.

(iii) Сопоставимость генного редактирования в разных производственных процессах

Сравнение результатов, полученных для клинических партий, с партиями, полученными в исследовательском процессе и при начальном увеличении масштаба, а также неклиническими партиями представлено в **таблице 14**.

**Таблица 14.** Результаты для разных производственных процессов

Параметр	Процесс	Процесс	Процесс
	исследовательского масштаба	опытного масштаба	клинического масштаба
Жизнеспособность клеток (%)	N.D.	$86,4 \pm 7,1$	$92,5$ (среднее, $n=2$ )
% CAR <sup>+</sup> Т-клеток	$43,0 \pm 16,0$	$49,0 \pm 12,7$	$58,0 \pm 12,0$
CD3 $\zeta$	$96 \pm 3,5$	N.D.	N.D.
% TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>	$98,0 \pm 0,7$	$99,8 \pm 0,2$	$99,8 \pm 0,1$
% B2M <sup>+</sup>	$79,0 \pm 9,6$	$84,8 \pm 1,6$	$83,9 \pm 1,1$

*Оценка параметров процесса*

Рабочие параметры производства оценивали в серии мелкомасштабных и полномасштабных экспериментов, которые обобщены в **таблице 15**.

**Таблица 15.** Результаты исследования разработки процесса

Параметр	Результаты и выводы
<b>Обогащение Т-клеток</b>	

Выделение CD4_CD8 T-клеток с помощью автоматизированной системы обработки клеток	T-клетки, выделенные с применением программы обогащения CD4_CD8, характеризовались высокой чистотой и жизнеспособностью.
<b>Активация T-клеток</b>	
Активация T-клеток в газопроницаемой системе быстрого размножения: плотность клеток, концентрация клеток, коллоидная полимерная наноматрица, конъюгированная с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28, доза и разведение	Нижеприведенные условия идентифицированы как обеспечивающие достижение требуемого редактирования и размножения клеток для производства СТХ110: 1) плотность высевания клеток: $2 \times 10^6/\text{см}^2$ ; 2) концентрация клеток при высевании: $2 \times 10^6/\text{мл}$ ; 3) коллоидная полимерная наноматрица, конъюгированная с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28: 40 мкл/ $1 \times 10^6$ клеток; 4) 10X разведение коллоидной полимерной наноматрицы, конъюгированной с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28, через 48 часов после активации
<b>Электропорация и трансдукция</b>	
Концентрация sgRNA и Cas9	Концентрации sgRNA для TA-1 от 37,5 до 150 мкг/мл, концентрации sgRNA для B2M-1 от 75 до 150 мкг/мл и концентрация Cas9, составляющая 300 мкг/мл, обеспечивают достижение сопоставимой эффективности редактирования TCR $\alpha\beta$ и B2M. Для конечного производственного процесса выбирали следующие условия: 0,08 мг/мл TA-1, 0,2 мг/мл B2M-1 и 0,3 мг/мл Cas9.

Концентрация клеток	<p>Клетки с концентрацией, находящейся в диапазоне <math>100-400 \times 10^6</math> клеток/мл, инкубировали с фиксированными концентрациями RNP (gRNA для B2M-1, TA-1 и Cas9 при 150 мкг/мл, 150 мкг/мл и 300 мкг/мл соответственно).</p> <p>При концентрации клеток, составляющей <math>100-300 \times 10^6</math> клеток/мл, B2M<sup>+</sup> и TCRαβ<sup>+</sup> субпопуляции составляли &gt;80% и &gt;98% соответственно.</p> <p>При концентрации клеток, составляющей <math>400 \times 10^6</math> клеток/мл, B2M<sup>+</sup> и TCRαβ<sup>+</sup> субпопуляции составляли &lt;80% и &lt;87%, что демонстрирует более низкую эффективность.</p>
Влияние среды для EP во время электропорации	Сопоставимую эффективность редактирования TCRαβ и B2M и экспрессию CAR достигали при наличии не более 10% среды во время электропорации, что указывает на отсутствие отрицательного влияния остаточной среды на редактирование CTX110.
Трансдукция gAAV-138	<p>Клинический процесс трансдукции AAV включает:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) удаление стадии промывки до и после трансдукции AAV;</li> <li>2) плотность клеток при трансдукции AAV: <math>10 \times 10^6</math>/мл;</li> <li>3) MOI AAV: 20000 (определена на основе серий).</li> </ol>
<b>Размножение клеток</b>	
Плотность высевания в случае сосуда для культивирования в газопроницаемой системе быстрого размножения	<p>Проверяли значения плотности высевания от <math>3 \times 10^5</math> клеток/см<sup>2</sup> до <math>5 \times 10^5</math> клеток/см<sup>2</sup> после электропорации.</p> <p>Клетки, посеянные в количестве <math>3-5 \times 10^5</math> клеток/см<sup>2</sup>, достигали конечной плотности клеток, составляющей от приблизительно <math>30 \times 10^6</math> клеток/см<sup>2</sup> до <math>50 \times 10^6</math> клеток/см<sup>2</sup>, после культивирования в течение 7-9 дней.</p>

<p>Размножение клеток в разноразмерных сосудах для культивирования в газопроницаемой системе быстрого размножения</p>	<p>Возможность масштабирования размножения клеток с помощью газопроницаемой системы быстрого размножения оценивали путем сравнения размножения клеток при высевании в газопроницаемые устройства для культивирования клеток с газопроницаемой мембранной поверхностью площадью 60 см<sup>2</sup>, 100 см<sup>2</sup> и 500 см<sup>2</sup>. Результаты указывают на то, что модифицированные Т-клетки могут достигать сопоставимого кратного размножения в сосудах разных размеров с одинаковой плотностью клеток при сборе, тем самым поддерживая процедуру применения сателлитного высевания в газопроницаемое устройство для культивирования клеток с газопроницаемой мембранной поверхностью площадью 60 см<sup>2</sup> для отслеживания размножения клеток в газопроницаемом устройстве для культивирования клеток с газопроницаемой мембранной поверхностью площадью 500 см<sup>2</sup> при производственном процессе для СТХ110.</p>
<p><b>Деплеция TCRαβ<sup>+</sup> клеток</b></p>	
<p>Оценка фактических результатов деплеции</p>	<p>Адаптированную программу деплеции по TCRαβ разрабатывали с применением автоматизированной системы обработки клеток. Фактические результаты процесса деплеции с этой программой оценивали на протяжении 4 партий, при этом демонстрируется высокая эффективность деплеции (введение 2% → выход &lt; LOQ TCRαβ<sup>+</sup> клеток) при 70% среднем извлечении клеток и &gt; 90% жизнеспособности.</p>

**ПРИМЕР 8.** Способы получения генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих CAR к ВСМА и имеющих генетически нарушенные гены TRAC и β2M (СТХ120).

СТХ120 представляет собой средство иммунотерапии на основе Т-клеток, направленных на ВСМА, состоящее из аллогенных Т-клеток, которые являются генетически модифицированными *ex vivo* с применением компонентов системы генного редактирования CRISPR/Cas9 (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR-ассоциированный белок 9) (sgRNA (одиночная направляющая РНК) и нуклеаза Cas9).

Модификации включают целевое нарушение локусов TRAC и B2M и вставку трансгена химерного антигенного рецептора (CAR) к BCMA в локус TRAC с применением вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV166, rAAV серотипа 6, кодирующий химерный Т-клеточный антигенный рецептор, направленный на BCMA).

CAR состоит из гуманизированного одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), специфического в отношении BCMA, за которым следует шарнирная область и трансмембранная область CD8, которая слита с внутриклеточными сигнальными доменами для CD137 (4-1BB) и CD3 $\zeta$ . Экспрессией CTX120 CAR управляет промотор гена фактора элонгации 1 альфа (EF-1 $\alpha$ ).

Производственный процесс для CTX120 показан на **фиг. 8А**. Структурная информация об исходных материалах, включая нуклеазу Cas9 бактериального происхождения; две одиночные направляющие РНК (sgRNA), TA-1, нацеливающуюся на локус TRAC, и B2M-1, нацеливающуюся на локус  $\beta$ 2M, представлена в **примере 7** выше. Аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности CAR к BCMA в векторе на основе rAAV представлены ниже (таблицы 16 и 17):

**Таблица 16. Нуклеотидные последовательности компонентов конструкции CAR к BCMA**

Название	Нуклеотидная последовательность	SEQ ID NO:
CTX-166b rAAV	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCC CGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAG GGGTTCCCTGCGGCCGCACGCGTGAGATGTAAGGAGCTGCTG TGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTG GGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCT ATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCC CAACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTCTGCTAAT GCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATG TACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCSTTAC TCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTAT TAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATT TCAGGTTTCCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACG TTCAGTAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGT GCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCT AAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGC	55

CAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGG  
ACTCCAGCCTGGGTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATG  
TCCTAACCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCT  
GACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGA  
CAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAA  
TGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACA  
AAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGG  
TGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGG  
AGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAG  
AGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTA  
CTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAT  
AAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTT  
TGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCG  
GGCCTGGCCTCTTTACGGGTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAA  
TACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCT  
TCGGGTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTT  
AAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTG  
GGCGCTGGGGCCGCGCGGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGC  
GCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAAT  
TTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGT  
CTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTT  
TTTGGGGCCGCGGGCGGGCAGGGGCCCGTGCGTCCAGCG  
CACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGA  
GAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTG  
GTGCCTGGCCTCGCGCCGCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCG  
GCAAGGCTGGCCCGGTCCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAG  
ATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGA  
GGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCAC  
ACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCAT  
GTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGAT  
TAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGG  
GAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGT  
GGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCT  
CCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCT  
CAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTCA

GGTGTCGTGACCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCT  
CCTCCCCTTGGCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGT  
GCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGCTCAAGAAGCCCCGGA  
GCCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCAACACCCT  
GACCAACTACGTGATCCACTGGGTGAGACAAGCCCCCGGCC  
AAAGGCTGGAGTGGATGGGCTACATCCTGCCCTACAACGAC  
CTGACCAAGTACAGCCAGAAGTTCCAGGGCAGGGTGACCAT  
CACCAGGGATAAGAGCGCCTCCACCGCCTATATGGAGCTGA  
GCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGTACA  
AGGTGGGACTGGGACGGCTTCTTTGACCCCTGGGGCCAGGG  
CACAACAGTGACCGTCAGCAGCGGCGGCGGAGGCAGCGGC  
GGCGGCGGCAGCGGCGGAGGCGGAAGCGAAATCGTGATGA  
CCCAGAGCCCCGCCACACTGAGCGTGAGCCCTGGCGAGAGG  
GCCAGCATCTCCTGCAGGGCTAGCCAAAGCCTGGTGCACAG  
CAACGGCAACACCCACCTGCACTGGTACCAGCAGAGACCCG  
GACAGGCTCCCAGGCTGCTGATCTACAGCGTGAGCAACAGG  
TTCTCCGAGGTGCCTGCCAGGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGG  
CACCGACTTTACCCTGACCATCAGCAGCGTGGAGTCCGAGG  
ACTTCGCCGTGTATTACTGCAGCCAGACCAGCCACATCCCTT  
ACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAAAGTGCT  
GCTGCCTTTGTCCCAGGATTTCTCCCAGCCAAACCGACCACG  
ACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCC  
TCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCC  
GCCGGGGGTGCTGTTCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGT  
GATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGGCCTC  
CTTTTGTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGA  
ATCGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAA  
CAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGA  
TGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGAT  
GTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCG  
GCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAA  
TTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCC  
GGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAA  
GAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATA  
AGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGA

ACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGT  
 TGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATG  
 CAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATAAAAATCGCTATCCATC  
 GAAGATGGATGTGTGTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAACAA  
 ATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTAT  
 TCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCT  
 TTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCA  
 GGTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAACTCCTC  
 TGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAACCCTC  
 TTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAG  
 AATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGG  
 AGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAAGTGGAGTTC  
 CTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTTACTGCTC  
 TTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCT  
 TATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAA  
 GTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGAT  
 TGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAA  
 TTA AAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCAT  
 TCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAA  
 ATA ACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAA  
 AACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTG  
 AAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGG  
 GAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAG  
 AAAGGTAACCACGTGCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCCTC  
 CCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC  
 GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCC  
 CGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG  
 AGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

5' ITR CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCC 38  
 CGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCCGCCCGGCCTCAGTGAGCG  
 AGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAAGTCCATCACTAG  
 GGGTTCCT

3' ITR AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGC 39  
 GCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCG  
 ACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG

CGCGCAGCTGCCTGCAGG

LHA-RHA GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATAT 76  
CGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTG  
ATTTATAGTTCAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCT  
GGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATA  
AACCTCCCATTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGAC  
CACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTT  
TTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGG  
GGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAGAATAAGCAGTA  
TTATTAAGTAGCCCTGCATTTACAGGTTTCCTTGAGTGGCAGG  
CCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTG  
GCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCA  
TCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAG  
CATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTT  
GTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAA  
AGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTCTTGTC  
CACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGA  
GAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCG  
ATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTG  
ATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCT  
ATGGACTTCAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCA  
CATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCTGGC  
AATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTG  
GGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGG  
TGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG  
TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTG  
CCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATG  
GCCCTTGCGTGCCTTGAATTAATTCCACTGGCTGCAGTACGT  
GATTCTTGATCCCAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGA  
GTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTT  
GAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGA  
ATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAG  
TCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTT  
TTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTG  
CACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCCGGGCGGGCGACGG

GGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCC  
TGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAA  
GCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCGGTGT  
ATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTCGGCACC  
AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTG  
CAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCG  
GGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGT  
CCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCG  
CCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACG  
TCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTT  
CCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTG  
GCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTT  
GGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGT  
TTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGACCACCATGGCGCTTCC  
GGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGTTGCTCCACGC  
AGCAAGGCCCGCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAG  
CTCAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGC  
CAGCGGCAACACCCTGACCAACTACGTGATCCACTGGGTGA  
GACAAGCCCCCGGCCAAAGGCTGGAGTGGATGGGCTACATC  
CTGCCCTACAACGACCTGACCAAGTACAGCCAGAAGTTCCA  
GGGCAGGGTGACCATCACCAGGGATAAGAGCGCCTCCACCG  
CCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCT  
GTGTACTACTGTACAAGGTGGGACTGGGACGGCTTCTTTGA  
CCCCTGGGGCCAGGGCACAAAGTACCGTCAGCAGCGGCG  
GCGGAGGCAGCGGCGGCGGCGGAGCGGAGGCGGAAG  
CGAAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACACTGAGCGTGA  
GCCCTGGCGAGAGGGCCAGCATCTCCTGCAGGGCTAGCCAA  
AGCCTGGTGACAGCAACGGCAACACCCACCTGCACTGGTA  
CCAGCAGAGACCCGGACAGGCTCCCAGGCTGCTGATCTACA  
GCGTGAGCAACAGGTTCTCCGAGGTGCCTGCCAGGTTTAGC  
GGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCAG  
CGTGGAGTCCGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCAGCCAGA  
CCAGCCACATCCCTTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTG  
GAGATCAAAAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCCA  
GCCAAACCGACCACGACTCCC GCCCCGCGCCCTCCGACACC

CGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGA  
GGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTTCATACGAGGG  
GCTTGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGG  
CGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTGCTACTCGTTATTACTTT  
GTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAAA  
CTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAA  
ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGA  
AGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCC  
GAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCA  
GCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATG  
ACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGG  
GGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTAC  
AATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGA  
AATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCAC  
GATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATAC  
GTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAAT  
AATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTT  
TTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACG  
CCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCA  
GCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCC  
TTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAA  
TGATGTCTAAAACCTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCC  
ATTGCCACCAAACCCCTTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCT  
TGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGAT  
GAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCA  
GTCTCTCCAACCTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGAC  
TGTTTGCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCT  
TCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAA  
ATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCAT  
TAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACC  
AGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAGTCAGATGAGGGGT  
GTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCT  
GTCAGCTGGGAAAAGTCCAATAACTTCAGATTGGAATGTG  
TTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAA  
AGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATA

CCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCT  
GGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGG

TRAC- GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATAT 40  
LHA CGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTG  
(800 п. о.) ATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCT  
GGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATAACCATA  
AACCTCCCATTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGAC  
CACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTT  
TTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGG  
GGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAGAATAAGCAGTA  
TTATTAAGTAGCCCTGCATTTAGGTTTCCTTGAGTGGCAGG  
CCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTG  
GCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCA  
TCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAG  
CATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTT  
GTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAA  
AGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTCTTGTC  
CACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGA  
GAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCG  
ATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTG  
ATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCT  
ATGGACTTCA

TRAC- TGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAA 41  
RHA CAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAG  
(800 п. о.) GTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTT  
CAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATG  
TCTAAAACCTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGC  
CACCAAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCC  
TGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAG  
AGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTC  
TCCAACCTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTT  
GCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCC  
AAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTT  
CCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCC  
ACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGT



GCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCG  
 AGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGC  
 AAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGC  
 CGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAG  
 ACCCGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCA  
 AGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCG  
 GAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGAC  
 GGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACG  
 GCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCT  
 GCCTCCAGA

scFv-фрагмент антитела к ВСМА (CTX-166 и CTX-166b)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGCTCAAGAAGC CCGGAGCCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCAAC ACCCTGACCAACTACGTGATCCACTGGGTGAGACAAGCCCC CGGCCAAAGGCTGGAGTGGATGGGCTACATCCTGCCCTACA ACGACCTGACCAAGTACAGCCAGAAGTTCCAGGGCAGGGTG ACCATCACCAGGGATAAGAGCGCCTCCACCGCCTATATGGA GCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCTGTGTACTACT GTACAAGGTGGGACTGGGACGGCTTCTTTGACCCCTGGGGC CAGGGCACAACAGTGACCGTCAGCAGCGGCGGGCGGAGGCA GCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGCGGAAGCGAAATCGT GATGACCCAGAGCCCCGCCACACTGAGCGTGAGCCCTGGCG AGAGGGCCAGCATCTCCTGCAGGGCTAGCCAAAGCCTGGTG CACAGCAACGGCAACACCCACCTGCACTGGTACCAGCAGAG ACCCGGACAGGCTCCCAGGCTGCTGATCTACAGCGTGAGCA ACAGGTTCTCCGAGGTGCCTGCCAGGTTTAGCGGCAGCGGA AGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCAGCGTGGAGTC CGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCAGCCAGACCAGCCACA TCCCTTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAA AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACC ATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCT GTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGA ACTG	57
Нуклеотидная последовательность 4-1BB		58

Аминокис лотная последова тельность 4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	59
CD3-дзета	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCA GCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGAC GCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGA GACCCGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCC AAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGC GGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGA CGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTAC GGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCC TGCCTCCCAGA	31
EF-1 $\alpha$ Промотор	GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCAC AGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCG GTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGA TGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGA ACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCG CAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTG GTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCG TGCCTTGAATTACTIONTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGA TCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGC CTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGG CCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGG CACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCC ATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGC AAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGT ATTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGC GTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGC GGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGG CCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCG CCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAAGTTGCGTG AGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCT CAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGA	42

GTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCG  
 TCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGG  
 CACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTA  
 GGTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTCCCCACAC  
 TGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGA  
 TGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTG  
 GTTCATTTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCT  
 TCCATTTTCAGGTGTCGTGA

3'-поли А ААТААААТСГСТАТССАТСГААГАТГГАТГТГТГТТГГТТТТ 60  
 ТТГТГТГ

**Таблица 17.** Аминокислотные последовательности компонентов конструкции CAR  
 к ВСМА

<b>Название</b>	<b>Аминокислотная последовательность</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
CAR (CTX-166b)	MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVQSGAELKKPGASV KVSCKASGNTLTNYVIHWVRQAPGQRLEWMGYILPYNDL TKYSQKFQGRVTITRDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCT RWDWDGFFDPWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSEI VMTQSPATLSVSPGERASISCRASQSLVHSNGNTHLHWYQ QRPQGAPRLLIYSVSNRFSEVPARFSGSGSGTDFTLTSSVE SEDFAVYYCSQTSHPYTFGGGTKLEIKSAAAFVPVFLPAK PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	61

scFv		QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGNTLTNYVIHWVRQ	62
(CTX-166		APGQRLEWMGYILPYNDLTKYSQKFQGRVTITRDKSAST	
(BCMA-11	и	AYMELSSLRSEDNAVYYCTRWDWDGFFDPWGQGTTVTV	
CTX-166b)		SSGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERASISCR	
		ASQSLVHSNGNTHLHWYQQRPGQAPRLLIYSVSNRFSEVP	
		ARFSGSGSGTDFTLTISSVESEDFAVYYCSQTSHIPYTFGGG	
		TKLEIK	
V <sub>H</sub> (CTX-166)		QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGNTLTNYVIHWVRQ	63
		APGQRLEWMGYILPYNDLTKYSQKFQGRVTITRDKSAST	
		AYMELSSLRSEDNAVYYCTRWDWDGFFDPWGQGTTVTV	
		SS	
V <sub>L</sub> (CTX-166)		EIVMTQSPATLSVSPGERASISCRASQSLVHSNGNTHLHW	64
		YQQRPGQAPRLLIYSVSNRFSEVPARFSGSGSGTDFTLTISS	
		VESEDFAVYYCSQTSHIPYTFGGG	
		TKLEIK	
CDR1		RASQSLVHSNGNTHLH	65
V <sub>L</sub>	(Kabat		
CDR2	или	SVSNR	66
V <sub>L</sub>	Chothia		
CDR3	)	SQTSHIPYT	67
V <sub>L</sub>			
CDR1		NYVIH	68
V <sub>H</sub>			
CDR2	(Kabat)	YILPYNDLTKYSQKFQG	69
V <sub>H</sub>			
CDR3		WDWDGFFDP	70
V <sub>H</sub>			
CDR1		GNTLTNY	71
V <sub>H</sub>			
CDR2	(Chothi	LPYNDL	72
V <sub>H</sub>	a)		
CDR3		WDWDGFFDP	73
V <sub>H</sub>			
Линкер		GGGGSGGGGSGGGGS	74

Сигнальный пептид CD8	MALPVTALLLPLALLLHAARP	75
Трансмембранный домен CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY	34
4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL	59
CD3-дзета	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	35

Производство лекарственной субстанции CTX120 предусматривало размораживание обогащенных Т-клеток с последующей активацией и электропорацией/трансдукцией, и после чего клетки размножали. После размножения TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> клетки подвергали деплеции. Клетки культивировали на протяжении ночи, собирали и отбирали образцы для тестирования лекарственной субстанции. См. **фиг. 8А**. Повторную обработку не осуществляли ни на какой стадии производства CTX120.

#### *Обогащение Т-клеток*

Т-клетки обогащали из материалов лейкофереза (Лейкопаки) с помощью магнитного разделения с применением смеси магнитных гранул, покрытых антителом к CD8 и антителом к CD4, с применением автоматизированной системы обработки клеток. Перед обогащением из Лейкопаков отбирали образцы для подсчета и оценки жизнеспособности клеток ( $\geq 80\%$ ). Обогащенные клетки выделяли в буфере PBS/EDTA с HSA, а затем отбирали образцы для подсчета клеток, оценки жизнеспособности ( $\geq 80\%$ ), чистоты Т-клеток ( $\geq 70\%$  CD3) и стерильности. Затем клетки центрифугировали при  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  и ресуспендировали в CryoStor CS5 при целевой концентрации, составляющей  $50 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл.

#### *Криоконсервация Т-клеток*

Отбирали образцы клеток для подсчета клеток, оценки жизнеспособности ( $\geq 80\%$ ), и затем аликвоты помещали в этилвинилацетатные криопакеты при целевом числе клеток  $2500 \times 10^6$  клеток/пакет (30-70 мл клеточной суспензии). Одного Лейкопака было достаточно для получения 1-2 пакетов Т-клеток. Каждый пакет запаивали, маркировали, хранили при  $2-8^\circ\text{C}$  до переноса в программируемую морозильную камеру, и впоследствии переносили в паровую фазу жидкого азота для хранения.

#### *Размораживание и активация Т-клеток*

Один замороженный пакет с обогащенными Т-клетками размораживали, переносили в пакет объемом 3 л и разводили в дополненной среде X-VIVO™ 15 (X-VIVO™ 15, 5% человеческой сыворотки, 100 МЕ/мл rhIL2, 100 МЕ/мл rhIL7). Отбирали образцы клеток для подсчета и оценки жизнеспособности клеток ( $\geq 70\%$ ). Клетки центрифугировали при 540g при  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 15 минут. Затем клетки

ресуспендировали в дополненной среде X-VIVO™ 15 и отбирали образцы для подсчета и оценки жизнеспособности клеток ( $\geq 70\%$ ). Для активации клеток добавляли растворимую коллоидную полимерную наноматрицу, конъюгированную с раствором рекомбинантных гуманизированных агонистов CD3 и CD28, в соотношении 1:12,5 (об./об.).

Клетки высевали при целевой плотности  $2 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл в два сосуда для статического культивирования клеток, при этом каждый содержал общий объем из примерно 500 мл дополненной среды X-VIVO™ 15/коллоидной полимерной наноматрицы, конъюгированной с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28. Сосуды для статического культивирования инкубировали при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  и  $5 \pm 1\%$   $\text{CO}_2$  в течение  $48 \pm 4$  часов. На протяжении всего процесса, всякий раз, когда с сосудами для статического культивирования проводили какие-то действия, их проверяли на наличие разрывов и протеканий, а также присутствие прозрачной желтой среды.

#### *Разведение*

Через два (2) дня в каждый сосуд для статического культивирования добавляли дополненную среду X-VIVO™ 15 до 5 л. Клетки далее инкубировали при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  и  $5 \pm 1\%$   $\text{CO}_2$  на протяжении ночи.

#### *Электропорация и трансдукция*

Объем дополненной среды X-VIVO™ 15 уменьшали до конечного объема, составляющего примерно 500 мл, с применением насоса, соединенного с погружной трубкой в сосуде для статического культивирования, который осторожно вращали для обеспечения ресуспендирования клеток в среде. Отбирали образцы клеток для подсчета и оценки жизнеспособности клеток ( $\geq 70\%$ ). Клетки переносили в центрифужные пробирки объемом 500 мл и центрифугировали при 540g при  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 15 минут. Клеточные осадки ресуспендировали в буфере для электропорации и снова центрифугировали при тех же условиях. Клетки ресуспендировали в буфере для электропорации второй раз до целевой концентрации, составляющей  $300 \times 10^6$  клеток/мл.

Нуклеазу Cas9 смешивали с sgRNA для TA-1 (нацеливающаяся на TCR) и с sgRNA для B2M-1 (нацеливающаяся на  $\beta 2\text{M}$ ) в отдельных микроцентрифужных пробирках. Каждый раствор инкубировали в течение не менее 10 минут при комнатной температуре для образования каждого рибонуклеопротеинового комплекса. Две смеси Cas9/gRNA объединяли и смешивали с клетками, доводя Cas9, TA-1 и B2M-1 до конечной концентрации, составляющей 0,3 мг/мл, 0,08 мг/мл и 0,2 мг/мл соответственно. Смесь разделяли на аликвоты и пипетированием загружали в кассету для электропорации. Кассеты закрывали крышками и последовательно подвергали электропорации с применением системы для трансфекции на основе проточной электропорации. После электропорации клетки из каждой кассеты объединяли в колбе Эрленмейера на 125 мл и инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение не менее 20 минут. Отбирали образцы клеток для оценки жизнеспособности ( $\geq 70\%$ ) и подсчета. Клетки разбавляли до  $10^7$  клеток/мл средой X-VIVO™ 15 и добавляли свежеразмороженный rAAV-166b при MOI, составляющей 20000 vg/клетку. Клетки инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  и  $5\%$   $\text{CO}_2$  в течение не менее 60 минут.

Влияние MOI на достижение требуемой экспрессии CAR<sup>+</sup> оценивали с применением опытной партии вектора (rAAV-166b). Клетки трансдуцировали при возрастающей MOI и определяли количественно % CAR<sup>+</sup>. Как показано на **фиг. 8В**, наблюдали экспрессию CAR, зависимую от дозы AAV. Экспрессия CAR достигала насыщения при MOI, составляющей около 10000, что подтверждает выбор MOI, составляющей 20000.

Образование двух рибонуклеопротеиновых комплексов (RNP) in situ осуществляли в соответствии с описаниями, приведенными в **примере 7** выше. См. также результаты, представленные в **таблице 13** выше.

Репарация, направляемая гомологией (HDR), представляет собой высокоточный клеточный механизм репарации двухнитевых разрывов ДНК. HDR применяют для введения гена CAR с матрицы AAV в требуемый локус TRAC с применением гомологичной последовательности на каждом конце гена CAR.

Для оценки введения CAR к ВСМА в локус TRAC разработали анализ ddPCR. Разрабатывали набор праймеров для ПЦР, специфических для сайта TRAC, чтобы проводить амплификацию интегрированной последовательности CAR к ВСМА и определять процент клеток со вставкой гена CAR. Три партии СТХ120 оценивали с помощью ddPCR, и % HDR показан в **таблице 18**. Эти результаты подтверждают вставку CAR к ВСМА в локусе TRAC.

**Таблица 18. Процент HDR в опытных партиях СТХ120**

Номер партии	% HDR
СТХ120-L-3	46,2%
СТХ120-L-4	43,2%
P22T090	34,6%

#### *Размножение клеток*

Клетки разбавляли дополненной средой X-VIVO™ 15, отбирали образцы для оценки жизнеспособности ( $\geq 70\%$ ) и подсчета клеток и высевали с плотностью  $0,2-0,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/см<sup>2</sup> в два сосуда для статического культивирования и один дополнительный сосуд для статического культивирования (сателлитная культура для отслеживания клеток). Сосуды для статического культивирования инкубировали при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  и  $5 \pm 1\%$  CO<sub>2</sub>. Клеточные культуры инкубировали не более 9 дней. В течение этого времени в культуры один раз в 3-4 дня вносили добавки 100 МЕ rhIL2 и rhIL7 на мл объема культуры. В сателлитном сосуде для статического культивирования клеток проводили тестирование для подсчета, оценки жизнеспособности и чистоты Т-клеток на всем протяжении размножения. Когда плотность клеток в сателлитном сосуде для культивирования достигала примерно  $30 \times 10^6/\text{см}^2$ , осуществляли деплецию по TCR $\alpha\beta$ . Если плотность клеток в сателлитном сосуде для культивирования не достигала  $30 \times 10^6/\text{см}^2$ , деплецию по TCR $\alpha\beta$  в основных культурах осуществляли в день 9.

#### *Деплеция по TCR $\alpha\beta$*

Среду в каждом сосуде для статического культивирования уменьшали до конечного объема, составляющего примерно 500 мл, с применением насоса, соединенного с погружной трубкой в сосуде для статического культивирования. После того удаления основной части среды сосуда для статического культивирования осторожно вращали для ресуспендирования клеток в среде.

Клетки переносили в центрифужные пробирки на 500 мл, снабженные погружными трубками, которые соединялись с сосудами для статического культивирования. Отбирали образцы клеток для оценки жизнеспособности ( $\geq 70\%$ ), подсчета и определения % CAR<sup>+</sup> клеток. Затем клетки центрифугировали при  $540 \times g$  при  $20 \pm 1^\circ C$  в течение 15 минут. Клеточные осадки ресуспендировали и объединяли в менее чем 650 мл смеси PBS/EDTA, содержащей 0,5% HSA. Клеточную суспензию переносили в стерильный пакет, который подключали к автоматизированной системе обработки клеток. В автоматизированной системе обработки клеток проводили инкубацию клетки с антителом к TCR $\alpha\beta$ , конъюгированным с биотином. Клетки промывали и инкубировали с магнитными гранулами, содержащими антитело к биотину, для деплеции TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> клеток с применением автоматизированной системы обработки клеток. Клетки тестировали для подсчета, оценки жизнеспособности клеток ( $\geq 70\%$ ) и определения % CAR<sup>+</sup> клеток.

#### *Восстановление клеток*

Подвергнутые деплеции клетки ресуспендировали в дополненной среде X-VIVO™ 15 и переносили в пакет(-ы) объемом 3 л, высевали в сосуд(-ы) для статического культивирования клеток и инкубировали на протяжении ночи при  $37 \pm 1^\circ C$  и  $5 \pm 1\% CO_2$ .

#### *Сбор клеток (лекарственная субстанция)*

Для сбора клеток сосуды для статического культивирования вынимали из инкубатора и оставляли отстояться для осаждения клеток. Ростовую среду из каждого сосуда для статического культивирования удаляли до конечного объема, составляющего примерно 500 мл, с применением насоса. Отбирали образцы удаленной среды для оценки стерильности. Сосуды для статического культивирования осторожно вращали для обеспечения ресуспендирования клеток в среде. Содержимое каждого сосуда для статического культивирования переносили в пакет для переноса объемом 3 л с применением насоса и фильтровали через 40-мкм фильтр для переливания крови под действием силы тяжести в отдельный стерильный пакет объемом 3 л. Отбирали образцы клеток для оценки концентрации и жизнеспособности.

*Фенотипы клеток CTX120, полученных с помощью производственного процесса, раскрытого в данном документе*

Опытные серии лекарственного продукта CTX120 анализировали в отношении популяций Т-клеток. Проточные панели показаны в **таблице 19**.

#### **Таблица 19. Проточные панели для характеристики популяций Т-клеток**

<b>Истощение</b>	<b>Субпопуляции</b>
CD4	CD4

CD8	CD8
CD95	CD45RO
CAR	CD45RA
CD57	CD62L
Lag3	CD27
PD1	CCR7

### *Маркеры истощения*

CD57, Lag3 и PD1 представляют собой маркеры, ассоциированные с истощением Т-клеток. Состояние истощения лекарственного продукта СТХ120 оценивали с применением маркеров, определенных в **таблице 19**. Как показано на **фиг. 8С** и в **таблице 20**, в CAR<sup>+</sup> клетках лекарственного продукта СТХ120 обнаруживали низкие уровни маркеров истощения.

**Таблица 20. Процент CAR<sup>+</sup> клеток с различными маркерами истощения**

Маркер	СТХ120-L-3	СТХ120-L-4	P22T090
% Lag3 <sup>+</sup>	8,19	5,99	2,46
% CD57 <sup>+</sup>	4,86	5,31	0,62
% PD1 <sup>+</sup>	2,83	4,36	2,66
% Tim3 <sup>+</sup>	5,15	4,03	7,01

Лекарственный продукт СТХ120 оценивали в отношении маркеров клеток памяти. При гейтировании по CD45RO маркерами, ассоциированными с центральной памятью, являются CD62L, CCR7 и CD27. При гейтировании по CD45RA маркером стволовых клеток памяти является CD62L. Клетки, которые являлись CD62L и CCR7<sup>+</sup>, были маркерами центральной памяти и стволовых клеток памяти. Результаты для CD8<sup>+</sup> Т-клеток показаны на **фиг. 8D** и в **таблице 21**. Результаты для CD4<sup>+</sup> Т-клеток показаны на **фиг. 8E** и в **таблице 22**.

**Таблица 21. Маркеры центральной памяти и стволовых клеток памяти в CD8<sup>+</sup> Т-клетках**

Маркер	Популяция	Т-	СТХ120-L-3	СТХ120-L-4	P22T090
	<b>клеток</b>				
CD45RA/CD62L	Стволовые	клетки	36,97	37,63	66,13
	памяти				
CD45RO/CD27	Клетки		48,93	50,77	59,90
	центральной				
	памяти				
CD45RO/CD62L	Клетки		28,63	44,63	83,03
	центральной				

	памяти			
CD45RO/CCR7	Клетки	9,28	15,20	41,47
	центральной			
	памяти			
CD62L/CCR7	Стволовые клетки	36,40	39,93	57,03
	памяти/клетки			
	центральной			
	памяти			

**Таблица 22. Маркеры центральной памяти и стволовых клеток памяти в CD4<sup>+</sup> Т-клетках**

Маркер	Популяция Т-клеток	СТХ120-L-3	СТХ120-L-4	P22T090
CD45RA/CD62L	Стволовые клетки памяти	50,13	41,00	54,10
CD45RO/CD27	Клетки центральной памяти	24,30	26,13	45,33
CD45RO/CD62L	Клетки центральной памяти	34,63	55,03	71,87
CD45RO/CCR7	Клетки центральной памяти	15,03	17,90	52,53
CD62L/CCR7	Стволовые клетки памяти/клетки центральной памяти	51,17	39,60	58,73

*Виды биологической активности СТХ120*

Разрабатывали два анализа, которые измеряют биологическую активность лекарственного продукта на основе CAR-T-клеток после стимуляции антигеном ВСМА. Во-первых, определяли секрецию IFN $\gamma$  после активации Т-клеток. Вкратце, CAR-T-клетки инкубировали с рекомбинантным ВСМА человека. После активации CAR-T-клеток уровень секретированного IFN $\gamma$  измеряли с помощью Meso-Scale Delivery (MSD). Результаты показаны на **фиг. 8F**.

Следующим шагом, оценивали способность CAR-T-клеток СТХ120 уничтожать положительные по ВСМА целевые клетки MM.1S с применением анализа

цитотоксичности на основе проточной цитометрии. Вкратце, целевые клетки метили с помощью eFluor670 и инкубировали с клетками СТХ120 при различных соотношениях. Цитотоксичность СТХ120 анализировали через 4 часа путем оценки меченых клеток при гейтировании по живым клеткам в сравнении с контрольным образцом. Результаты показаны на **фиг. 8G**. Все 3 опытные партии СТХ120 показали дозозависимую цитотоксичность в отношении целевых клеток.

В совокупности эти результаты продемонстрировали получение Т-клеток, экспрессирующих CAR к ВСМА. Т-клетки, экспрессирующие CAR к ВСМА, произведенные, как описано в данном документе, проявляли низкие уровни экспрессии TCR и  $\beta 2M$ , за счет чего снижается вероятность отторжения хозяином. Кроме того, Т-клетки, экспрессирующие CAR к ВСМА, проявляли нацеленное уничтожение положительных по ВСМА клеток после активации Т-клеток.

#### **ПРИМЕР 9. Идентификация оптимизированных условий для размножения Т-клеток для увеличения масштаба**

В этом примере сообщается об идентификации оптимальных условий высевания или пересева для наилучшего размножения Т-клеток и повышения выхода. В этом примере Т-клетки либо высевали при плотности ниже 500 тыс./см<sup>2</sup> в тот же день после редактирования, либо высевали при значениях плотности 500 тыс./см<sup>2</sup> и пересевали в разные дни после редактирования. Размножение клеток отслеживали с течением времени.

Вкратце, криоконсервированные Т-клетки из Лейкопака от здорового донора размораживали и активировали в течение 48 часов. Затем клетки подвергали электропорации в присутствии RNP-комплексов, содержащих Cas9 (150 мкг/мл) и sgRNA, нацеливающуюся на TCR (TA-1; SEQ ID NO: 2/Cas9; SEQ ID NO: 1) (80 мкг/мл), и Cas9 (150 мкг/мл) и sgRNA, нацеливающуюся на  $\beta 2M$  (B2M-1; SEQ ID NO: 6/Cas9; SEQ ID NO: 1) (200 мкг/мл). После электропорации клетки трансдуцировали с помощью gAAV из расчета MOI, составляющей 20000, а затем размножали в сосуде для статического культивирования. Подробности см. в **примерах 1-4** выше.

После редактирования клетки высевали из расчета 166 тыс./см<sup>2</sup>, 125 тыс./см<sup>2</sup> или 83 тыс./см<sup>2</sup> в сосуд для статического культивирования для размножения. Другой набор клеток высевали из расчета 500 тыс./см<sup>2</sup> после редактирования и пересевали в день 3, 4, 5, 6 или 7 после редактирования при соотношении 1:4 (1 сосуд разделяли на 4 новых сосуда) для дополнительного размножения. Клетки, которые пересевали из расчета 500 тыс./см<sup>2</sup> без пересева, применяли в качестве эталонной группы СТХ110. Все группы размножали до тех пор, пока плотность клеток не достигала  $3-4 \times 10^6$ /мл, после чего клетки собирали (**таблица 23**). Подсчет клеток и оценку их жизнеспособности проводили через каждые 1-3 дня.

**Таблица 23**

Группы	Моменты сбора	Ожидаемый выход	Дата сбора
--------	---------------	-----------------	------------

1	Эталон СТХ110 500 тыс.	$3 \times 10^6/\text{мл}$	1×	день 7
		$4 \times 10^6/\text{мл}$		
2	СТХ110 166 тыс.	$4 \times 10^6/\text{мл}$	3×	день 10 (+3 дня)
3	СТХ110 125 тыс.	$4 \times 10^6/\text{мл}$	4×	день 11 (+3 дня)
4	СТХ110 83 тыс.	$4 \times 10^6/\text{мл}$	6×	день 14 (+7 дней)
5	СТХ110, пересев в D3 с разделением 1:4	$4 \times 10^6/\text{мл}$	4×	день 10 (+3 дня)
6	СТХ110, пересев в D4 с разделением 1:4	$4 \times 10^6/\text{мл}$		день 10 (+3 дня)
7	СТХ110, пересев в D5 с разделением 1:4	$3 \times 10^6/\text{мл}$		день 10 (+3 дня)
		$4 \times 10^6/\text{мл}$		
8	СТХ110, пересев в D6 с разделением 1:4	$3 \times 10^6/\text{мл}$		день 18 (+11 дней)
		$4 \times 10^6/\text{мл}$		день 14 (+7 дней)
9	СТХ110, пересев в D7 с разделением 1:4	$3 \times 10^6/\text{мл}$		день 17 (+10 дней)
		$4 \times 10^6/\text{мл}$		день 18 (+11 дней)

Контрольный эталон СТХ110 (клетки, которые не пересевали) достигал концентрации, составляющей  $3-4 \times 10^6/\text{мл}$ , за 7 дней (**фиг. 9А-9В**). Клетки, пересеянные в день 3, 4 и 5 ("D3, D4, D5"), достигали концентрации клеток  $\sim 3-4 \times 10^6/\text{мл}$  в течение 10 дней (**фиг. 9А-9В**). Клетки, пересеянные в день 6 ("D6") и день 7 ("D7"), достигали концентрации клеток  $3-4 \times 10^6/\text{мл}$  через приблизительно 14-18 дней (**фиг. 9А-9В**). При этом группы D3, D4 и D5 достигали целевой концентрации клеток, составляющей  $3,0-4,0 \times 10^6/\text{мл}$ , на приблизительно 4-8 дней раньше, чем группы D6 и D7. Клетки, высеянные из расчета  $166 \text{ тыс.}/\text{см}^2$ ,  $125 \text{ тыс.}/\text{см}^2$  или  $83 \text{ тыс.}/\text{см}^2$ , достигали момента сбора через 10, 11 и 14 дней, что на 3, 4 и 7 дней дольше, чем у эталонной группы.

**На фиг. 10А и 10В** показано, что в общей сложности  $4-4,5e8$  клеток собирали из эталонной группы СТХ110 в день 7, в то время как общее число клеток, собранных из групп, пересеянных в день 3, 4, 5, 6 и 7, составляло от  $1,3e9$  до  $2e9$ , что в 3-5 раз превышало число клеток у контрольной эталонной группы СТХ110.

В общей сложности собрали  $1,2e9$ ,  $1,64e9$  и  $2,32e9$  клеток из групп, высеянных из расчета  $166 \text{ тыс.}/\text{см}^2$ ,  $125 \text{ тыс.}/\text{см}^2$  или  $83 \text{ тыс.}/\text{см}^2$ , что в 3-6 раз превышало число клеток по сравнению с контрольной эталонной группой СТХ110.

Жизнеспособность клеток во всех пересеянных группах и группах высеивания с низкой плотностью была подобной таковой в эталонной группе СТХ110. (**фиг. 11А и 11В**)

Определили, что пересев в D3, D4 и D5, высеивание из расчета  $166 \text{ тыс.}/\text{см}^2$  и высеивание из расчета  $125 \text{ тыс.}/\text{см}^2$  обеспечивали ожидаемое число клеток за наименьшее количество дней.

Эффективность редактирования, включая % CAR<sup>+</sup>, % TRAC<sup>-</sup> и % B2M<sup>-</sup>, оценивали

для всех групп с пересевом и высеванием с низкой плотностью (**фиг. 12А-12С**). % CAR<sup>+</sup> в эталонной группе СТХ110 составлял 55,9%. В группах с пересевом в D3, D4 и D5 % CAR<sup>+</sup> сохранялся на уровне 57,9%, 56% и 52,62%, в то время как в группах D6 и D7 произошло снижение % CAR<sup>+</sup> до 38,65% и 35,45%. % CAR<sup>+</sup> в группах 166 тыс./см<sup>2</sup>, 125 тыс./см<sup>2</sup> или 83 тыс./см<sup>2</sup> составлял 59,3%, 54,9% и 52,9% без значительных изменений относительно эталонной группы СТХ110. % TRAC<sup>-</sup> в эталонной группе СТХ110 составлял 94,24%. Группы с пересевом в D3, D4 и D5 и группа с высеванием из расчета 166 тыс./см<sup>2</sup> сохраняли сопоставимый % TRAC<sup>-</sup>, составляющий 93,5%, 93,6%, 93,15% и 93,9%. В группах 125 тыс./см<sup>2</sup> и 83 тыс./см<sup>2</sup> наблюдали незначительные снижения % TRAC<sup>-</sup>, составляющего 91,5% и 91,2%. В группах с пересевом в D6 и D7 наблюдали более высокие снижения % TRAC<sup>-</sup>, составляющего 88% и 87,2%. Аналогичную тенденцию также демонстрировал % В2М<sup>-</sup>. % В2М<sup>-</sup> в эталонной группе СТХ110 составлял 77,93%. Группы с пересевом в D3, D4 и D5 и группа с высеванием из расчета 166 тыс./см<sup>2</sup> сохраняли сопоставимый % TRAC<sup>-</sup>, составляющий 75,51%, 75,39%, 76,77% и 76,31%. В группах 125 тыс./см<sup>2</sup> и 83 тыс./см<sup>2</sup> наблюдали незначительные снижения % В2М<sup>-</sup>, составляющего 71,74% и 69,19%. В группах с пересевом в D6 и D7 наблюдали более высокие снижения % В2М<sup>-</sup>, составляющего 60,37% и 58,29%.

Определили, что пересев в D3, D4 и D5, высевание из расчета 166 тыс./см<sup>2</sup> и высевание из расчета 125 тыс./см<sup>2</sup> обеспечивали эффективность редактирования, наиболее сопоставимую с эталонной группой СТХ110.

Клеточные фенотипы пересейных популяций определяли с применением панелей, описанных в примере 8 и **таблице 19**, за исключением CD95, CD45RO, CD57, CD27 и ССR7 и включая Tim3. **На фиг. 13А и 13В** показано соотношение CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток в пересейных популяциях, а также в эталонной группе СТХ110. Соотношение CD4 и CD8 хорошо поддерживалось в группах с пересевом в D3, D4 и D5 и в группах высевания с низкой плотностью 166 тыс. и 125 тыс. Увеличение количества CD8<sup>+</sup> клеток наблюдали в группах с пересевом в D6 и D7, а также в группе высевания с низкой плотностью 83 тыс.

Пересейные популяции оценивали в отношении маркеров клеток памяти. В пределах CAR<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> популяции CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> клетки, CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> клетки, CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> клетки и CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> клетки определяли в качестве наивных Т-клеток, Т-клеток центральной памяти (СМ), эффекторных Т-клеток памяти (ЕМ) и терминальных эффекторных (ТЕ) Т-клеток соответственно. Эти популяции в пределах продукта СТХ110 определяли как субпопуляции. **На фиг. 14А-14Е** показан состав субпопуляций, обнаруженный в пересейных популяциях и группах высевания с низкой плотностью. В пределах CAR<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> популяций большинство пересейных групп и групп высевания с низкой плотностью продемонстрировало снижение количества наивных Т-клеток. Снижение количества Т-клеток центральной памяти обнаруживали в группах с пересевом в D6 и D7, но оно было незначительным в группах с пересевом в D3, D4 и D5. Большинство групп показало повышение количества эффекторных Т-клеток памяти. Повышение количества терминально

дифференцированных клеток наблюдали у  $CAR^+$  и  $CD8^+CAR^+$  клеток, но не у большинства  $CD4^+CAR^+$  клеток.

Как показано на **фиг. 15A-15F**, низкие уровни маркеров истощения обнаруживали в пересейанных  $CAR^+$ ,  $CD4^+/CAR^+$  и  $CD8^+/CAR^+$  популяциях. По сравнению с эталонной группой STX110 у пересейанных клеток групп D6 и D7 наблюдали повышенную экспрессию LAG3 (**фиг. 15A и 15C**) в одном из экспериментов. В целом повышенная экспрессия всех трех маркеров истощения (PD1, LAG3 и TIM3) отсутствовала. Экспрессия PD1 отсутствовала или была очень низкой во всех группах.

#### **Анализ уничтожения клеток in vitro**

Следующим шагом оценивали способность CAR-T-клеток в пересейанных группах или группах с низкой плотностью высевания уничтожать CD19-положительные целевые клетки Raji с применением анализа цитотоксичности на основе проточной цитометрии. Вкратце, целевые клетки метили с помощью eFluor670 и инкубировали с CAR-T-клетками при различных соотношениях. Цитотоксичность STX110 анализировали через 24 часа путем оценки меченых клеток при гейтировании по живым клеткам в сравнении с контрольным образцом. Результаты показаны на **фиг. 16A-16C**. Все пересейанные группы и группы высевания с низкой плотностью STX110 показали дозозависимую цитотоксичность в отношении целевых клеток на уровне, сопоставимом с эталонной группой STX110.

В целом, эти результаты in vitro демонстрируют, что пересев в D3, D4 и D5 и значения плотности высевания, составляющие 166 тыс./см<sup>2</sup> и 125 тыс./см<sup>2</sup>, обеспечивали достаточное размножение, эффективность редактирования и цитотоксичность, подобные эталонной группе STX110.

#### **In vivo исследование**

Следующим шагом, способность CAR-T-клеток в пересейанных группах и группах высевания с низкой плотностью уничтожать опухоли у мышей исследовали in vivo в двух независимых исследованиях (**таблицы 24 и 25**). Опухолевые клетки Nalm6-Fluc-GFP инокулировали мышам CIEA NOG за 4 дня до введения CAR-T-клеток. Ежедневная оценка биолюминесценции (BLI, фотон/с) позволяет оценить опухолевую нагрузку у мышей. В in vivo исследовании №1 клетки, пересейанные в D5, D6 и D7, а также эталон STX110 вводили в дозе 2e6, 4e6 и 10e6  $CAR^+$  клеток на мышь. На каждую группу и каждую дозу включали по шесть мышей. Необработанных мышей применяли в качестве отрицательного контроля. В in vivo исследовании №2 группе высевания с низкой плотностью (166 тыс./см<sup>2</sup>, 125 тыс./см<sup>2</sup> и 83 тыс./см<sup>2</sup>) и группам с пересевом (D3, D4 и D6) вводили дозу, составляющую 4e6  $CAR^+$  клеток на мышь. В каждую группу включали по 4 реципиента.

**Таблица 24. In vivo исследование 1**

	<b>Группы</b>	<b>Доза</b>	<b>Число реципиентов</b>
<b>1</b>	Необработанные	0	5

2	Эталон CTX110	$2 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	6
3		$4 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	6
4		$10 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	6
5	пересев в день 5 с разделением 1:4	$2 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	6
6		$4 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	6
7		$10 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	6
8	пересев в день 6 с разделением 1:4	$2 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	6
9		$4 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	6
10		$10 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	6
11	пересев в день 7 с разделением 1:4	$2 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	6
12		$4 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	6
13		$10 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	6

Таблица 25. In vivo исследование 2

	Группы	Доза	Число реципиентов
1	Необработанные		3
2	Эталон 110	$4 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	4
3	166 тыс./см <sup>2</sup> (3×)		4
4	125 тыс./см <sup>2</sup> (4×)		4
5	83 тыс./см <sup>2</sup> (6×)		4
6	пересев в день 3 с разделением 1:4		4
7	пересев в день 4 с разделением 1:4		4
8	пересев в день 5 с разделением 1:4		4

In vivo исследование № 1 указывало на сопоставимую выживаемость у группы с пересевом в D5 и эталонной группы CTX110 при всех трех дозах (фиг. 17А-17С). Группа высеваания из расчета 83 тыс./см<sup>2</sup> и 166 тыс./см<sup>2</sup> и группа с пересевом в D4 характеризовались более низкой выживаемостью по сравнению с другими тестируемыми группами, а также с эталонной группой CTX110 (фиг. 17D). Медианная выживаемость перечислена в таблицах 26 и 27.

Таблица 26. In vivo исследование 1

	Группы	Доза	Медианная выживаемость
1	Необработанные	0	26
2	Эталон CTX110	$2 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	34
3		$4 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	40,5

4		$10 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	66,5
5	пересев в день 5 с разделением 1:4	$2 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	33,5
6		$4 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	40,5
7		$10 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	79
8	пересев в день 6 с разделением 1:4	$2 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	28
9		$4 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	32
10		$10 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	34
11	пересев в день 7 с разделением 1:4	$2 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	30
12		$4 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	34
13		$10 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	43,5

Таблица 27. In vivo исследование 2

	Группы	Доза	Медианная выживаемость
1	Необработанные		25
2	Эталон 110	$4 \times 10^6 \text{ CAR}^+$	70,5
3	166 тыс./см <sup>2</sup> (3×)		68,5
4	125 тыс./см <sup>2</sup> (4×)		Не определено
5	83 тыс./см <sup>2</sup> (6×)		51,5
6	пересев в день 3 с разделением 1:4		68,5
7	пересев в день 4 с разделением 1:4		61,5
8	пересев в день 5 с разделением 1:4		Не определено

VLI у необработанных мышей в обоих исследованиях достигала состояния периморбидности, что указывало на высокую опухолевую нагрузку в день 25 и день 18. В исследовании №1 группы с пересевом в D6 и D7 продемонстрировали более раннее повышение VLI по сравнению с группой D5 и эталонной группой CTX110 при всех 3 дозах (2е6, 4е6 и 10е6  $\text{CAR}^+$  клеток на мышь; **фиг. 18А-18С** соответственно). Группа D5 и эталонная группа CTX110 продемонстрировали сходную кинетику роста опухоли. В исследовании №2 группа с высеванием из расчета 83 тыс./см<sup>2</sup> показала более быстрый рост опухоли, чем эталонная группа CTX110. Все другие тестируемые группы

продемонстрировали подобный или даже замедленный рост опухоли по сравнению с эталонной группой СТХ110 (фиг. 18D).

Согласно средней выживаемости и VLI группа с пересевом в D5, но не группы с пересевом в D6 и D7, сохраняли *in vivo* эффективность, как у эталонной группы СТХ110.

Продолжительность размножения, выход, редактирование, маркеры истощения/субпопуляций, активность *in vitro* и *in vivo* применяли для определения оптимальных значений плотности высевания и/или условий посева. Обобщенные сведения анализа показаны в таблице 28. Пересев в соотношении 1:4 в день 5 обеспечивало благоприятное размножение и эффективность редактирования.

**Таблица 28**

Группа	Выход	Период размножения	Редактирование	Истощение (CAR <sup>+</sup> )	Субпопуляции (CAR <sup>+</sup> )	Эффективность <i>in vitro</i>	Эффективность и персистенция <i>in vivo</i>
СТХ110 166 тыс.	3x	+3 дня	Сохранено			Сохранено	Сохранено
СТХ110 125 тыс.	4x	+3 дня	Снижено, но в пределах спецификации				Сохранено
СТХ110 83 тыс.	6x	+7 дней	Снижено, незначительно, но ниже спецификации				Нарушено
СТХ110, пересев в D3 с разделением 1:4	4x	+3 дня	Сохранено				Сохранено

СТХ110, пересев в D4 с разделение м 1:4		+3 дня	Сохранено				Рассматрив ается Нарушено
СТХ110, пересев в D5 с разделение м 1:4		+3 дня	Сохранено	Снижен ие ТiМ3; повыше ние TAG3, повыше ние PD1	Сопостав имо	Сохранен о	Сохранено
СТХ110, пересев в D6 с разделение м 1:4		+7 или 11 дней	Снижено	Снижен ие Тiм3, повыше ние LAG3	Повыше ние ТЕ	Сохранен о	Нарушено
СТХ110, пересев в D7 с разделение м 1:4		+10 или 11 дней	Снижено	Снижен ие Тiм3	Снижен ие наивных клеток	Сохранен о	Нарушено

**ПРИМЕР 10. Улучшенное размножение клеток**

(А) Оптимизированная электропорация для повышения выхода клеток СТХ110 и СТХ 120

В способах, описанных в настоящем изобретении, электропорация используется для доставки в Т-клетки-реципиенты различных нуклеиновых кислот и полипептидов, включая, например, различные рибонуклеопротеиновые (RNP) комплексы, содержащие комплексы Cas9 и направляющей РНК. Приборы, применяемые в процессе электропорации, конкретным образом не ограничены, так как любой подходящий прибор для электропорации от различных производителей может найти применение в способах,

описанных в данном документе. Плотность высевания клеток, применяемая при электропорации, конкретным образом не ограничивается.

В настоящем примере применяется прибор для электропорации, который способен осуществлять электропорацию повышенного числа клеток в кассетах, способных удерживать большие объемы при сохранении эффективного редактирования. Более высокая производительность электропорации повышает, например даже удваивает, выход любой данной сконструированной Т-клетки, например, продукта на основе сконструированной Т-клетки СТХ110 или СТХ120, за счет обеспечения большего числа отредактированных клеток для трансдукции и размножения. Это является преимуществом при производстве, поскольку повышенная производительность происходит без необходимости в повышении продолжительности процесса и/или удвоений клеток.

Например, дополнительные клетки доступны для высевания в дополнительные сосуды для культивирования Т-клеток (площадь газопроницаемой мембранной поверхности 500 см<sup>2</sup> с емкостью среды 5000 мл), например, в 2 или более дополнительных сосудов для культивирования. Например, при повышении числа клеток их можно высевать во вплоть до 4× сосудов для культивирования, при этом  $300e6 \leq x \leq 600e6$  клеток можно высевать в 2× сосуда для культивирования,  $600e6 \leq x \leq 800e6$  клеток можно высевать в 3× сосуда для культивирования или  $\leq 800e6$  клеток можно высевать в 4× сосуда для культивирования.

В некоторых аспектах в каждый сосуд для культивирования высевают от приблизительно 400000 клеток/см<sup>2</sup> до 500000 клеток/см<sup>2</sup>. В качестве альтернативы в каждый сосуд для культивирования высевают от приблизительно 250000 клеток/см<sup>2</sup> до 500000 клеток/см<sup>2</sup>, или в каждый сосуд для культивирования высевают от приблизительно 300000 клеток/см<sup>2</sup> до 500000 клеток/см<sup>2</sup>, или в каждый сосуд для культивирования высевают от приблизительно 150000 клеток/см<sup>2</sup> до 250000 клеток/см<sup>2</sup>, или в каждый сосуд для культивирования высевают от приблизительно 150000 клеток/см<sup>2</sup> до 500000 клеток/см<sup>2</sup>, или в каждый сосуд для культивирования высевают от приблизительно 150000 клеток/см<sup>2</sup> до 600000 клеток/см<sup>2</sup>.

В некоторых аспектах целевая плотность высевания составляет по меньшей мере приблизительно 150000 клеток/см<sup>2</sup>, или по меньшей мере приблизительно 250000 клеток/см<sup>2</sup>, или по меньшей мере приблизительно 300000 клеток/см<sup>2</sup>, или по меньшей мере приблизительно 400000 клеток/см<sup>2</sup>, или по меньшей мере приблизительно 500000 клеток/см<sup>2</sup>.

В некоторых аспектах целевая плотность высевания составляет приблизительно 250000 клеток/см<sup>2</sup>. В других аспектах целевая плотность высевания составляет приблизительно 500000 клеток/см<sup>2</sup>.

Можно использовать кассеты для электропорации, способные удерживать объемы вплоть до 1 мл. При применении этой системы можно подвергать электропорации  $2,7 \times 10^9$  клеток в кассетах G1000, количество которых составляет вплоть до семи. Извлечение клеток из кассет с помощью одноразовых игл с тупым концом, прикрепленных к шприцу

объемом 3 мл, также приведет к устранению риска выброса наконечника микропипетки в колбу Эрленмейера.

Применение системы с большей производительностью также облегчает стадию трансдукции клеток. Удвоение текущего максимума, составляющего  $7 \times 10^8$  клеток для трансдукции, до  $1,4 \times 10^9$  клеток приводит к получению достаточного материала для засева в вплоть до четырех сосудов для культивирования клеток с целью размножения. Следовательно, может сохраняться фиксированная деплеция в день 9, фактически вплоть до удвоения выхода за цикл при том же количестве времени обработки.

Другие стадии в примере не изменились по сравнению с приведенным выше.

*(B) Оптимизация метода и сравнение с применением трех серий от доноров T-клеток для повышения выхода лекарственного продукта*

В этом разделе описано получение CAR-T-клеток при  $1 \times$ ,  $2 \times$ ,  $4 \times$  и  $4 \times$  с разделением в день 4, чтобы продемонстрировать надежность способов с повышением размножения и получить материал для анализа сопоставимости между материалом, подобным текущему лекарственному продукту (DP), и выбранными условиями культивирования клеток.

Исходным материалом для этой партии был результат отбора CD4/CD8 T-клеток из трех серий афереза от здоровых доноров. Выбранные условия размножения CAR-T-клеток CTX110 представляли собой высевание в камеры G-Rex 500M-CS.

Предварительная плотность CTX110 CAR-T-клеток при высевании для размножения в G-Rex500M-CS и при сборе составляла  $500000/\text{см}^2$  и  $30 \times 10^6/\text{см}^2$  соответственно, при этом получили  $\leq 30 \times 10^9$  CAR-T-клеток. Настоящий пример разрабатывали для повышения выхода DP на основе CAR-T-клеток в сосуде для культивирования G-Rex500M-CS. Три выбранных условия, описанные в **таблице 29** ниже, выбирали для оценки сопоставимости DP на основе CTX110 с тремя различными донорами и для получения образца клеток, достаточного для выполнения нескольких последующих аналитических анализов.

**Таблица 29.** Выбранные условия культивирования клеток для повышения выхода CAR-T-клеток во время однократного процесса размножения

ID образца	Условие	Плотность высевания (общее число клеток для высевания)	Разделение (дни после размножения)	Пассаж 1 (засеянный объем)	Сбор для деплеции по TCRab (дни после размножения)
S1	$1 \times$ производственный процесс	$250,0 \times 10^6$	-	-	7
S2	$2 \times$	$125,0 \times 10^6$	-	-	8

<b>S3</b>	4×	62,5×10 <sup>6</sup>	-	-	9
<b>S4</b>	4×, разделение в день 4	250,0×10 <sup>6</sup>	4	на ¼ собранного объема	9

Подробный протокол представлен ниже.

а. Готовили всю среду для культивирования, GMP IL-2 и GMP IL-7 для всего процесса CTX110 DS, где:

1. Т-клетки активировали согласно условиям полномасштабного производства (3× G-Rex500M-CS);

2. CAR-T-клетки высевали для размножения в 1× G-Rex500M-CS и в условиях мелкомасштабного производства (1× лунка GRex6M) с 1× лункой при выбранной плотности высевания;

3. CAR-T-клетки высевали после деплеции согласно половинным условиями крупномасштабного производства, по 1× G-Rex500M-CS на условие;

b. Размораживали соответствующее число Т-клеток для осуществления полномасштабного производства (3× G-Rex500M-CS);

c. Активировали соответствующее число Т-клеток для осуществления полномасштабного производства (3× G-Rex500M-CS);

d. Разбавляли средство для активации;

e. Собирали клетки для электропорации (EP) в условиях полномасштабного производства (3× G-Rex500M-CS);

f. Электропорация от  $2040 \times 10^6$  до  $2160 \times 10^6$  Т-клеток (17-18 кассет OC400);

g. Переносили клетки равными частями в 2× лунки 6-луночного планшета Falcon и инкубировали в течение 20 минут;

h. Разбавляли подвергнутые EP Т-клетки и всего высевали  $5,0 \times 10^6$  клеток в условиях мелкомасштабного производства (1× лунка G-Rex6M) для оценки эффективности *in vitro*+контроля EP-AAV;

i. Трансдуцировали  $1000 \times 10^6$  Т-клеток;

j. Высевали соответствующее число Т-клеток в соответствующий сосуд для культивирования с целью размножения:

1. S1: в общей сложности  $250 \times 10^6$  клеток высевали в G-Rex500M-CS, в общей сложности  $5,0 \times 10^6$  клеток высевали в условиях мелкомасштабного производства (1× лунка G-Rex6M);

2. S2: в общей сложности  $125 \times 10^6$  клеток высевали в G-Rex500M-CS, в общей сложности  $2,5 \times 10^6$  клеток высевали в условиях мелкомасштабного производства (1× лунка G-Rex6M);

3. S3: в общей сложности  $62,5 \times 10^6$  клеток высевали в G-Rex500M-CS, в общей сложности  $1,25 \times 10^6$  клеток высевали в условиях мелкомасштабного производства (1×

лунка G-Rex6M);

4. S4: в общей сложности  $250 \times 10^6$  клеток высевали в G-Rex500M-CS, в общей сложности  $5,0 \times 10^6$  клеток высевали в условиях мелкомасштабного производства ( $1 \times$  лунка G-Rex6M);

k. Осуществляли размножение CAR-T-клеток согласно описаниями каждого условия:

1. S1: добавление 100 МЕ/мл IL-2 и 100 МЕ/мл IL-7 в лунки G-Rex500M-CS и G-Rex6M один раз в три дня. Отбирали образец из G-Rex6M для проточной панели TCRab и обрабатывали для деплеции по TCRab в день 7 размножения;

2. S2: добавление 100 МЕ/мл IL-2 и 100 МЕ/мл IL-7 в лунки G-Rex500M-CS и G-Rex6M один раз в три дня. Отбирали образец из G-Rex6M для проточной панели TCRab и обрабатывали для деплеции по TCRab в день 8 размножения;

3. S3: добавление 100 МЕ/мл IL-2 и 100 МЕ/мл IL-7 в лунки G-Rex500M-CS и G-Rex6M один раз в три дня. Отбирали образец из G-Rex6M для проточной панели TCRab и обрабатывали для деплеции по TCRab в день 9 размножения;

4. S4:

a. День 4 размножения:

a. Удаляли супернатант и собирали клетки из G-Rex500M-CS с применением насоса GathRex, регистрировали объем клеток;

b. Под действием силы тяжести заполняли новый G-Rex500M-CS с помощью 5000 мл среды для культивирования и высевали четверть объема собранных клеток в заполненный сосуд для культивирования. Возвращали сосуд для культивирования в инкубатор;

c. С помощью серологической пипетки заполняли новую одиночную лунку G-Rex6M с помощью 75 мл среды для культивирования. С помощью серологической пипетки гомогенизировали клетки в лунке G-Rex6M и переносили 25 мл клеток в заполненный сосуд для культивирования. Возвращали сосуд для культивирования в инкубатор;

b. Добавляли 100 МЕ/мл IL-2 и 100 МЕ/мл IL-7 в лунки G-Rex500M-CS и G-Rex6M один раз в три дня. Отбирали образец из G-Rex6M для проточной панели TCRab и обрабатывали для деплеции по TCRab в день 9 размножения после трансфекции;

l. Осуществляли деплецию по TCRab в условиях половинного крупномасштабного производства ( $1 \times$  G-Rex500M-CS). Получали образец перед осуществлением деплеции для проведения соответствующего проточного анализа;

m. Получили образец после осуществления деплеции для проведения соответствующего проточного анализа и высевали целевые T-клетки после проведенной деплеции для осуществления половинного крупномасштабного производства ( $1 \times$  G-Rex500M-CS);

n. Осуществляли сбор в условиях половинного крупномасштабного производства ( $1 \times$  G-Rex500M-CS). На основании подсчета собранных клеток и полученного % CAR<sup>+</sup>

после деплеции:

1. Рассчитывали концентрацию жизнеспособных клеток в составе DP:

$$\frac{\text{Общее число жизнеспособных клеток в сборе перед – после центрифугирования}}{1} * \frac{\% \text{ CAR} +}{25 \times 10^6 \text{ CAR} + \text{клеток/мл}} = \frac{\text{концентрация состава DP}}{\text{[общее число жизнеспособных клеток]}}$$

2. Делили общее число собранных жизнеспособных клеток на концентрацию состава DP для расчета объема, необходимого для достижения целевой концентрации клеток:

$$\frac{\text{Общее число жизнеспособных клеток в сборе перед – после центрифугирования}}{1} * \frac{\text{мл}}{\text{общее число жизнеспособных клеток в составе DP}} = \text{целевой объем CS5}$$

3. Ресуспендировали клетки до  $0,5 \times$  целевого объема;
4. Осуществляли второй подсчет клеток в ресуспендированном клеточном осадке;
5. Рассчитывали остаточный объем для ресуспендирования клеток для достижения целевой концентрации жизнеспособных клеток;
6. Разводили до целевой концентрации клеток на основе расчета числа собранных клеток;

о. Подвергали криоконсервации соответствующее число клеток для дополнительной характеристики потока и анализа сопоставимости.

*(C) Эффективность оптимизации размножения клеток, оцененная с помощью анализа клеточной токсичности в условиях in vitro*

В этом примере описана эффективность в условиях in vitro согласно анализу клеточной токсичности для клеток, полученных в приведенном выше примере (B). В анализе измеряли абсолютное количество жизнеспособных клеток в анализе совместного культивирования.

Целевые раковые клетки Raji (CD19<sup>+</sup>) метили с помощью красителя для оценки пролиферации eFluor 670 (канал APC) и высевали из расчета 50 тыс. клеток на лунку. Различные соотношения немеченых эффекторных CAR-T-клеток добавляли для каждого тестируемого условия. Уничтожение целевых клеток под действием эффекторных CAR-T-клеток измеряли спустя 24 часа после начала культивирования с помощью окрашивания DAPI живых/погибших клеток (канал Pacific Blue). Гранулы для подсчета добавляли во время проточного анализа для нормализации разных образцов. Число жизнеспособных клеток (отрицательных по DAPI) в тестируемых образцах подсчитывали и нормализовали по числу жизнеспособных клеток в лунках, содержащих только целевые клетки, для расчета процентной доли лизиса клеток. Высвобождение цитокинов CAR-T-клетками в среду для культивирования анализировали в мультиплексном анализе ELISA (Luminex).

В этих экспериментах оценивали условия производства CTX110 1× в сравнении с 2× и 4×. Параллельно анализировали T-клетки от трех разных доноров. Эффективность в условиях in vitro оценивали по двум показателям: анализу клеточной токсичности в течение 24 часов и продукции цитокинов.

Таблица 30

ID образца	Описание образца	Плотность высеивания (тыс. клеток/см <sup>2</sup> )	День разделения (если применимо)	% CAR <sup>+</sup> (свежие)	% CAR <sup>+</sup> (после размораживания)
DP20-07-S1	Донор № 1 - стандартный (1×)	500	N/A	64,16	66,6
DP20-07-S2	Донор №1-2×	250	N/A	63,13	58,5
DP20-07-S3	Донор №1-4×	125	N/A	54,28	67,6
DP20-07-S4	Донор №1 - НУ, разделение в D4	500	День 4	62,70	
DP20-08-S1	Донор № 2 - стандартный (1×)	500	N/A	34,65	36,6
DP20-08-S2	Донор №2-2×	250	N/A	34,07	35,8
DP20-08-S3	Донор №2-4×	125	N/A	33,99	34,0
DP20-09-S1	Донор № 3 - стандартный (1×)	500	N/A	68,66	64,7
DP20-09-S2	Донор №2-3×	250	N/A	66,70	68,9
DP20-09-S3	Донор №3-4×	125	N/A	65,34	63,9

На **фиг. 20** показан аналитический контрольный FACS-анализ с помощью измерения лизиса CAR-T-клеток. CAR-T-клетки представляли собой CAR-T-клетки CTX110. 81% T-клеток были CAR<sup>+</sup>.

На **фиг. 21A-21C** показаны результаты аналитического контрольного эксперимента, измеряющего лизис клеток и продукцию цитокинов *in vitro*. В анализе

применяли CAR-T-клетки CTX110, размороженные из замороженного запаса. В день 6 после HDR 80% T-клеток были CAR<sup>+</sup>.

На **фиг. 22А-22С** показаны результаты анализа эффективности *in vitro*, показывающие, что T-клетки, полученные от каждого из трех доноров, характеризовались различной степенью эффективности *in vitro* в условиях культивирования 1х, 2х и 4х.

**Фиг. 23А-23С** показаны результаты анализа лизиса клеток при различных концентрациях клеток, демонстрирующие, что клетки, полученные от доноров 1 и 2, показывали подобные ответы, несмотря на разные процентные доли CAR<sup>+</sup> клеток.

**Фиг. 24А-24В** показаны результаты анализа лизиса клеток от трех доноров при нормализации по CAR<sup>+</sup> клеткам. Доноры 2 и 3 сходным образом вели себя в анализе при нормализации CAR-клеток. Анализ повторяли с 2х количеством CAR-T-клеток для донора 2 при тех же самых соотношениях Е:Т.

Продукцию IFN $\gamma$  также измеряли в супернатанте с помощью ELISA. Цитокиновый анализ IFN $\gamma$  отражал результаты уничтожения клеток касательно зависимости от дозы, связанной с соотношениями Е:Т, и наблюдали некоторую изменчивость между ответами для разных доноров. Измерение IL2 было более изменчивым среди доноров. Значительно меньшую продукцию IL2 наблюдали в среде в случае клеток донора 2.

Таким образом, для каждого оцениваемого донора условия культивирования как 2 $\times$ , так и 4 $\times$  показывают эффективность в условиях *in vitro*, сходную с протоколу производства при 1 $\times$ .

*(D) Эффективность оптимизации размножения клеток в условиях in vivo (анализ выживаемости in vivo)*

Клетки CTX110 получали согласно приведенному выше примеру (С) и вводили в дозе 4e6 CAR<sup>+</sup> T-клеток мышам в модели ксенотрансплантата опухоли Nalm6, как показано в **таблице 31** ниже. Опухолевые клетки Nalm6-Fluc-GFP инокулировали мышам CIEA NOG за 4 дня до введения CAR-T-клеток. Ежедневная оценка биолюминесценции (BLI, фотон/с) позволяет оценить опухолевую нагрузку у мышей.

**Таблица 31**

Группа	Описание группы	Опухолевые клетки	Доза подлежащих введению клеток	Реципиентов на группу
1	Без обработки	5,0e5	4,0e6 CAR-T-клетки	10
2	DP20-07-S1	5,0e5	4,0e6 CAR-T-клетки	10
3	DP20-07-S2	5,0e5	4,0e6 CAR-T-клетки	10
4	DP20-07-S3	5,0e5	4,0e6 CAR-T-клетки	10
5	DP20-07-S4	5,0e5	4,0e6 CAR-T-клетки	10
6	DP20-08-S1	5,0e5	4,0e6 CAR-T-клетки	10
7	DP20-08-S2	5,0e5	4,0e6 CAR-T-клетки	10
8	DP20-08-S3	5,0e5	4,0e6 CAR-T-клетки	10

9	DP20-09-S1	5,0e5	4,0e6 CAR-T-клетки	10
10	DP20-09-S2	5,0e5	4,0e6 CAR-T-клетки	10
11	DP20-09-S3	5,0e5	4,0e6 CAR-T-клетки	10
Всего				110

В случае всех трех доноров и условий размножения животные, которым вводили CAR<sup>+</sup> клетки, продолжали выживать в день 38, в отличие от животных, которым вводили дозу необработанных контрольных клеток, которые не выживали после дня 23 (см. **фиг. 25A-25C**), как показано в **таблице 32** ниже. Согласно BLI, полученным от мышей, которым вводили CAR<sup>+</sup> клетки, они имели сходную кинетику опухолевого роста.

**Таблица 32. Медианная выживаемость**

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
Необрабатываемые	Донор № 1, 1×	Донор № 1, 2×	Донор № 1, 4×	Донор № 1, NY 4×, D4	Донор № 2, 1×	Донор № 2, 2×	Донор № 2, 4×	Донор № 3, 1×	Донор № 3, 2×	Донор № 3, 4×
23	Не определен	Не определен	38,5	39	Не определен					
	о	о			о	о	о	о	о	о

**ПРИМЕР 11. Способы получения генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор и имеющих генетически нарушенные гены TRAC и  $\beta 2M$ .**

Далее описан иллюстративный способ производства средства иммунотерапии на основе Т-клеток, состоящего из аллогенных Т-клеток, которые являются генетически модифицированными *ex vivo* с применением компонентов системы генного редактирования CRISPR/Cas9 (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR-ассоциированный белок 9) (sgRNA (одиночная направляющая РНК) и нуклеаза Cas9).

Модификации включали целевое нарушение локусов TRAC и  $\beta 2M$  и вставку трансгена химерного антигенного рецептора (CAR) в locus TRAC с применением вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (например, rAAV серотипа 6, кодирующего химерный Т-клеточный антигенный рецептор, направленный на антигена).

Производственный процесс показан на **фиг. 19**. Структурная информация об исходных материалах, включая нуклеазу Cas9 бактериального происхождения; двух одиночных направляющих РНК (sgRNA), одной sgRNA, которая нацеливается на locus TRAC (например, TA-1), и второй sgRNA, которая нацеливается на locus  $\beta 2M$  (например,

B2M-1), представлена в данном документе. Также представлены иллюстративные аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности CAR в векторе на основе гAAV.

#### *Обогащение T-клеток*

T-клетки обогащали из материалов лейкофереза (Лейкопаки) с помощью магнитного разделения с применением смеси магнитных гранул, покрытых антителом к CD8 и антителом к CD4, с применением автоматизированной системы обработки клеток. Перед обогащением из Лейкопаков отбирали образцы для подсчета и оценки жизнеспособности клеток ( $\geq 80\%$ ). Обогащенные клетки выделяли в буфере PBS/EDTA с HSA, а затем отбирали образцы для подсчета клеток, оценки жизнеспособности ( $\geq 80\%$ ), чистоты T-клеток ( $\geq 70\%$  CD3) и стерильности.

#### *Криоконсервация T-клеток*

Затем клетки центрифугировали при  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  и ресуспендировали в CryoStor CS5 при целевой концентрации, составляющей  $50 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл. Отбирали образцы клеток для подсчета клеток, оценки жизнеспособности ( $\geq 80\%$ ), и затем аликвоты помещали в этилвинилацетатные криопакеты при целевом числе клеток  $2500 \times 10^6$  клеток/пакет (30-70 мл клеточной суспензии). Одного Лейкопака было достаточно для получения 1-2 пакетов T-клеток. Каждый пакет запаивали, маркировали, хранили при  $2-8^\circ\text{C}$  до переноса в программируемую морозильную камеру, и впоследствии переносили в паровую фазу жидкого азота для хранения.

#### *Размораживание и активация T-клеток*

Один замороженный пакет с обогащенными T-клетками размораживали, переносили в пакет объемом 3 л и разводили в дополненной среде X-VIVO™ 15 (X-VIVO™ 15, 5% человеческой сыворотки, 100 МЕ/мл rhIL2, 100 МЕ/мл rhIL7). Отбирали образцы клеток для подсчета и оценки жизнеспособности клеток ( $\geq 70\%$ ). Клетки центрифугировали при 540g при  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 15 минут. Затем клетки ресуспендировали в дополненной среде X-VIVO™ 15 и отбирали образцы для подсчета и оценки жизнеспособности клеток ( $\geq 70\%$ ). Для активации клеток добавляли растворимую коллоидную полимерную наноматрицу, конъюгированную с раствором рекомбинантных гуманизированных агонистов CD3 и CD28, в соотношении 1:12,5 (об./об.).

Клетки высевали при целевой плотности  $2 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл в два сосуда для статического культивирования клеток, при этом каждый содержал общий объем из примерно 500 мл дополненной среды X-VIVO™ 15/коллоидной полимерной наноматрицы, конъюгированной с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28. Сосуды для статического культивирования инкубировали при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  и  $5 \pm 1\%$  CO<sub>2</sub> в течение  $48 \pm 4$  часов. На протяжении всего процесса, всякий раз, когда с сосудами для статического культивирования проводили какие-то действия, их проверяли на наличие разрывов и протеканий, а также присутствие прозрачной желтой среды.

#### *Разведение*

Через два (2) дня в каждый сосуд для статического культивирования добавляли

дополненную среду X-VIVO™ 15 до 5 л. Клетки далее инкубировали при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  и  $5 \pm 1\%$   $\text{CO}_2$  на протяжении ночи.

#### *Электропорация и трансдукция*

При подготовке к электропорации объем дополненной среды X-VIVO™ 15 уменьшали до конечного объема, составляющего примерно 500 мл, с применением насоса, соединенного с погружной трубкой в сосуде для статического культивирования, который осторожно вращали для обеспечения ресуспендирования клеток в среде. Отбирали образцы клеток для подсчета и оценки жизнеспособности клеток ( $\geq 70\%$ ). Клетки переносили в центрифужные пробирки объемом 500 мл и центрифугировали при 540g при  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 15 минут. Клеточные осадки ресуспендировали в буфере для электропорации и снова центрифугировали при тех же условиях. Клетки ресуспендировали в буфере для электропорации второй раз до целевой концентрации, составляющей  $300 \times 10^6$  клеток/мл.

Нуклеазу Cas9 смешивали с sgRNA, нацеливающейся на TRAC, и нуклеазу Cas9 смешивали с sgRNA, нацеливающейся на  $\beta 2\text{M}$ , в отдельных микроцентрифужных пробирках. Каждый раствор инкубировали в течение не менее 10 минут при комнатной температуре для образования каждого рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса. Две смеси Cas9/gRNA объединяли и смешивали с клетками, доводя Cas9, sgRNA для TRAC и sgRNA для  $\beta 2\text{M}$  до конечной концентрации, составляющей 0,3 мг/мл, 0,08 мг/мл и 0,2 мг/мл соответственно. Смесь разделяли на алиquotы и пипетированием загружали в кассету для электропорации. Кассеты закрывали крышками и последовательно подвергали электропорации с помощью статической электропорации с применением системы для трансфекции. После электропорации клетки из каждой кассеты объединяли в колбе Эрленмейера на 125 мл и инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение не менее 20 минут. Отбирали образцы клеток для оценки жизнеспособности ( $\geq 70\%$ ) и подсчета.

Трансдукцию проводили следующим образом. Клетки разбавляли до  $10^7$  клеток/мл средой X-VIVO™ 15 и добавляли свежеразмороженный гAAV при MOI, составляющей 20000 vg/клетку. Клетки инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  и  $5\%$   $\text{CO}_2$  в течение не менее 60 минут.

Репарация, направляемая гомологией (HDR), представляет собой высокоточный клеточный механизм репарации двухнитевых разрывов ДНК. HDR применяют для введения гена CAR с матрицы AAV в требуемый локус TRAC с применением гомологичной последовательности на каждом конце гена CAR.

#### *Размножение клеток*

Клетки разбавляли дополненной средой X-VIVO™ 15, отбирали образцы для оценки жизнеспособности ( $\geq 70\%$ ) и подсчета клеток и высевали с плотностью  $0,2-0,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/ $\text{cm}^2$  в два сосуда для статического культивирования и один дополнительный сосуд для статического культивирования (сателлитная культура для отслеживания клеток). Сосуды для статического культивирования инкубировали при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  и  $5 \pm 1\%$   $\text{CO}_2$ . Клеточные культуры инкубировали не более 9 дней. В течение этого времени в культуры один раз в 3-4 дня вносили добавки 100 ME rhIL2 и rhIL7 на мл

объема культуры. В сателлитном сосуде для статического культивирования клеток проводили тестирование для подсчета, оценки жизнеспособности и чистоты Т-клеток на всем протяжении размножения. Когда плотность клеток в сателлитном сосуде для культивирования достигала примерно  $30 \times 10^6/\text{см}^2$ , осуществляли деплецию по TCR $\alpha\beta$ . Если плотность клеток в сателлитном сосуде для культивирования не достигала  $30 \times 10^6/\text{см}^2$ , деплецию по TCR $\alpha\beta$  в основных культурах осуществляли в день 9.

#### *Деплеция по TCR $\alpha\beta$*

Среду в каждом сосуде для статического культивирования уменьшали до конечного объема, составляющего примерно 500 мл, с применением насоса, соединенного с погружной трубкой в сосуде для статического культивирования. После того удаления основной части среды сосуда для статического культивирования осторожно вращали для ресуспендирования клеток в среде.

Клетки переносили в центрифужные пробирки на 500 мл, снабженные погружными трубками, которые соединялись с сосудами для статического культивирования. Отбирали образцы клеток для оценки жизнеспособности ( $\geq 70\%$ ), подсчета и определения % CAR $^+$  клеток. Затем клетки центрифугировали при  $540 \times g$  при  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 15 минут. Клеточные осадки ресуспендировали и объединяли в менее чем 650 мл смеси PBS/EDTA, содержащей 0,5% HSA. Клеточную суспензию переносили в стерильный пакет, который подключали к автоматизированной системе обработки клеток. В автоматизированной системе обработки клеток проводили инкубацию клетки с антителом к TCR $\alpha\beta$ , конъюгированным с биотином. Клетки промывали и инкубировали с магнитными гранулами, содержащими антитело к биотину, для деплеции TCR $\alpha\beta^+$  клеток с применением автоматизированной системы обработки клеток. Клетки тестировали для подсчета, оценки жизнеспособности клеток ( $\geq 70\%$ ) и определения % CAR $^+$  клеток ( $\geq 30-40\%$ ).

#### *Восстановление клеток*

Подвергнутые деплеции клетки ресуспендировали в дополненной среде X-VIVO $^{\text{TM}}$  15 и переносили в пакет(-ы) объемом 3 л, высевали в сосуд(-ы) для статического культивирования клеток и инкубировали на протяжении ночи при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  и  $5 \pm 1\% \text{CO}_2$ .

#### *Сбор клеток (лекарственная субстанция)*

Для сбора клеток сосуды для статического культивирования вынимали из инкубатора и оставляли отстояться для осаждения клеток. Ростовую среду из каждого сосуда для статического культивирования удаляли до конечного объема, составляющего примерно 500 мл, с применением насоса. Отбирали образцы удаленной среды для оценки стерильности. Сосуды для статического культивирования осторожно вращали для обеспечения ресуспендирования клеток в среде. Содержимое каждого сосуда для статического культивирования переносили в пакет для переноса объемом 3 л с применением насоса и фильтровали через 40-мкм фильтр для переливания крови под действием силы тяжести в отдельный стерильный пакет объемом 3 л. Отбирали образцы клеток для оценки концентрации и жизнеспособности.

## ЭКВИВАЛЕНТЫ

Хотя в данном документе были описаны и проиллюстрированы несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, специалисты средней квалификации в данной области техники легко смогут представить множество других средств и/или структур для осуществления функции, и/или получения результатов, и/или одно или несколько преимуществ, описанных в данном документе, и каждый из таких вариантов и/или модификаций считается находящимся в пределах объема вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. В более общем плане специалисты в данной области техники легко поймут, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в данном документе, подразумеваются как иллюстративные, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или путей применения, в которых применяются идеи настоящего изобретения. Специалисты в данной области техники поймут или смогут установить с применением не более чем стандартного эксперимента многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Следовательно, следует понимать, что вышеупомянутые варианты осуществления представлены только в качестве примера и что в пределах прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов варианты осуществления настоящего изобретения могут быть реализованы на практике иным образом, чем конкретно описанные и заявленные. Варианты осуществления настоящего изобретения по настоящему раскрытию направлены на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанные в данном документе. Кроме того, в пределах объема настоящего изобретения по настоящему раскрытию включена любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не являются взаимно несовместимыми.

Все определения, определяемые и используемые в данном документе, следует понимать как имеющие приоритет над словарными определениями, определениями в документах, включенных посредством ссылки, и/или обычными значениями определяемых терминов.

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

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

Фразу "и/или", используемую в данном документе в описании и в формуле изобретения, следует понимать как означающую "один или оба" из элементов, соединенных таким образом, т. е. элементов, которые в одних случаях присутствуют

вместе, а в других случаях присутствуют раздельно. Множественные элементы, перечисленные с помощью "и/или", следует толковать тем же образом, т. е. "один или несколько" элементов, соединенных таким образом. Необязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных союзом "и/или", независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно обозначенными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на "А и/или В" при использовании в сочетании с открытой фразой, такой как "содержащий", может относиться в одном варианте осуществления только к А (необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления только к В (необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления одновременно к А и В (необязательно включая другие элементы) и т. д.

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

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

меньшей мере одному В, необязательно включая более одного, без присутствия А (и необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления к по меньшей мере одному А, необязательно включая более одного, и к по меньшей мере одному В, необязательно включая более одного (и необязательно включая другие элементы), и т. д.

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

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения генетически сконструированных Т-клеток, при этом способ предусматривает:

- (i) обеспечение первой популяции Т-клеток;
- (ii) инкубирование первой популяции Т-клеток в присутствии средства, активирующего Т-клетки, в сосуде для культивирования клеток с получением второй популяции Т-клеток, где вторая популяция Т-клеток содержит активированные Т-клетки;
- (iii) введение во вторую популяцию Т-клеток первого рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса, содержащего первый фермент Cas9 и первую направляющую РНК (gRNA), нацеливающуюся на ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC), и второго RNP-комплекса, содержащего второй фермент Cas9 и вторую gRNA, нацеливающуюся на ген бета-2-микроглобулина ( $\beta 2M$ ), с получением третьей популяции Т-клеток, где третья популяция Т-клеток содержит активированные Т-клетки, имеющие нарушенный ген TRAC и нарушенный ген  $\beta 2M$ ;
- (iv) инкубирование третьей популяции Т-клеток с вектором на основе аденоассоциированного вируса (AAV) с получением четвертой популяции Т-клеток, где вектор на основе AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), и где последовательность нуклеиновой кислоты фланкирована последовательностями, гомологичными локусу гена TRAC, и где четвертая популяция Т-клеток содержит активированные Т-клетки, экспрессирующие CAR и имеющие нарушенный ген TRAC и нарушенный ген  $\beta 2M$ ;
- (v) размножение четвертой популяции Т-клеток, за счет чего получают популяцию размноженных Т-клеток;
- (vi) удаление  $TCR\alpha\beta^+$  Т-клеток из популяции размноженных Т-клеток с получением популяции генетически сконструированных Т-клеток, где популяция генетически сконструированных Т-клеток содержит активированные Т-клетки, экспрессирующие CAR и имеющие нарушенный ген TRAC и нарушенный ген  $\beta 2M$ ; и
- (vii) сбор популяции генетически сконструированных Т-клеток.

2. Способ по п. 1, где первая популяция Т-клеток получена из криоконсервированных Т-клеток, обогащенных из клеток крови человека.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где первую популяцию Т-клеток получают с помощью способа, предусматривающего: (а) получение клеток крови от донора-человека и (б) обогащение  $CD4^+$  Т-клеток и/или  $CD8^+$  Т-клеток из клеток крови.

4. Способ по п. 3, где стадию (б) осуществляют с применением магнитных гранул, конъюгированных с антителом к  $CD4$  и/или антителом к  $CD8$ .

5. Способ по любому из пп. 1-4, где первая популяция Т-клеток характеризуется жизнеспособностью клеток, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, и/или чистотой, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток.

6. Способ по любому из пп. 3-5, дополнительно предусматривающий (с) криоконсервацию обогащенных  $CD4^+$  Т-клеток и  $CD8^+$  Т-клеток, полученных на стадии

(b).

7. Способ по любому из пп. 1-6, где средство, активирующее Т-клетки, содержит агонист CD3 и агонист CD28, и где агонист CD3 и агонист CD28 прикреплены к частице наноматрицы.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где стадию (ii) осуществляют путем инкубирования первой популяции Т-клеток со средством, активирующим Т-клетки, в сосуде для культивирования клеток при плотности высевания клеток, составляющей приблизительно  $2 \times 10^6/\text{см}^2$ , и концентрации клеток, составляющей приблизительно  $2 \times 10^6/\text{клеток}/\text{мл}$ , в течение приблизительно 48 часов.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где отношение средства, активирующего Т-клетки, к среде в смеси составляет приблизительно 1:12,5 (об./об.).

10. Способ по любому из пп. 1-9, дополнительно предусматривающий разбавление средства, активирующего Т-клетки, во второй популяции Т-клеток после стадии (ii) для снижения активации и для обеспечения восстановления клеток перед стадией (iii).

11. Способ по любому из пп. 1-10, где стадию (iii) осуществляют путем электропорации.

12. Способ по п. 11, где на стадии (iii) предусмотрено одно событие электропорации.

13. Способ по п. 1, где первый RNP-комплекс и второй RNP-комплекс вводят в активированные Т-клетки в ходе одного события электропорации.

14. Способ по любому из пп. 11-13, где количество первого фермента Cas9 в первом RNP-комплексе является таким же, как количество второго фермента Cas9 во втором RNP-комплексе.

15. Способ по любому из пп. 11-14, где концентрация первого фермента Cas9 составляет приблизительно 0,15 мг/мл, концентрация второго фермента Cas9 составляет приблизительно 0,15 мг/мл, концентрация первой gRNA, нацеливающейся на ген TRAC, составляет приблизительно 0,08 мг/мл, и концентрация второй gRNA, нацеливающейся на ген  $\beta 2M$ , составляет приблизительно 0,2 мг/мл.

16. Способ по любому из пп. 11-15, где концентрация клеток на стадии (iii) составляет от приблизительно  $100 \times 10^6$  клеток/мл до приблизительно  $400 \times 10^6$  клеток/мл, необязательно приблизительно  $300 \times 10^6$  клеток/мл.

17. Способ по любому из пп. 11-16, где количество клеток в каждом сосуде ~~концентрация~~ на стадии (iii) составляет приблизительно  $3 \times 10^8$  клеток.

18. Способ по любому из пп. 1-15, где вектор на основе AAV характеризуется значением множественности заражения (MOI), составляющим от приблизительно 10000 до приблизительно 80000.

19. Способ по п. 16, где MOI вектора на основе AAV составляет приблизительно 20000.

20. Способ по п. 16 или п. 17, где вектор на основе AAV представляет собой вектор на основе AAV серотипа 6 (AAV6).

21. Способ по любому из пп. 1-20, где стадию (v) осуществляют путем культивирования четвертой популяции Т-клеток в сосуде для культивирования клеток при плотности высевания, составляющей от приблизительно  $2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно  $7 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, в течение от приблизительно 6 дней до приблизительно 12 дней.

22. Способ по любому из пп. 1-20, где стадию (v) осуществляют путем культивирования четвертой популяции Т-клеток в сосуде для культивирования клеток при плотности высевания, составляющей от приблизительно  $2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, в течение от приблизительно 7 дней до приблизительно 9 дней.

23. Способ по п. 22, где четвертую популяцию Т-клеток культивируют при плотности высевания, составляющей от приблизительно  $3 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>.

24. Способ по п. 22 или п. 23, где сосуд для культивирования клеток представляет собой сосуд для статического культивирования клеток, обеспечивающий размножение клеток в течение от приблизительно 10 дней до приблизительно 12 дней без замены среды.

25. Способ по любому из пп. 21-23, где сосуд для культивирования клеток представляет собой сосуд для статического культивирования клеток, обеспечивающий размножение клеток в течение от приблизительно 7 дней до приблизительно 9 дней без замены среды.

26. Способ по любому из пп. 1-25, где стадию (vi) осуществляют путем приведения размноженных клеток в контакт с гранулами, на которых иммобилизованы антитела к TCR $\alpha\beta$ , и сбора несвязавшихся клеток.

27. Способ по любому из пп. 1-25, где стадия размножения предусматривает высевание Т-клеток при плотности от приблизительно 150000 клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно 500000 клеток/см<sup>2</sup>, необязательно от приблизительно 300000 клеток/см<sup>2</sup> до приблизительно 500000 клеток/см<sup>2</sup> в сосуд для клеток.

28. Способ по любому из пп. 1-26, где первый фермент Cas9, второй фермент Cas9 или оба представляют собой нуклеазу Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (spCas9).

29. Способ по любому из пп. 1-27, где первый фермент Cas9 и второй фермент Cas9 являются одинаковыми.

30. Способ по любому из пп. 1-26, где первый фермент Cas9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и/или где второй фермент Cas9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

31. Способ по любому из пп. 1-29, где первая gRNA, нацеливающаяся на ген TRAC, содержит спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 4.

32. Способ по п. 32, где первая gRNA, нацеливающаяся на ген TRAC, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 2.

33. Способ по любому из пп. 1-33, где вторая gRNA, нацеливающаяся на ген  $\beta 2M$ ,

содержит спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 8.

34. Способ по п. 34, где вторая gRNA, нацеливающаяся на ген  $\beta 2M$ , содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 6.

35. Способ по любому из пп. 32-35, где первая gRNA, вторая gRNA или обе содержат одну или несколько 2'-О-метилфосфотиоатных модификаций.

36. Способ по любому из пп. 1-36, где CAR содержит внеклеточный домен, нацеливающийся на раковый антиген, трансмембранный домен, костимулирующий домен и цитоплазматический сигнальный домен CD3z.

37. Способ по любому из пп. 1-37, где CAR связывает CD19.

38. Способ по п. 38, где внеклеточный домен содержит одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), трансмембранный домен получен из CD8a, и/или костимулирующий домен получен из CD28.

39. Способ по п. 39, где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37.

40. Способ по любому из пп. 1-37, где CAR связывает BCMA.

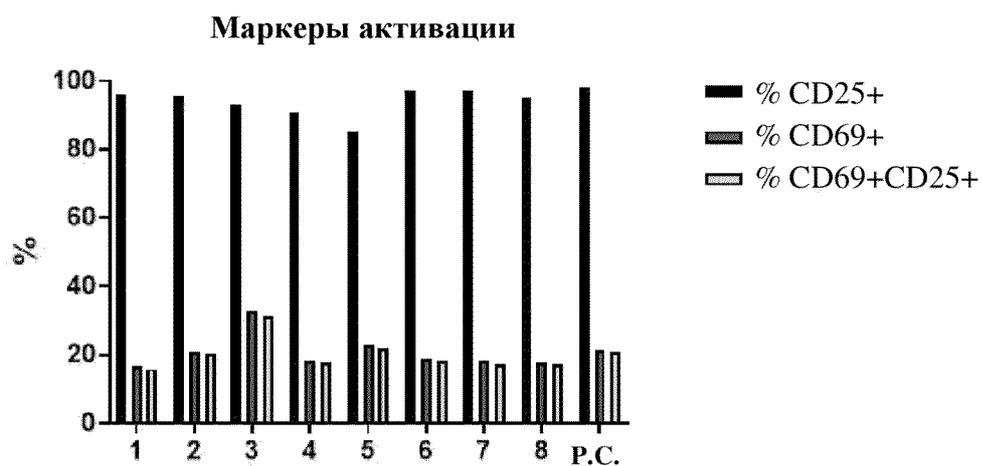
41. Способ по п. 41, где внеклеточный домен содержит одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), трансмембранный домен получен из CD8a, и/или костимулирующий домен получен из 4-1BB.

42. Способ по п. 42, где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61.

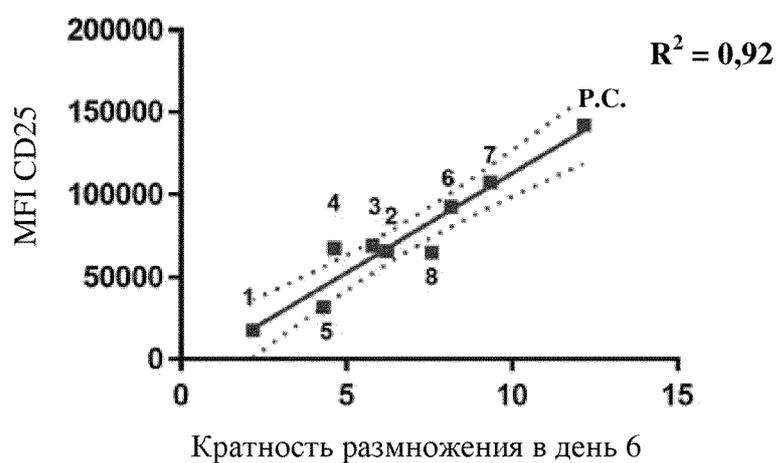
43. Популяция генетически сконструированных Т-клеток, полученная с помощью способа по любому из пп. 1-43.

По доверенности

1/52



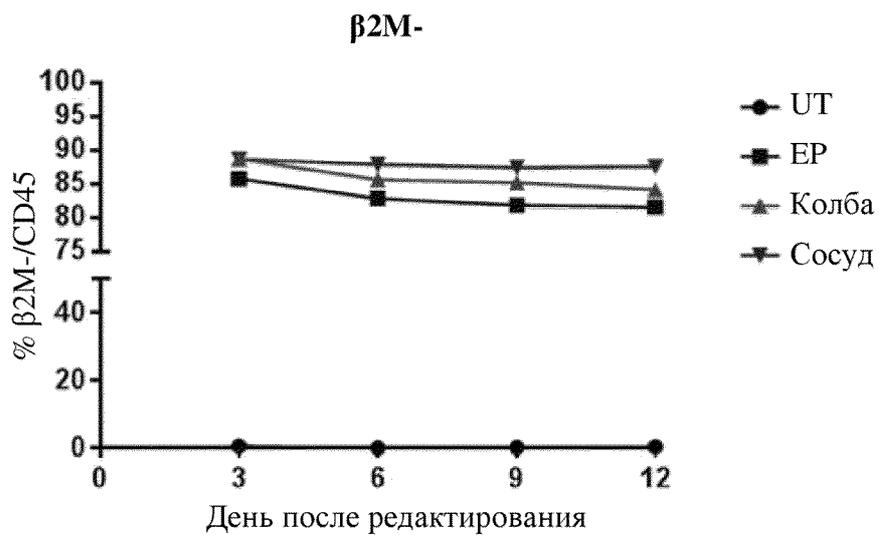
Фиг. 1А



Фиг. 1В

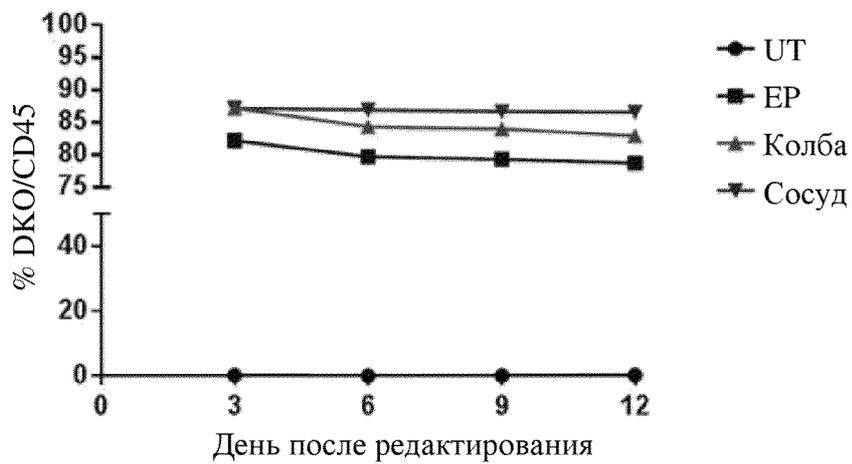


Фиг. 2А



Фиг. 2В

## DKO



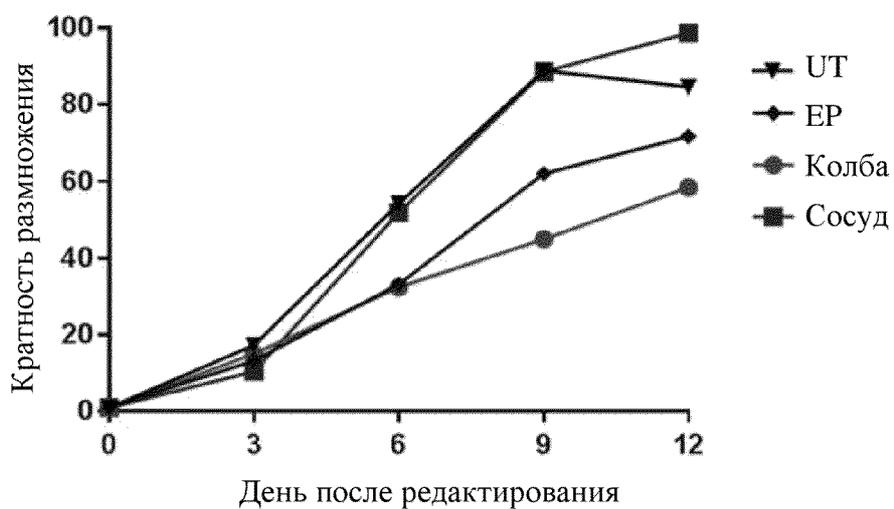
Фиг. 2С

## CAR/CD45

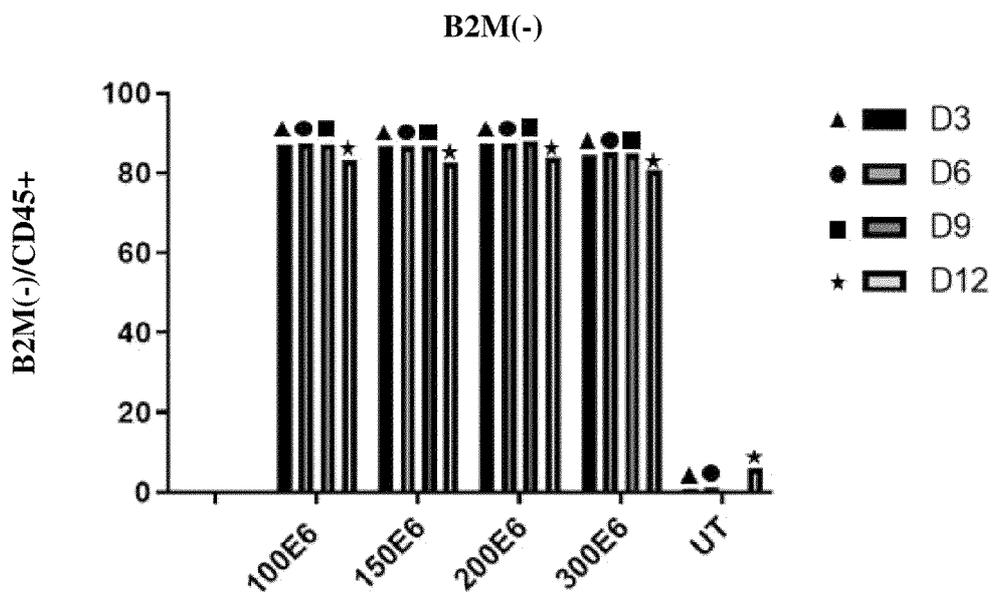


Фиг. 2D

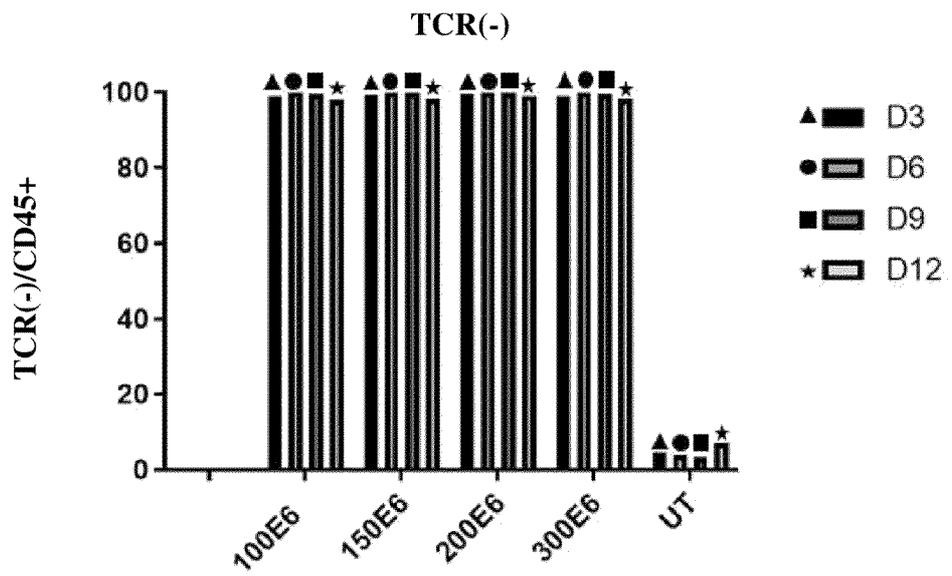
4/52



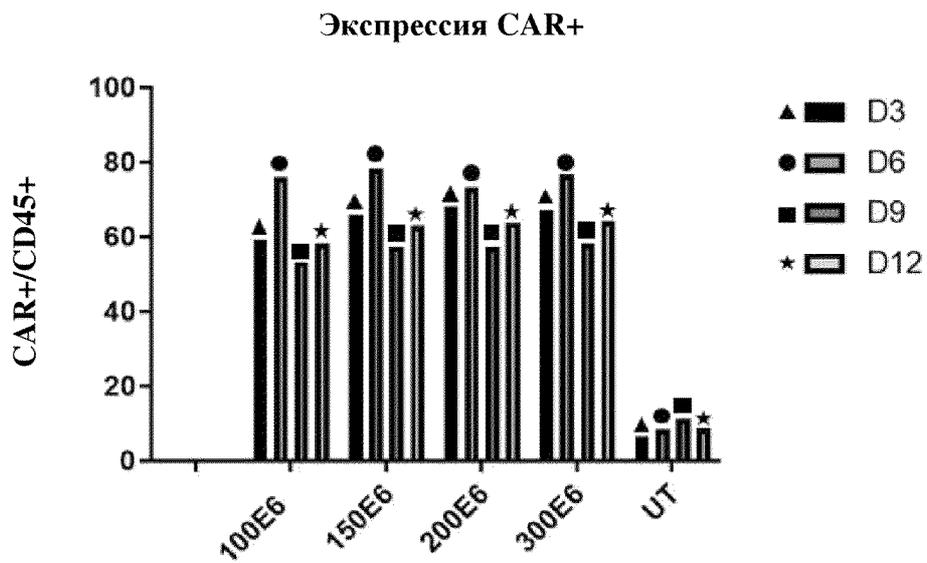
Фиг. 3



Фиг. 4А

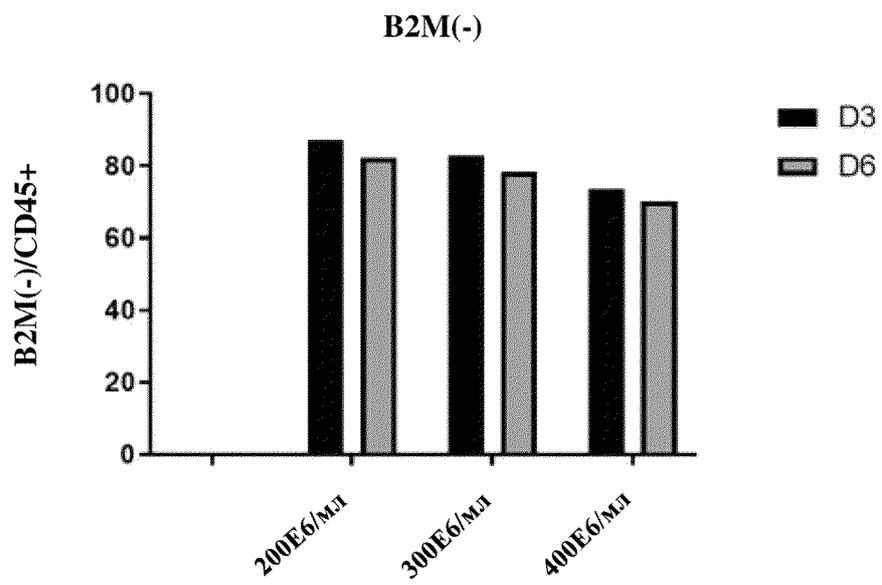


Фиг. 4В

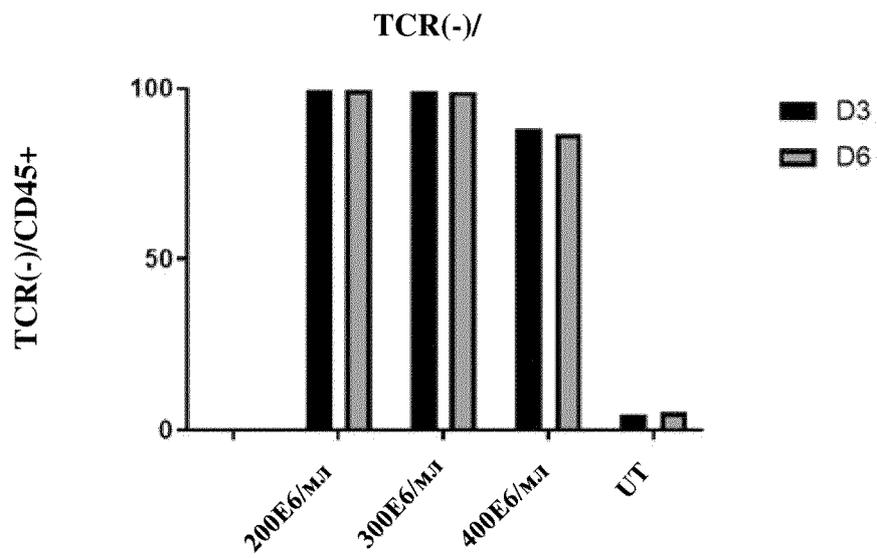


Фиг. 4С

6/52

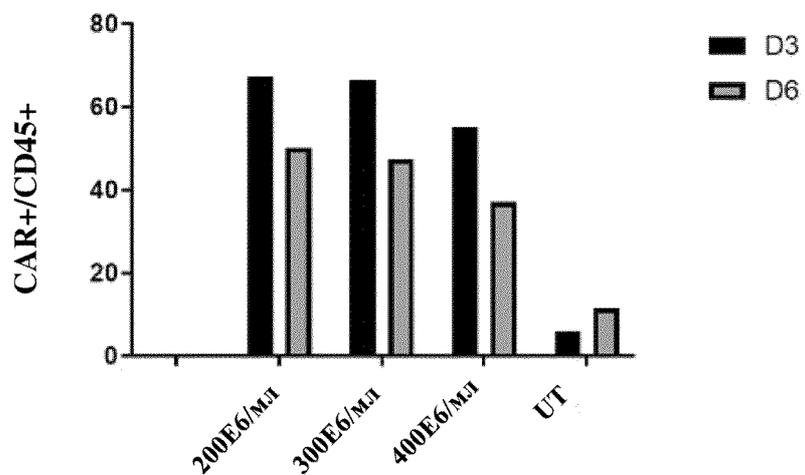


Фиг. 4D



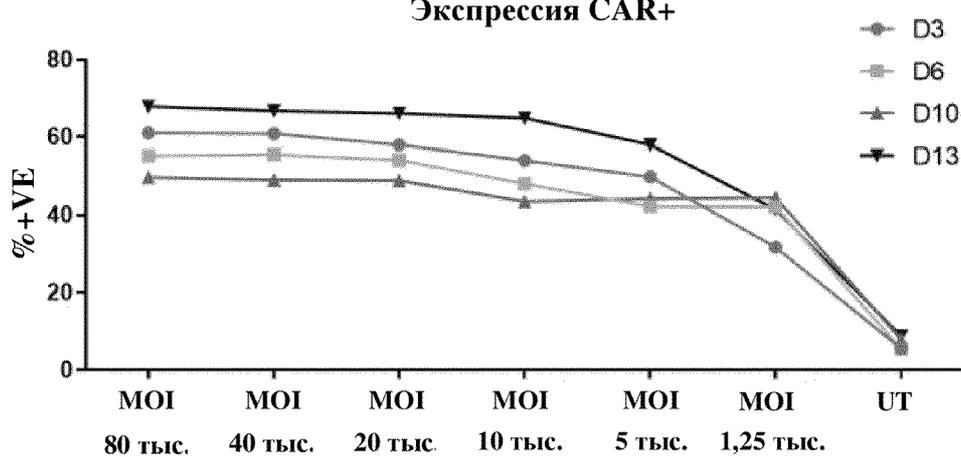
Фиг. 4E

## Экспрессия CAR+

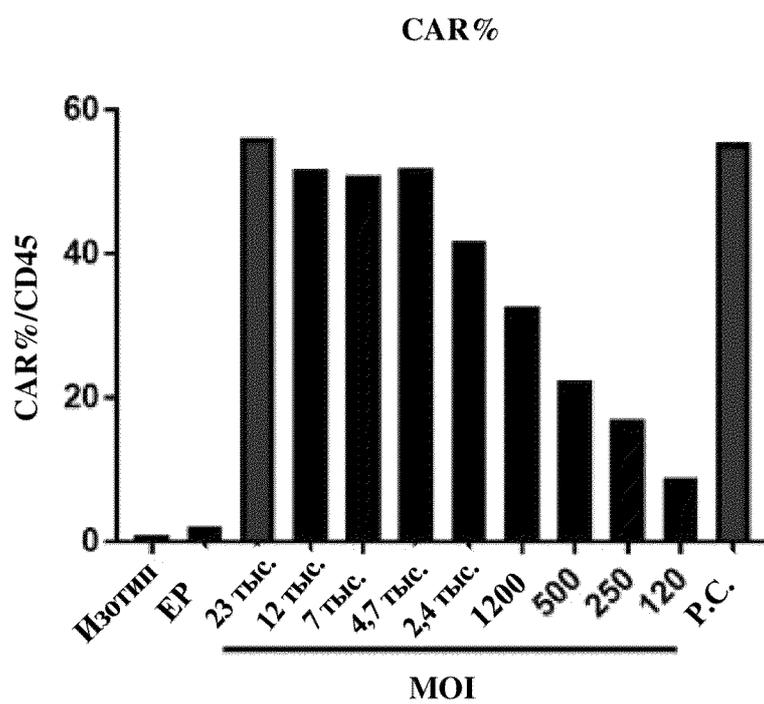


Фиг. 4F

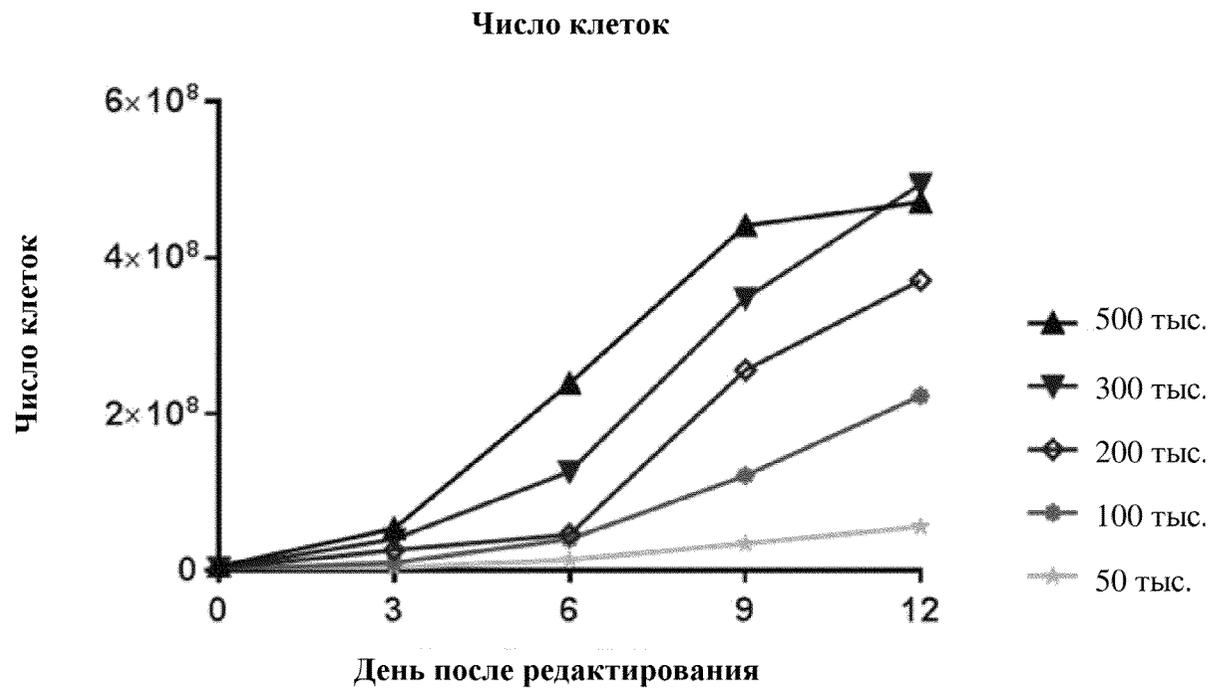
## Экспрессия CAR+



Фиг. 5А



Фиг. 5В

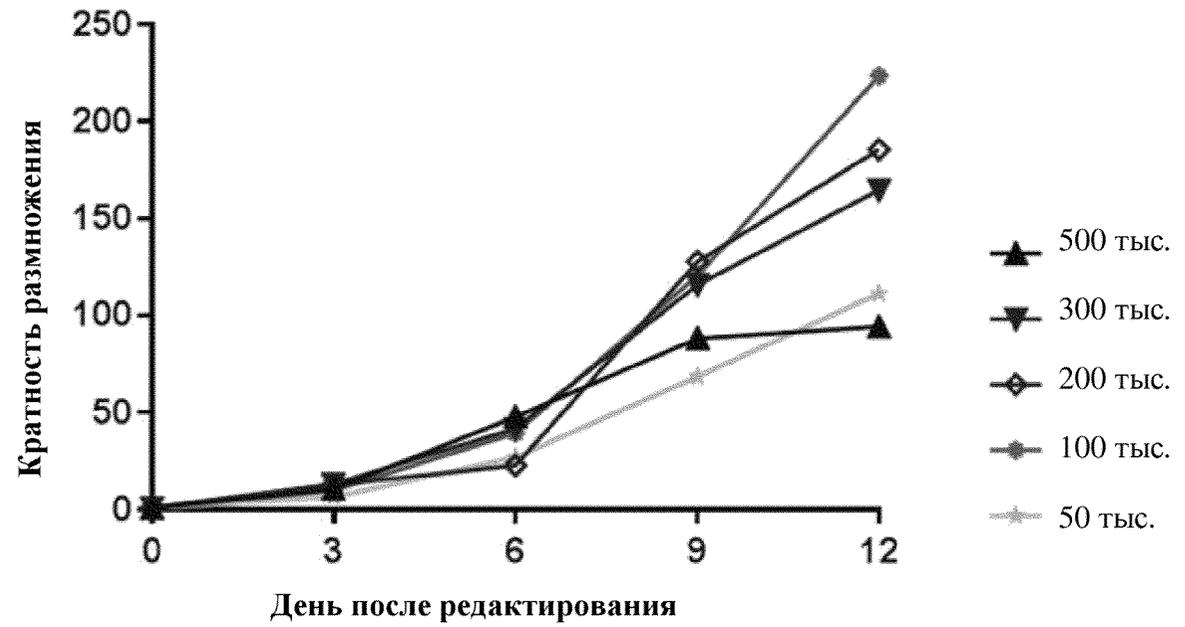


Фиг. 6А

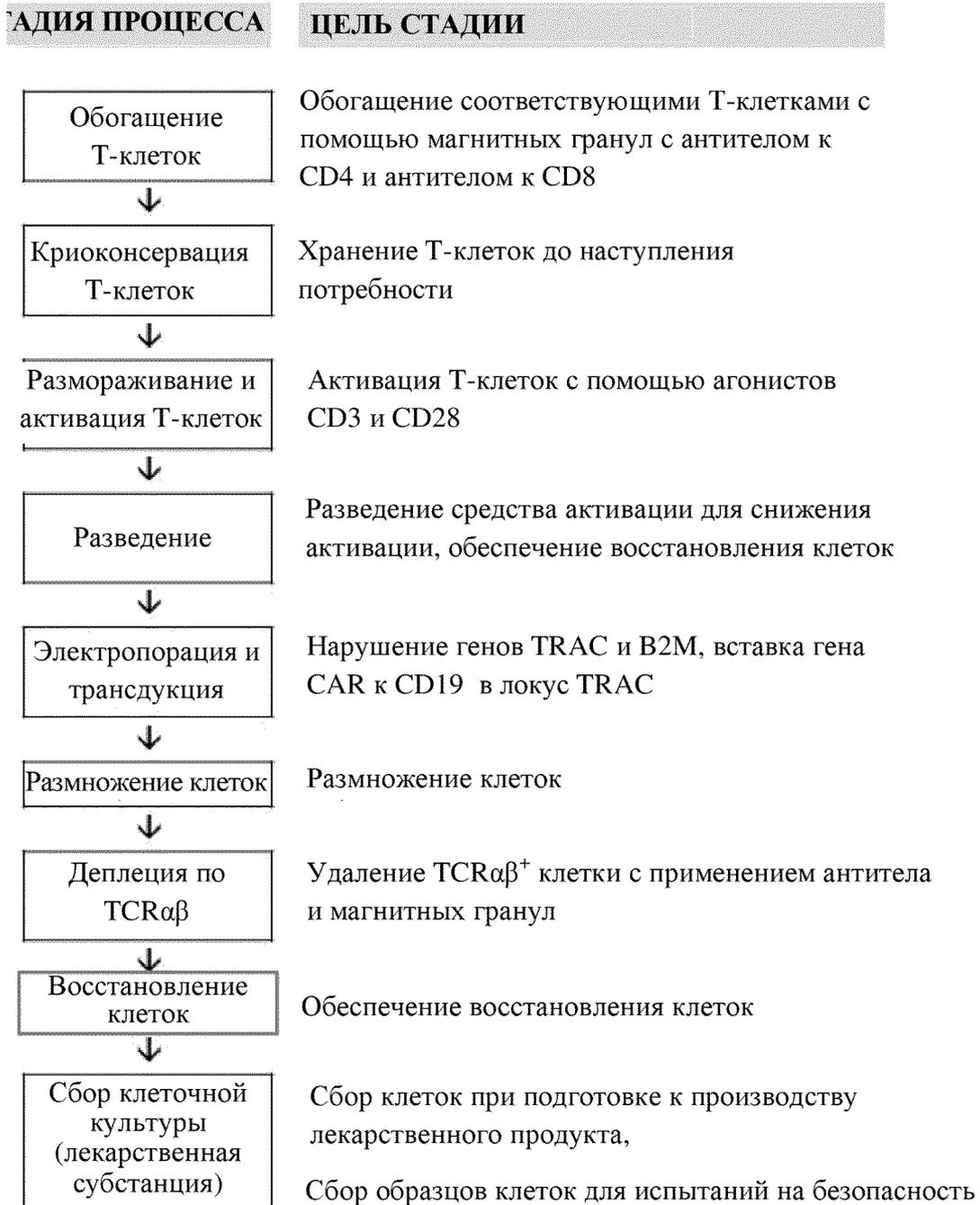


**Фиг. 6В**

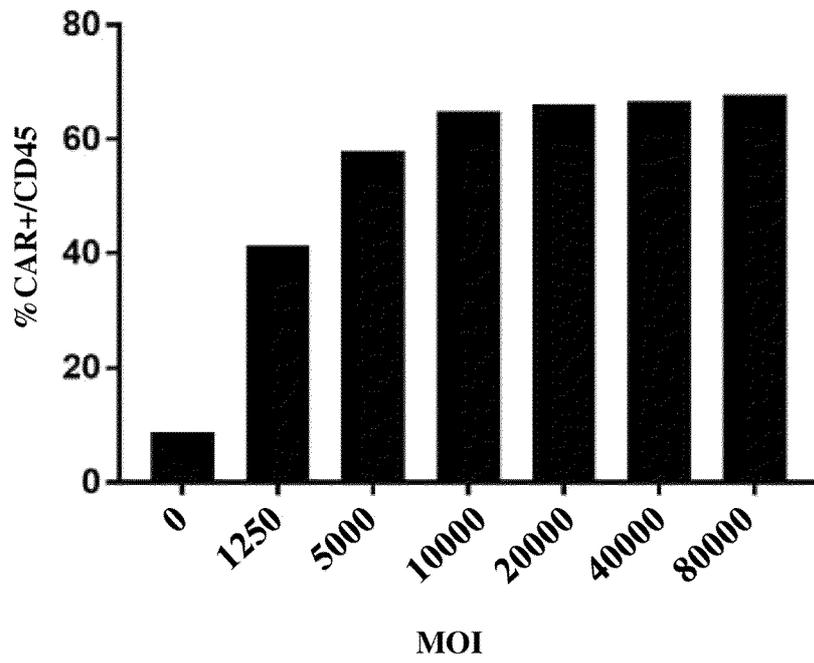
Кратность размножения



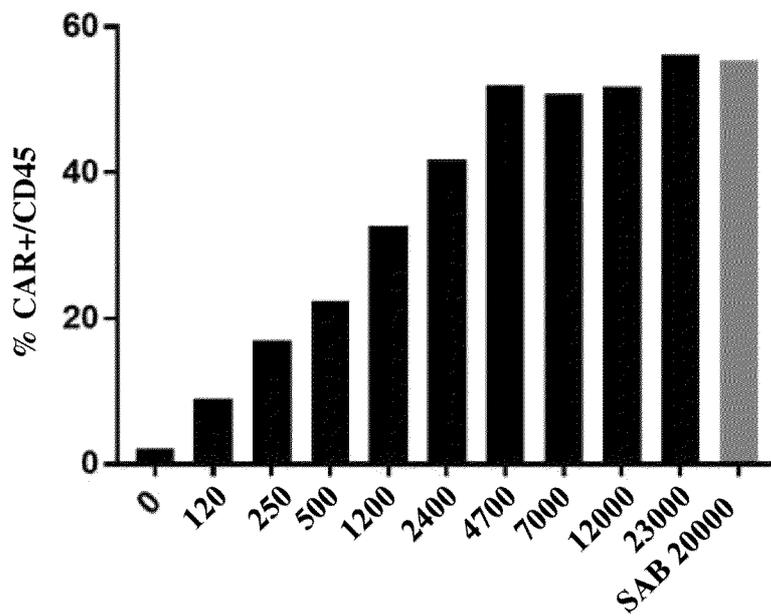
Фиг. 6С



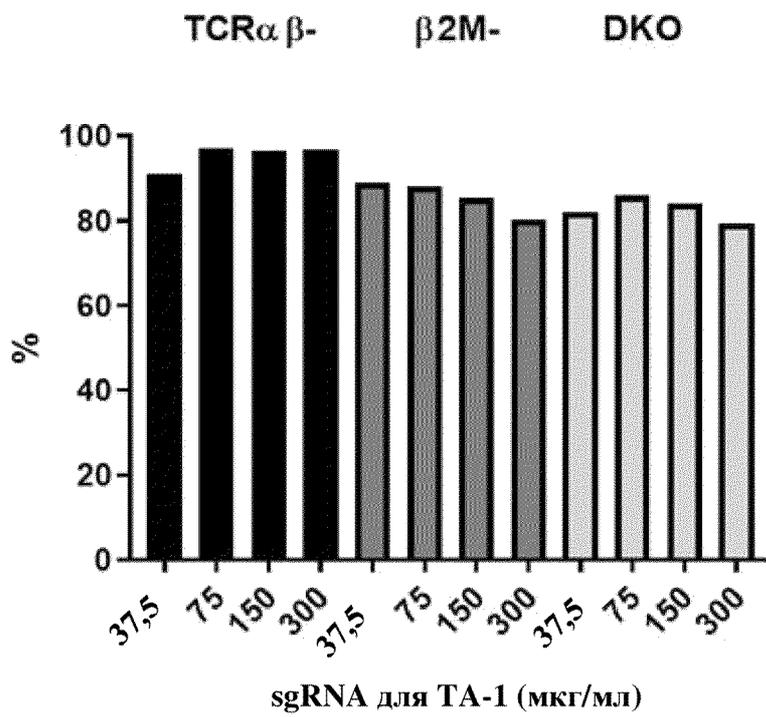
Фиг. 7А



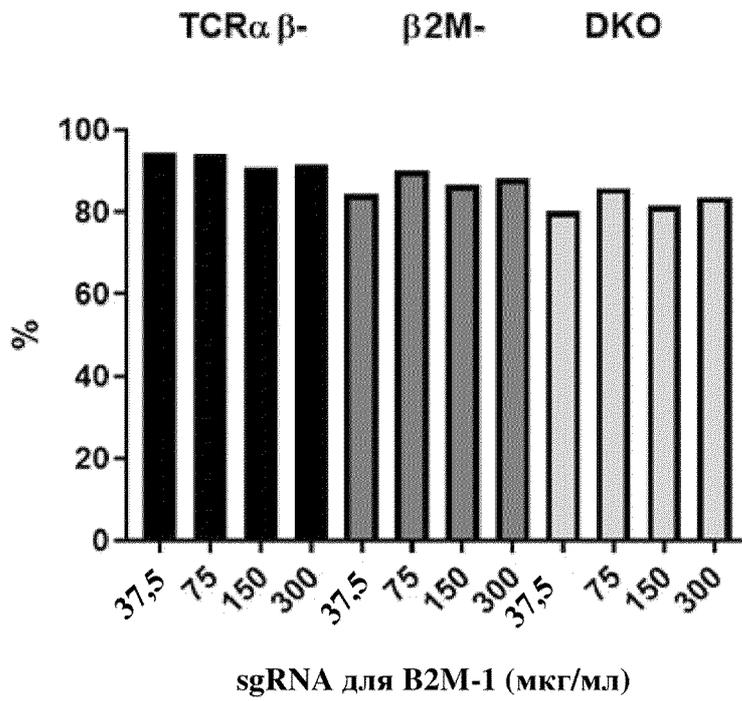
Фиг. 7В



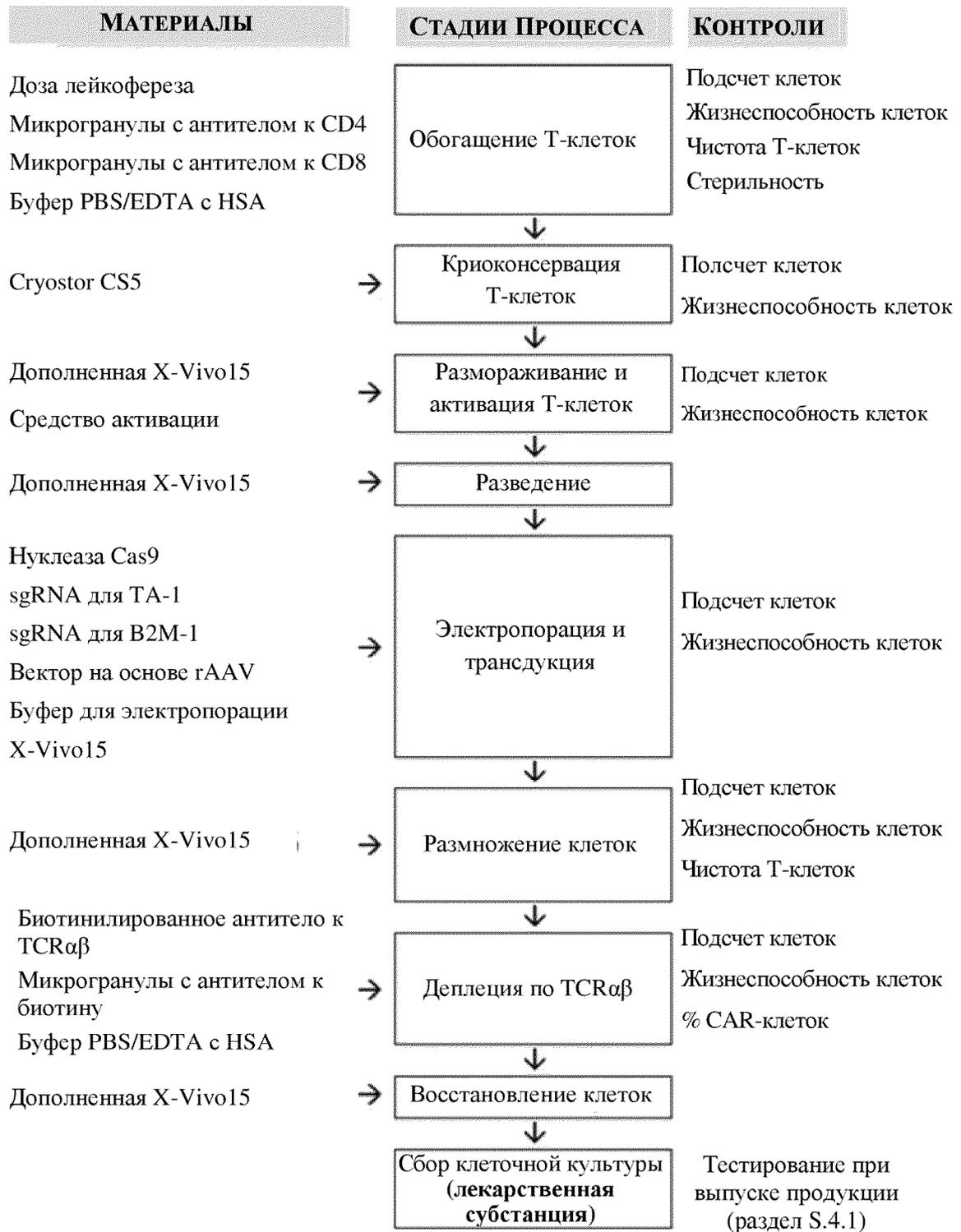
Фиг. 7С



Фиг. 7D

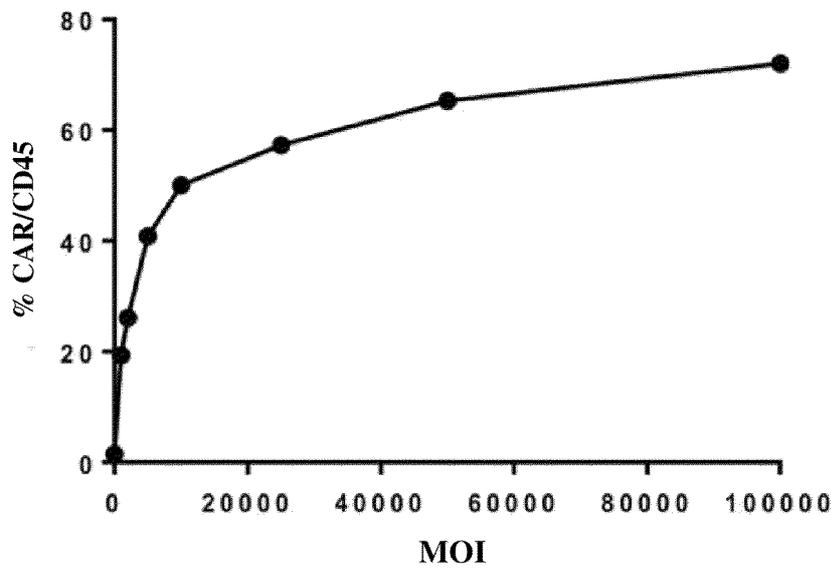


Фиг. 7E

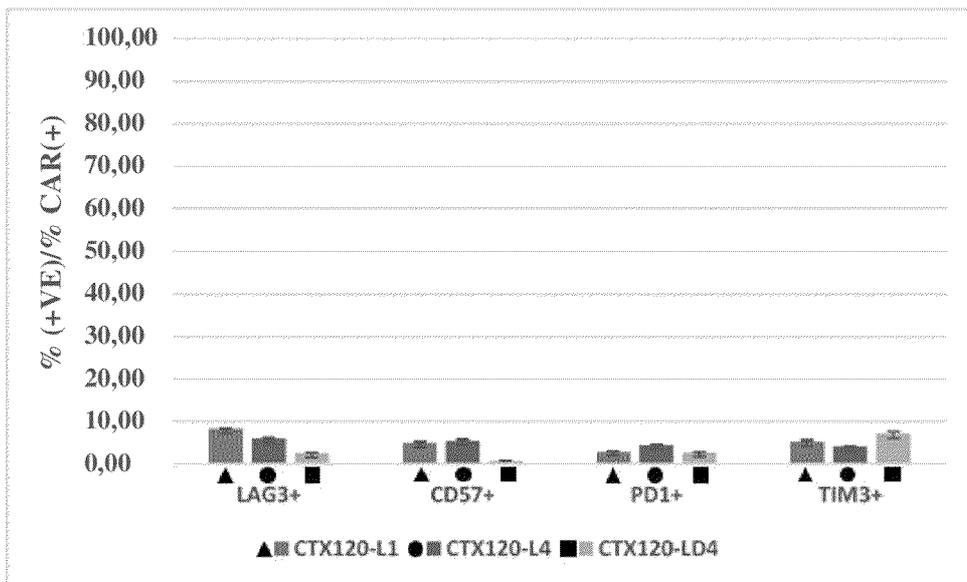


Фиг. 8А

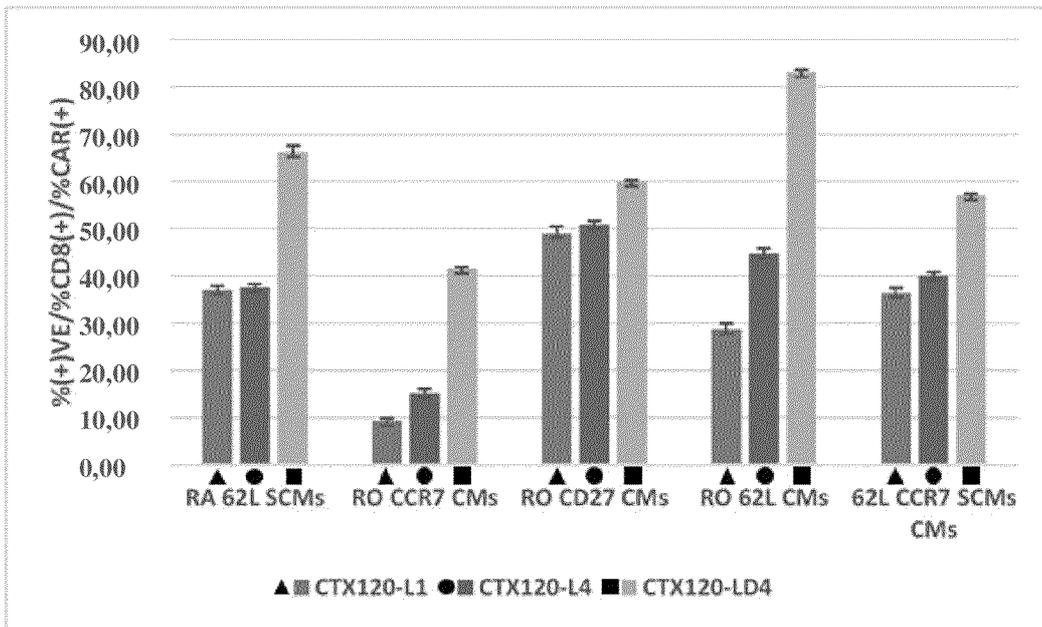
16/52



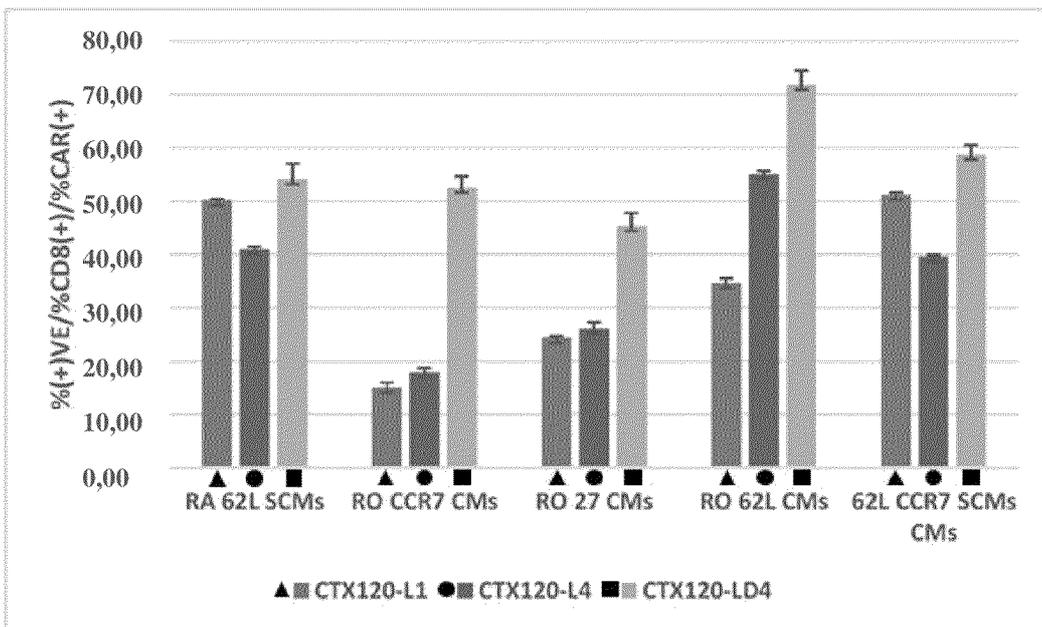
Фиг. 8В



Фиг. 8С

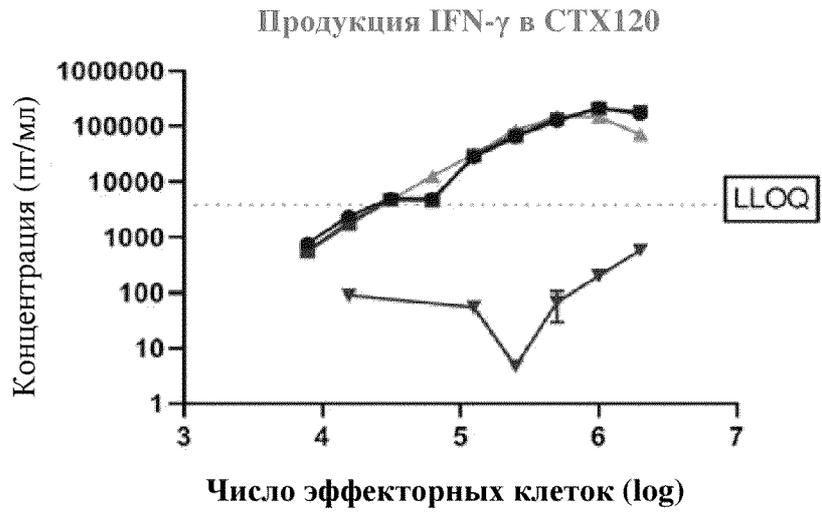


Фиг. 8D

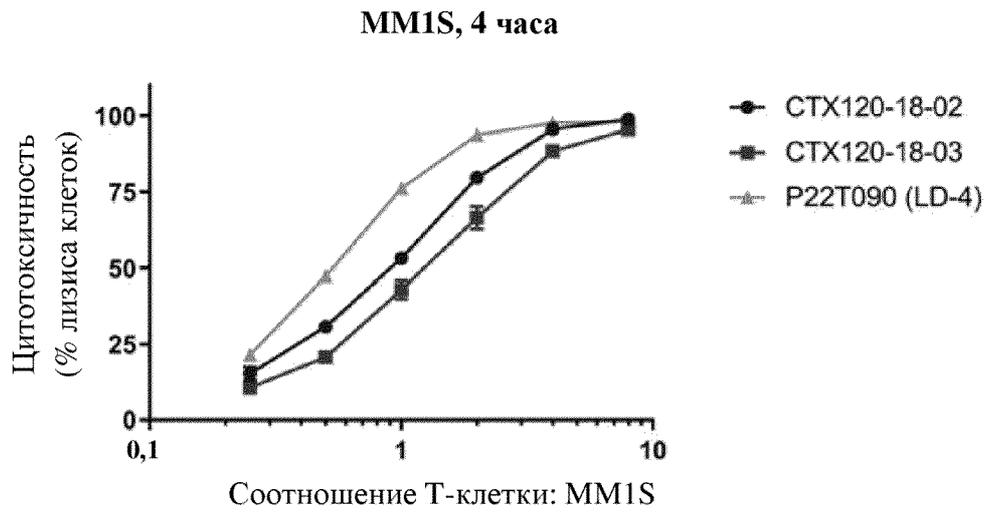


Фиг. 8E

18/52

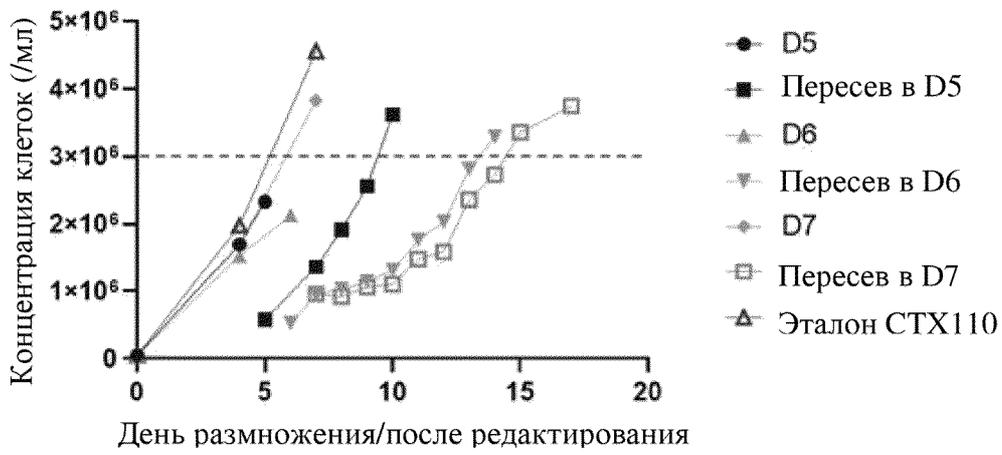


Фиг. 8F



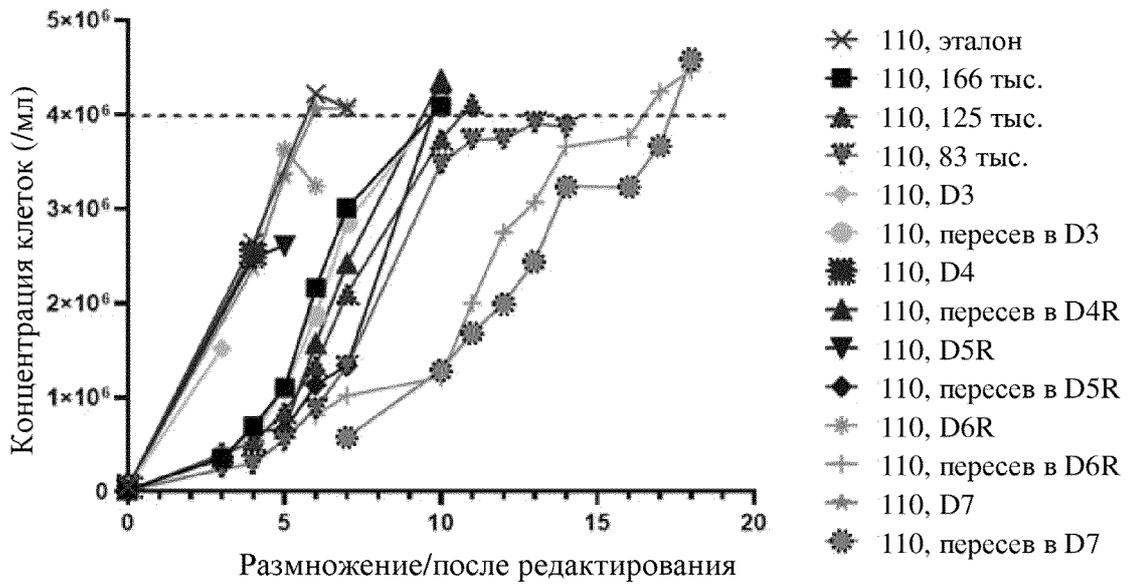
Фиг. 8G

Концентрация клеток

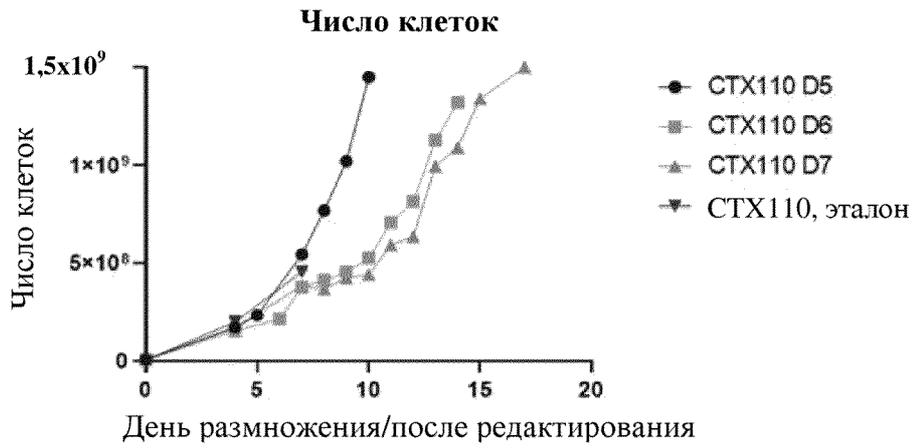


Фиг. 9А

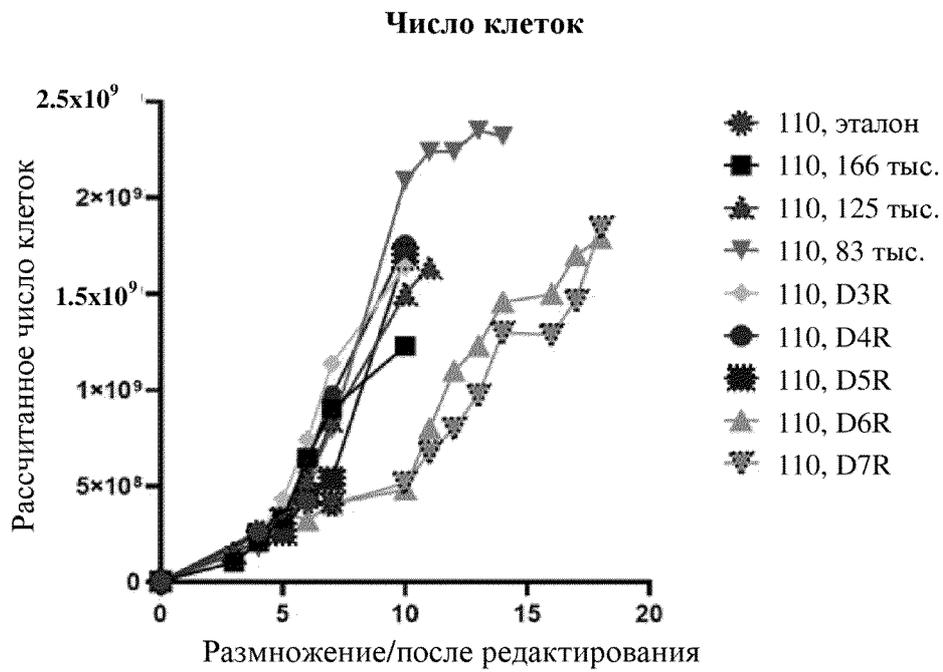
Концентрация клеток



Фиг. 9В

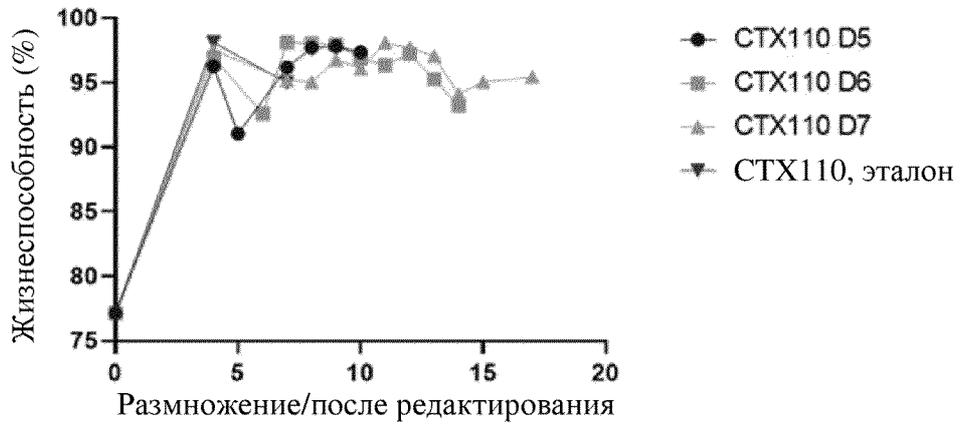


Фиг. 10А



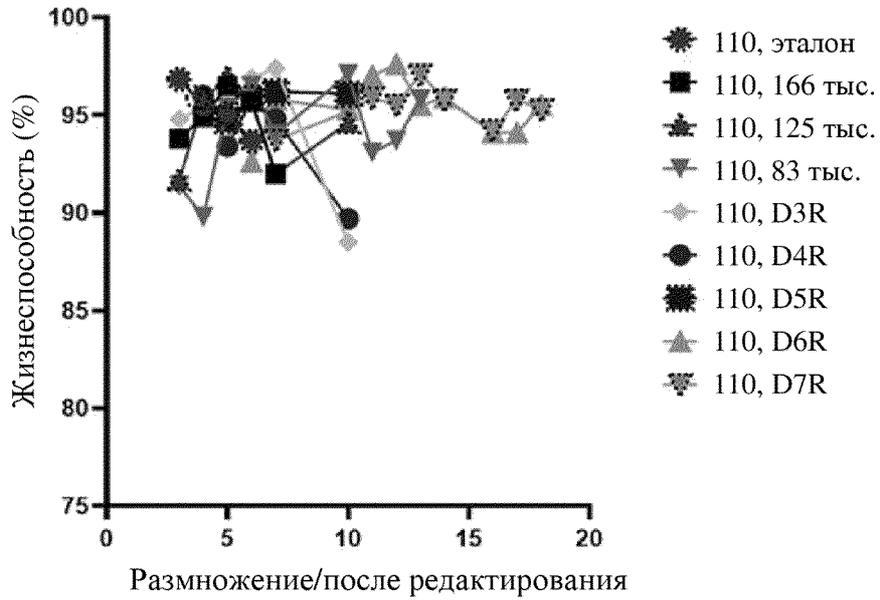
Фиг. 10В

**Жизнеспособность**



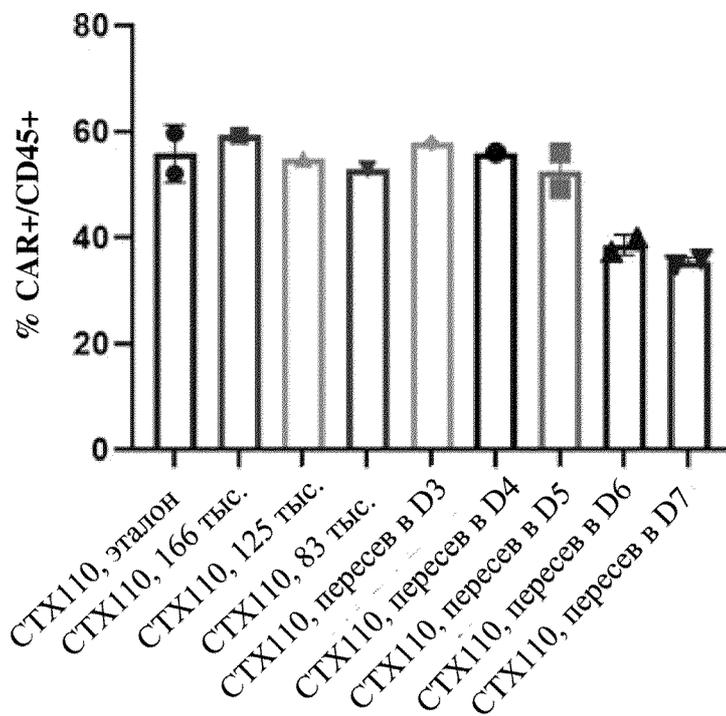
**Фиг. 11А**

**Жизнеспособность**



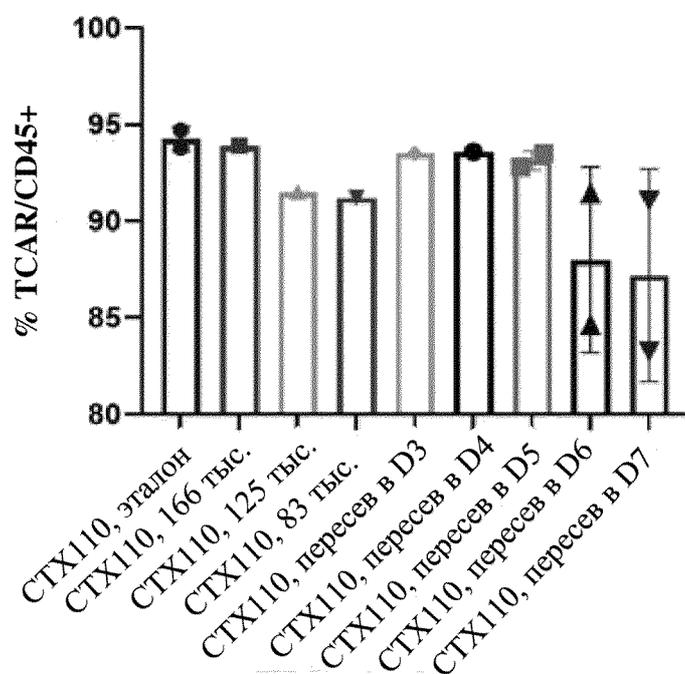
**Фиг. 11В**

% CAR+



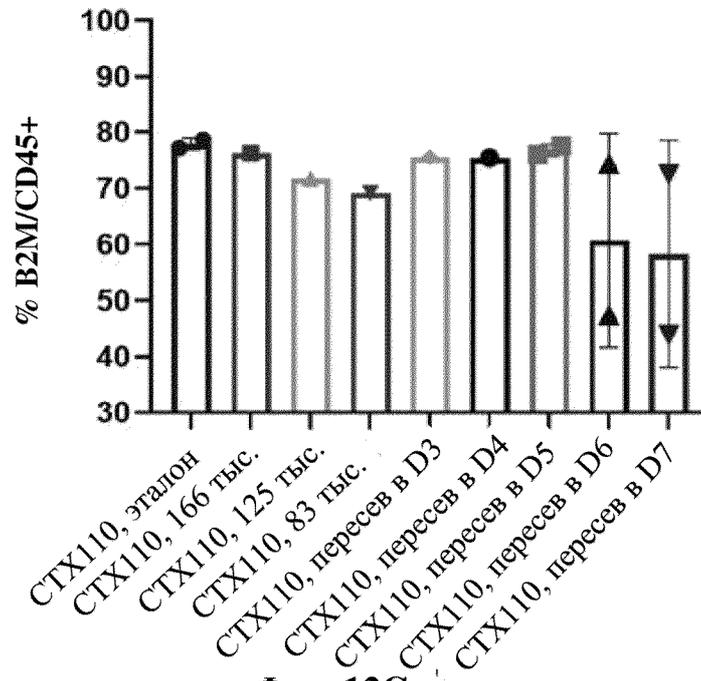
Фиг. 12А

% TRAC-



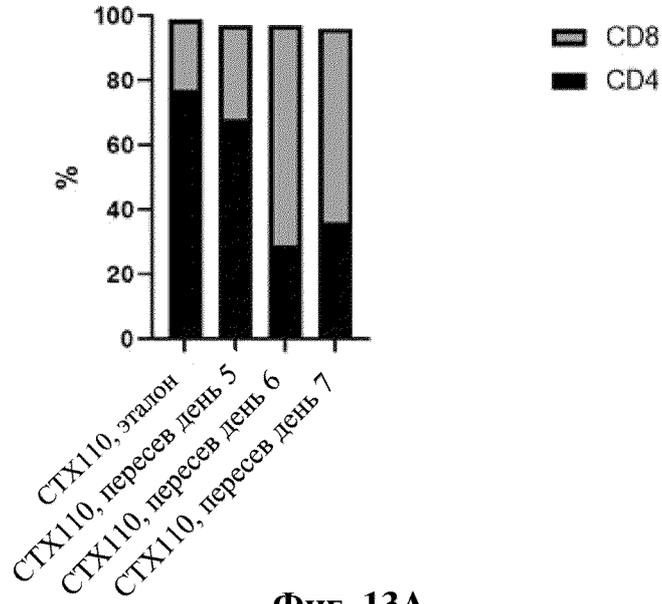
Фиг. 12В

% B2M

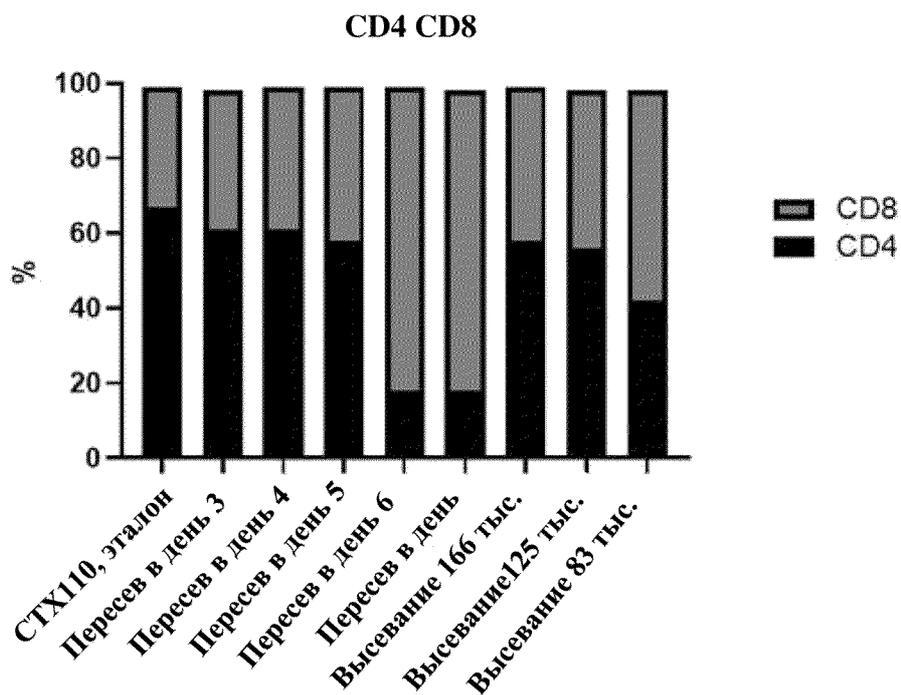


Фиг. 12С

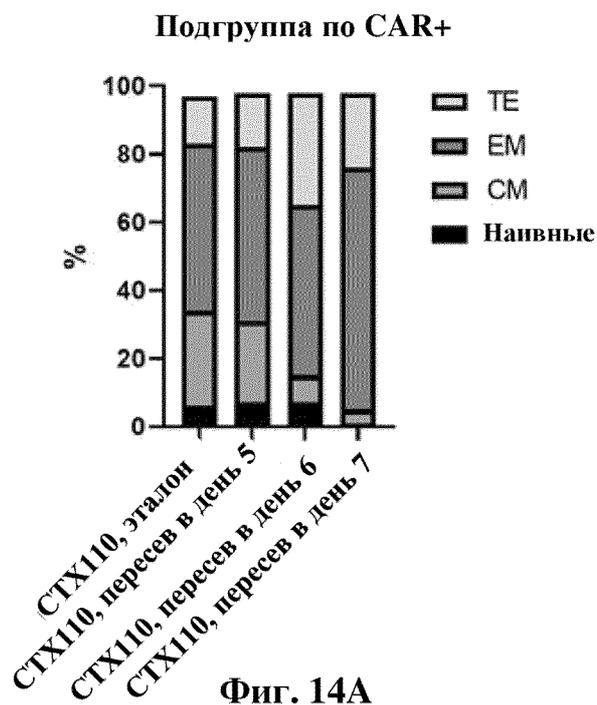
CD4:CD8



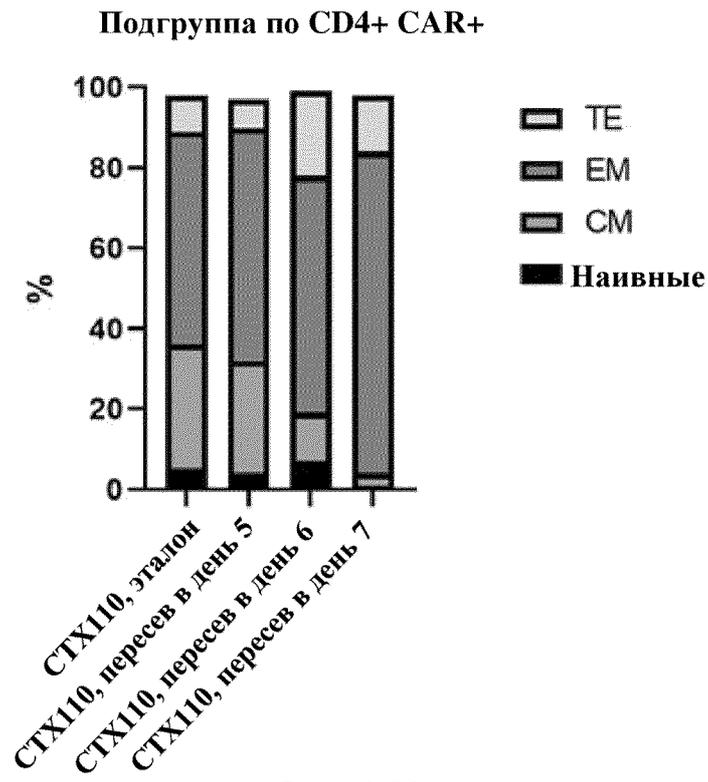
Фиг. 13А



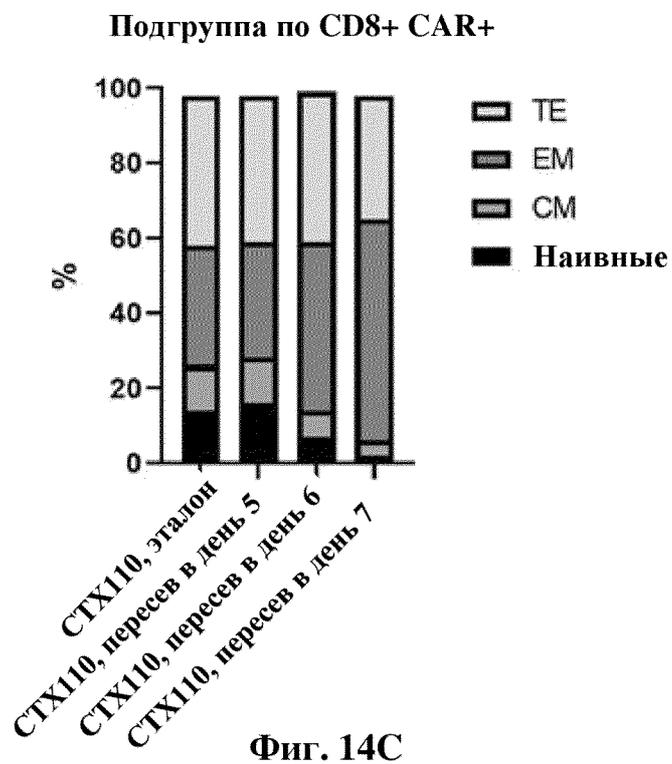
Фиг. 13В



Фиг. 14А

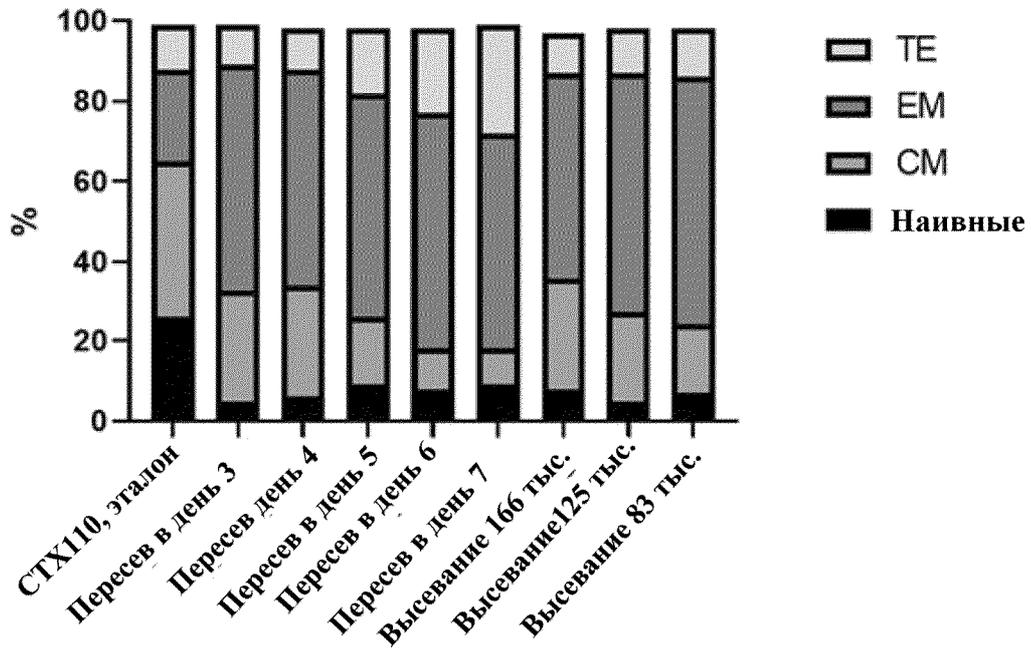


Фиг. 14В



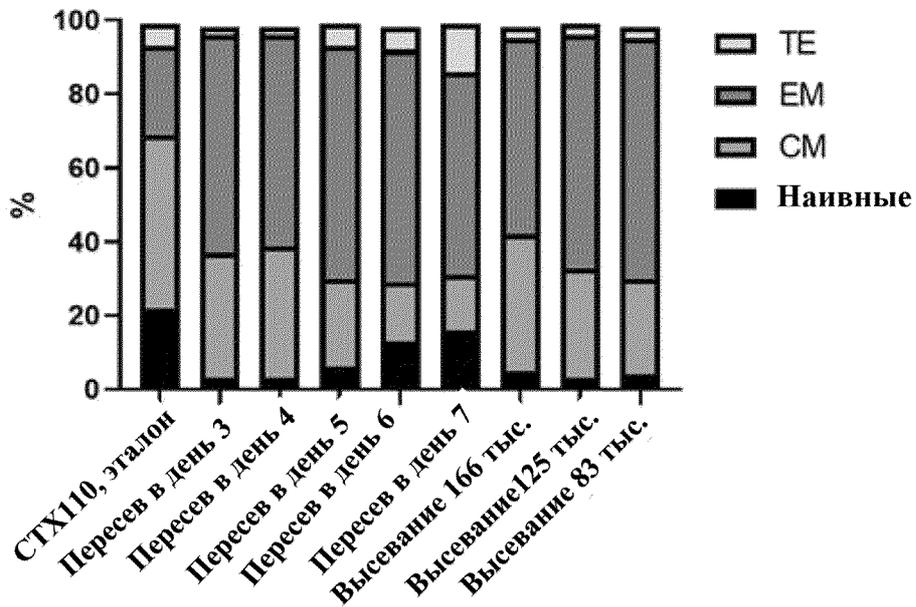
Фиг. 14С

## ПОДГРУППА ПО CAR+



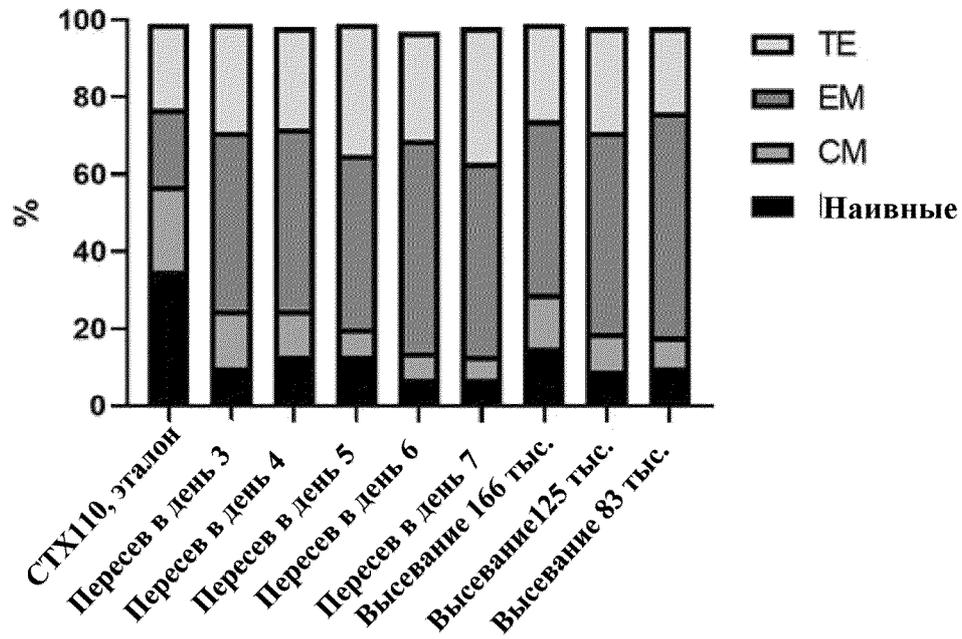
Фиг. 14D

## ПОДГРУППА ПО CD4+ CAR+



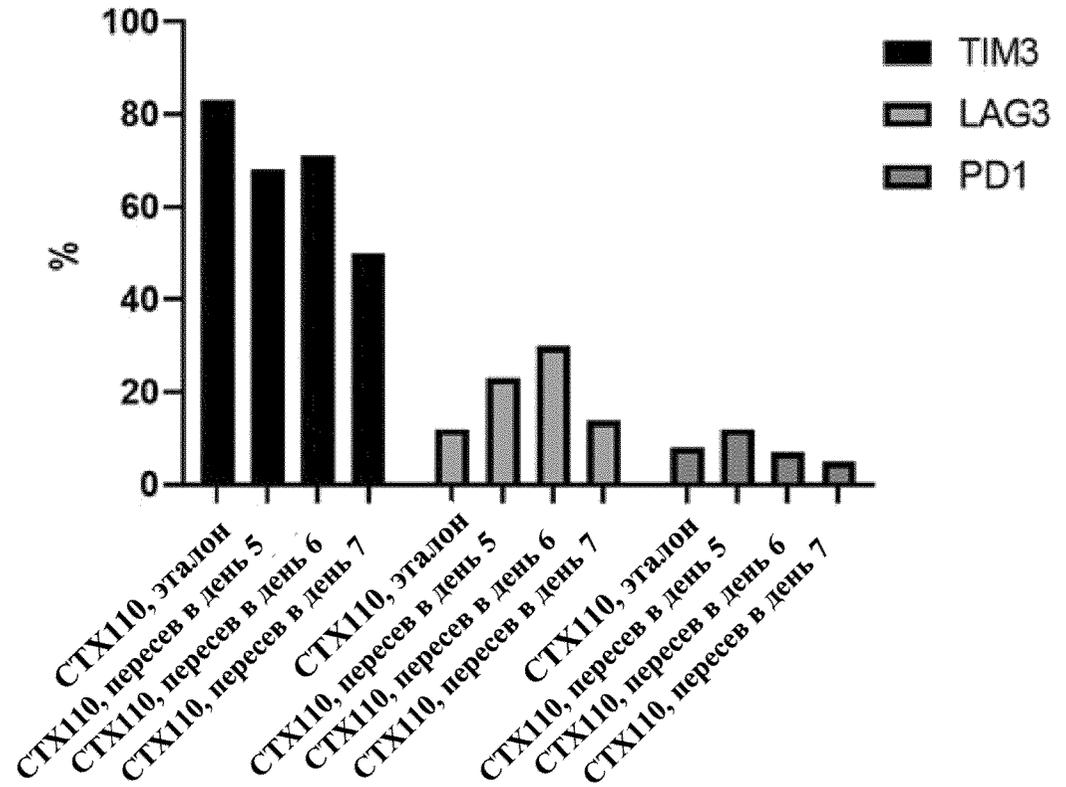
Фиг. 14E

## ПОДГРУППА ПО CD8+ CAR+



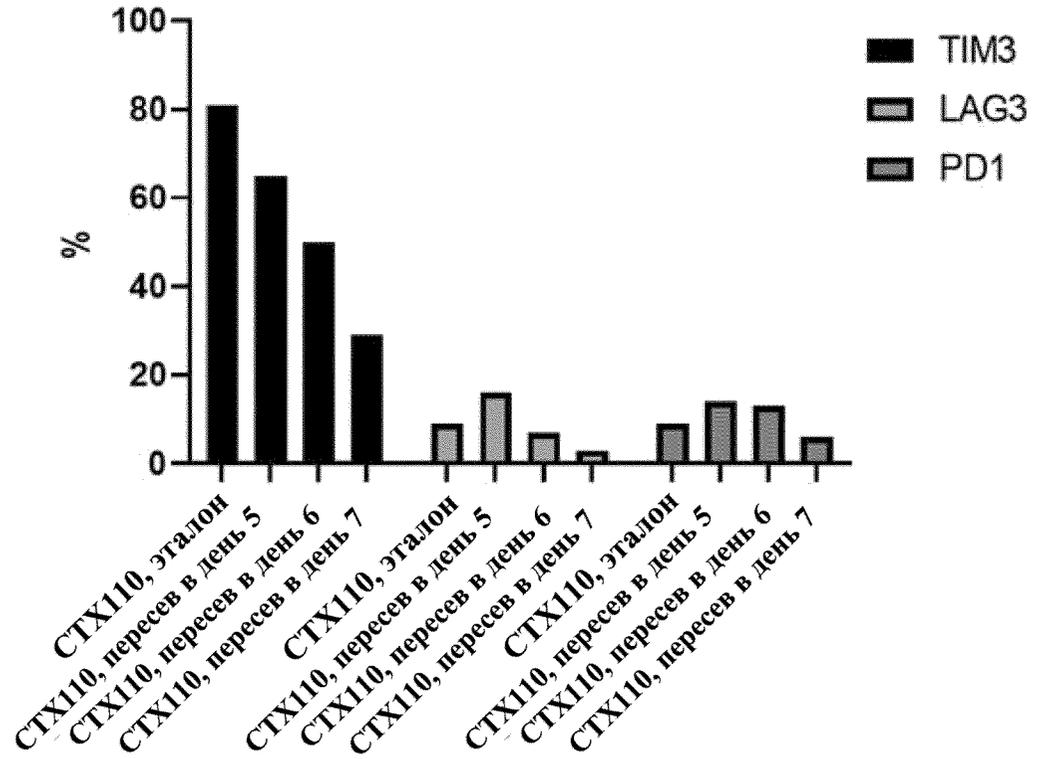
Фиг. 14F

Истощение по CAR+



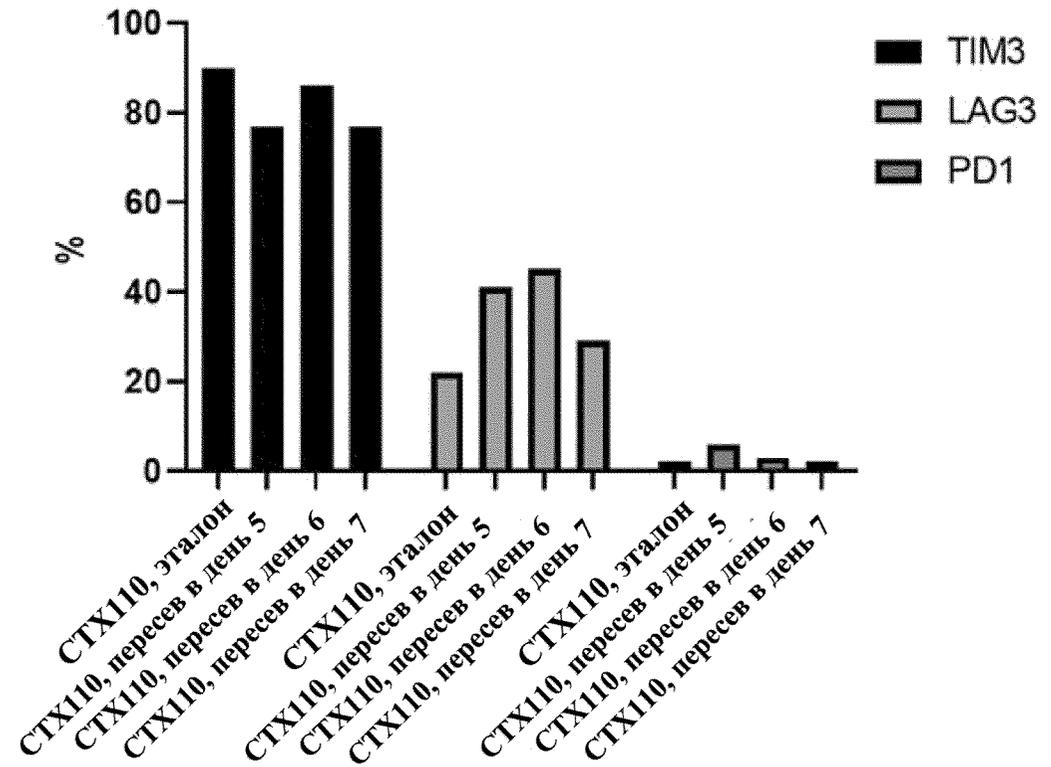
Фиг. 15А

Истощение по CD4+ CAR+



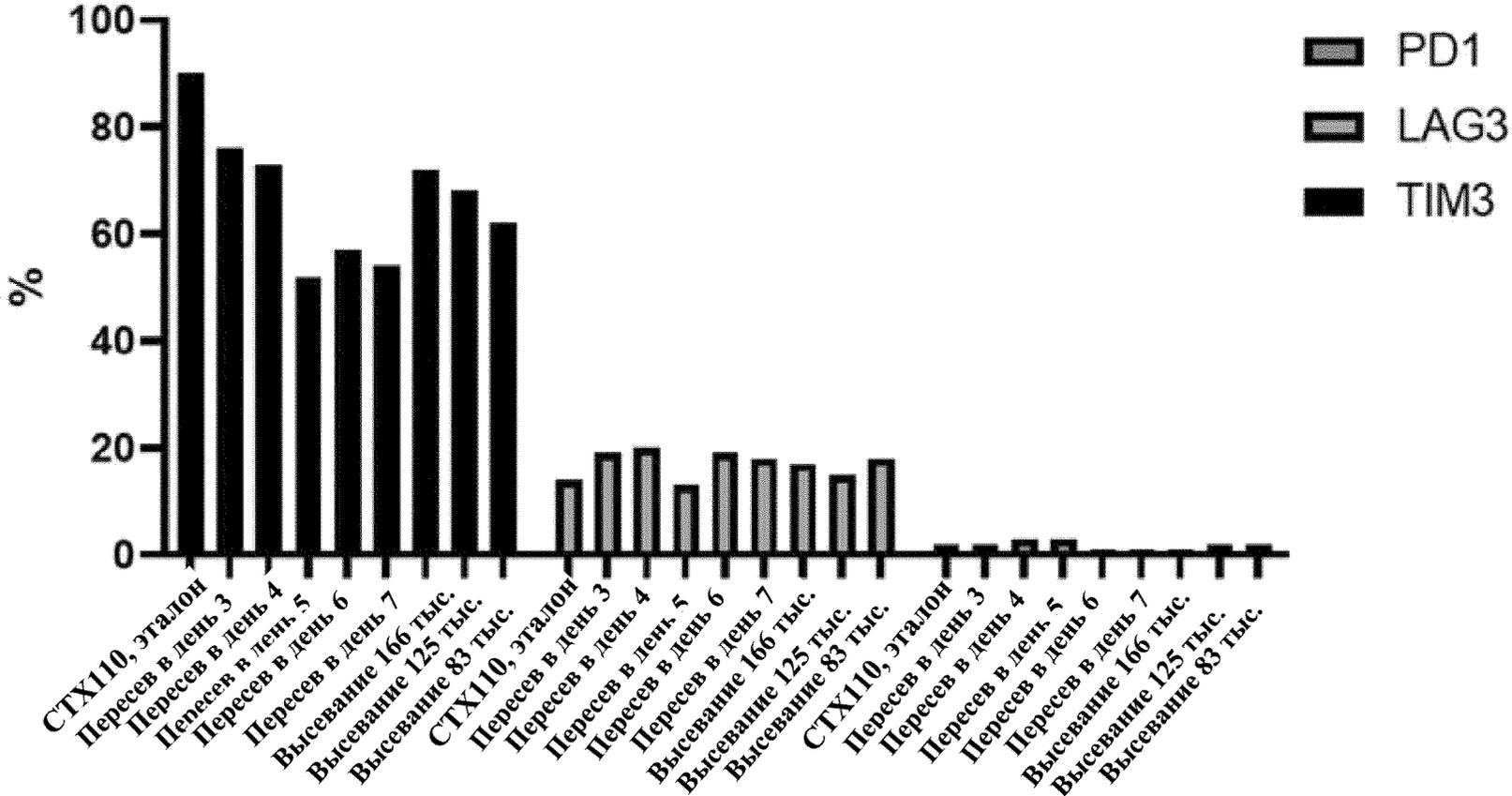
Фиг. 15В

Истощение по CD8+ CAR+



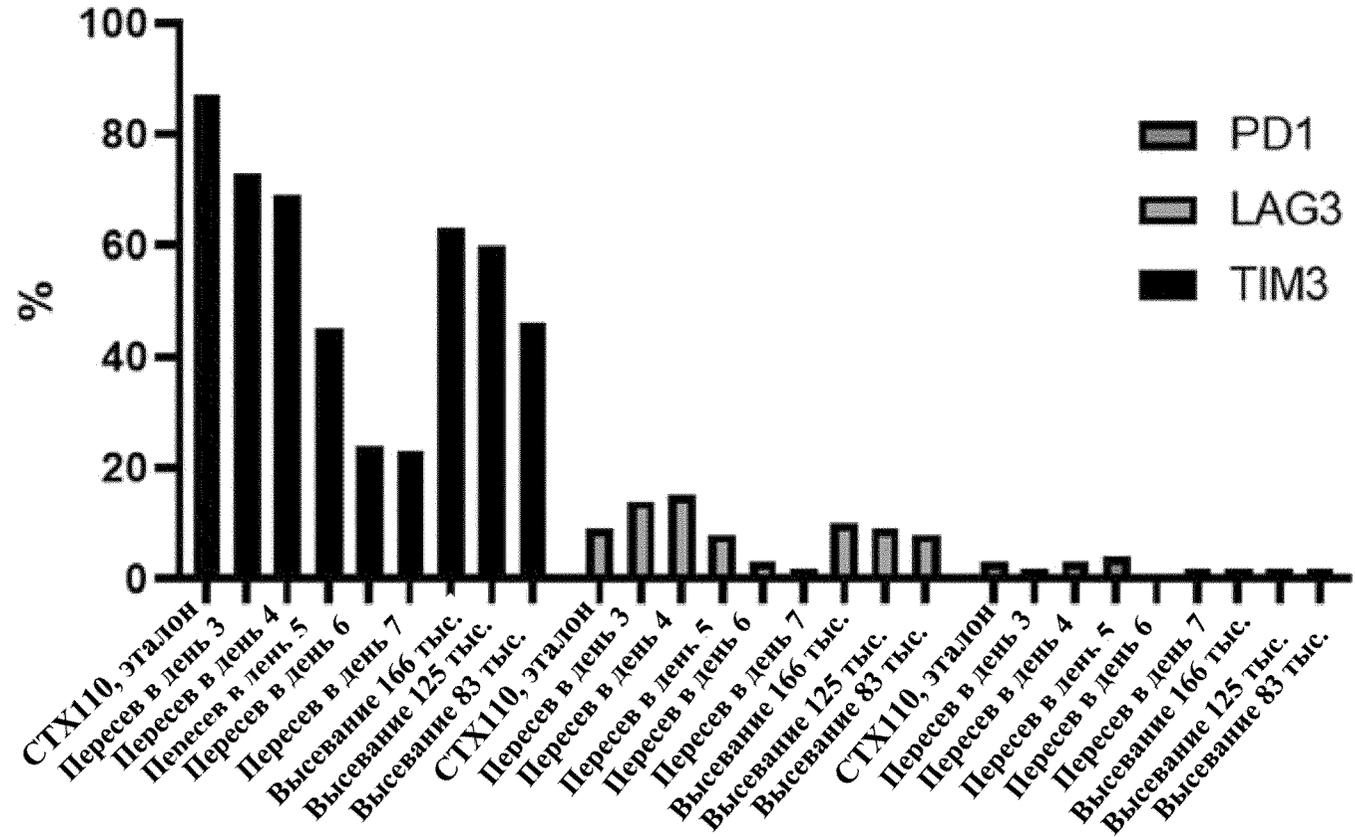
Фиг. 15С

Истощение по CAR+



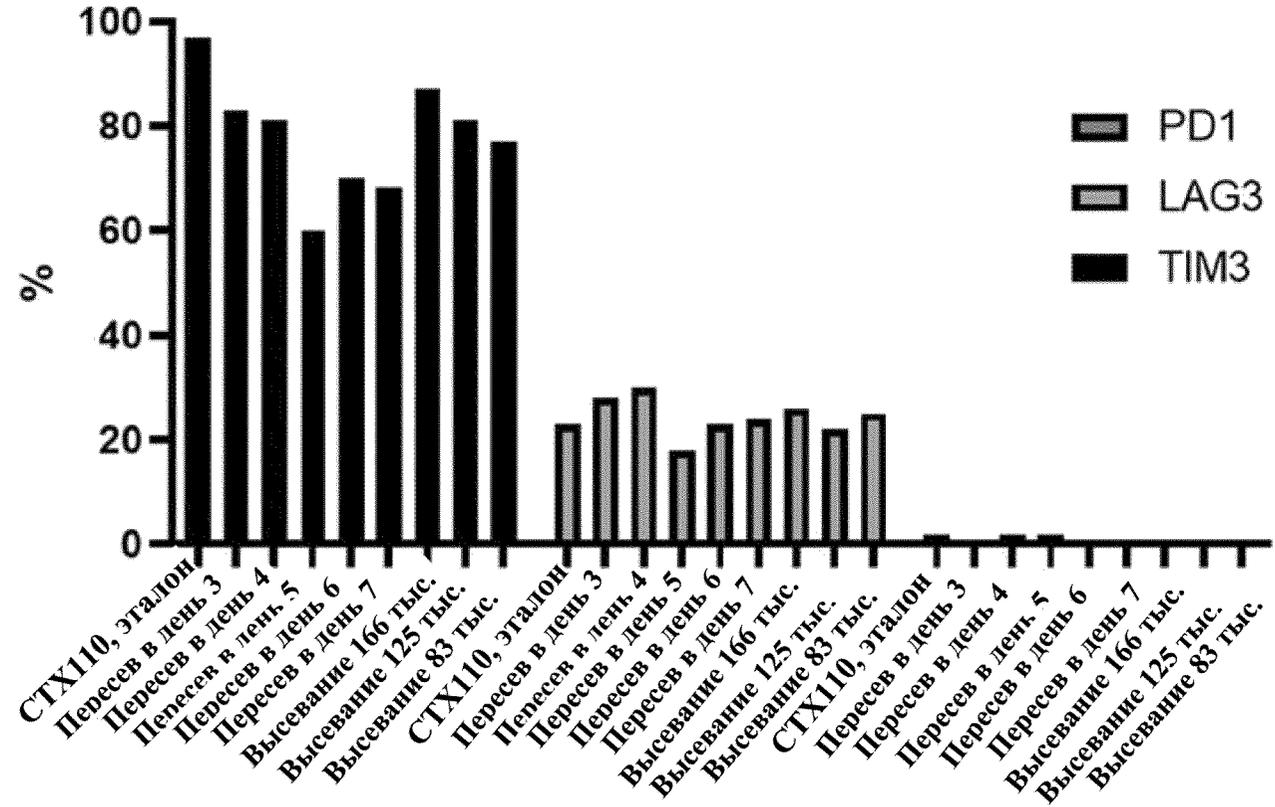
Фиг. 15D

Истощение по CD4+ CAR+



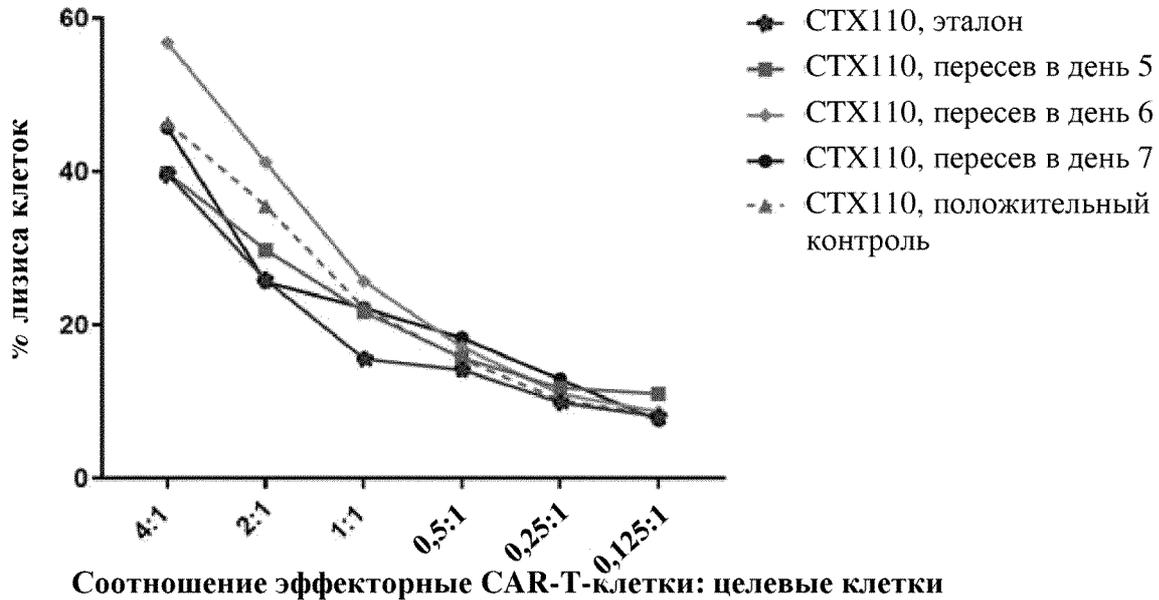
Фиг. 15E

Истощение по CD8+ CAR+

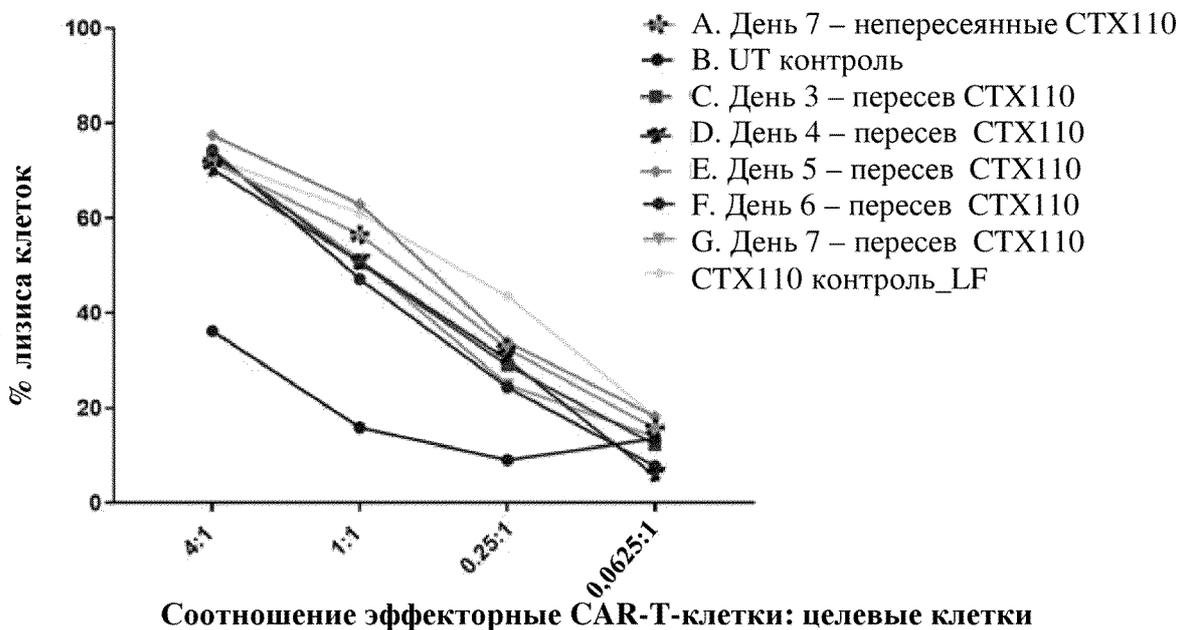


Фиг. 15F

## Цитотоксичность CAR-T-клеток STX110 (24 ч) для клеток Raji

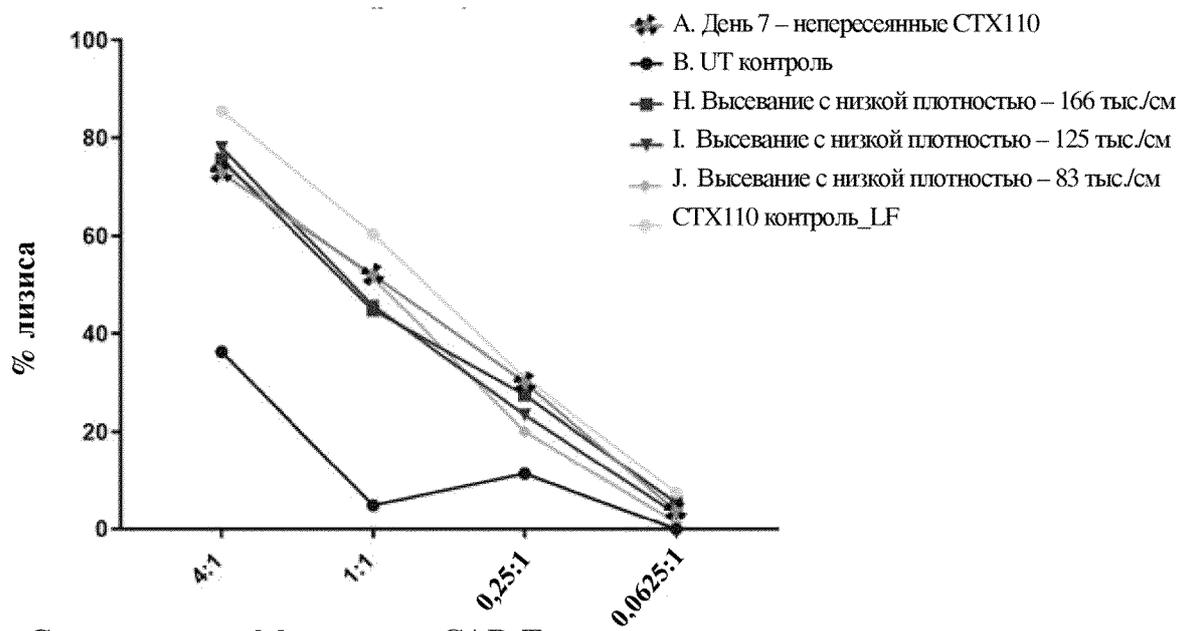


Фиг. 16А

Цитотоксичность CAR-T-клеток STX110 (24 ч) для клеток Raji  
(чашка 1)

Фиг. 16В

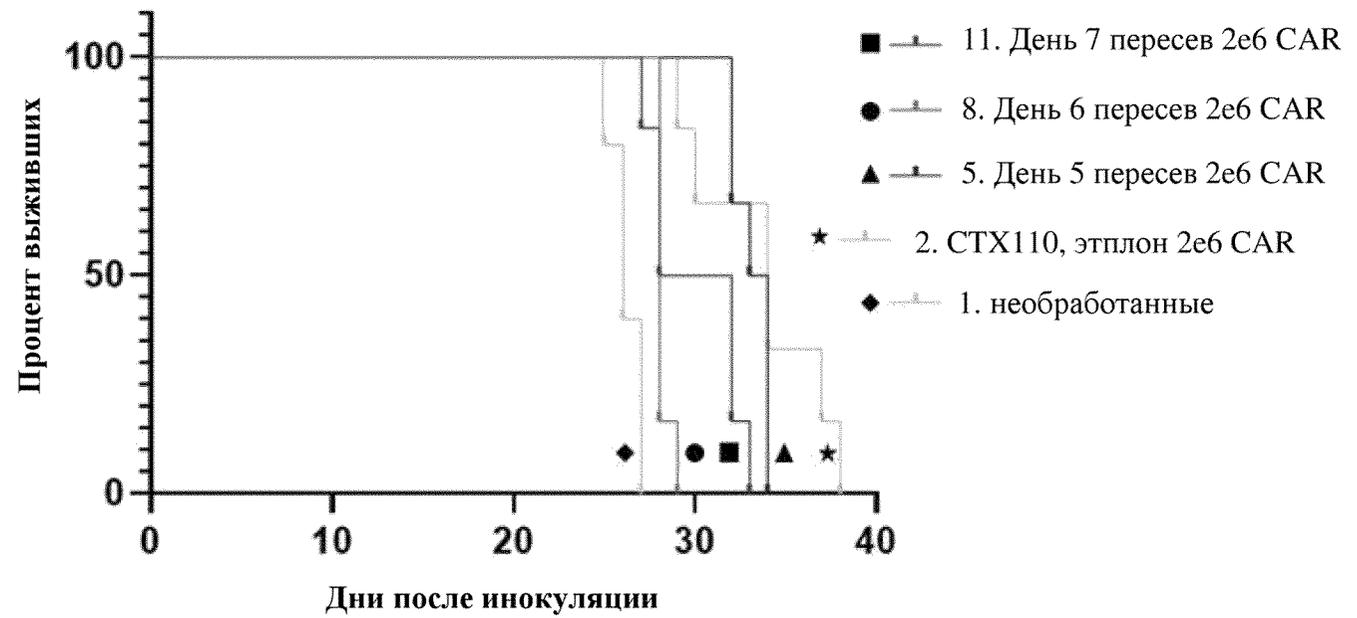
Цитотоксичность CAR-T- клеток СТХ110 (24 ч) для клеток Raji  
(чашка 2)



Соотношение эффекторные CAR-T-клетки: целевые клетки

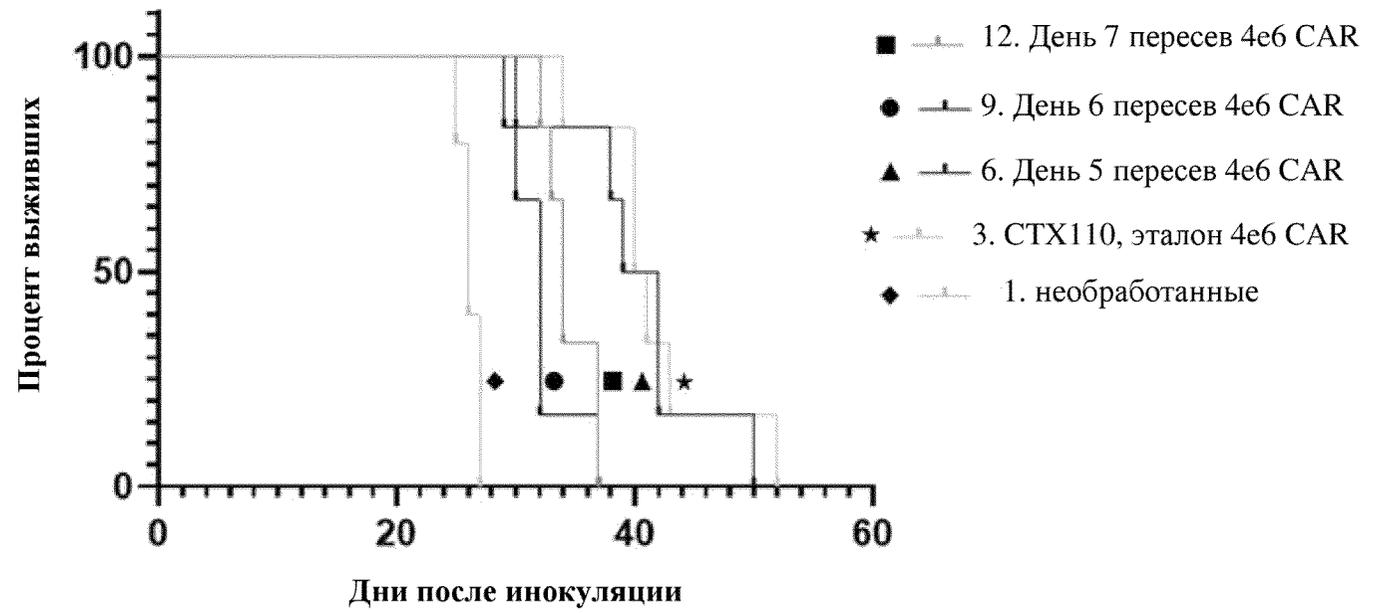
Фиг. 16С

2e6 CAR+ T-клеток

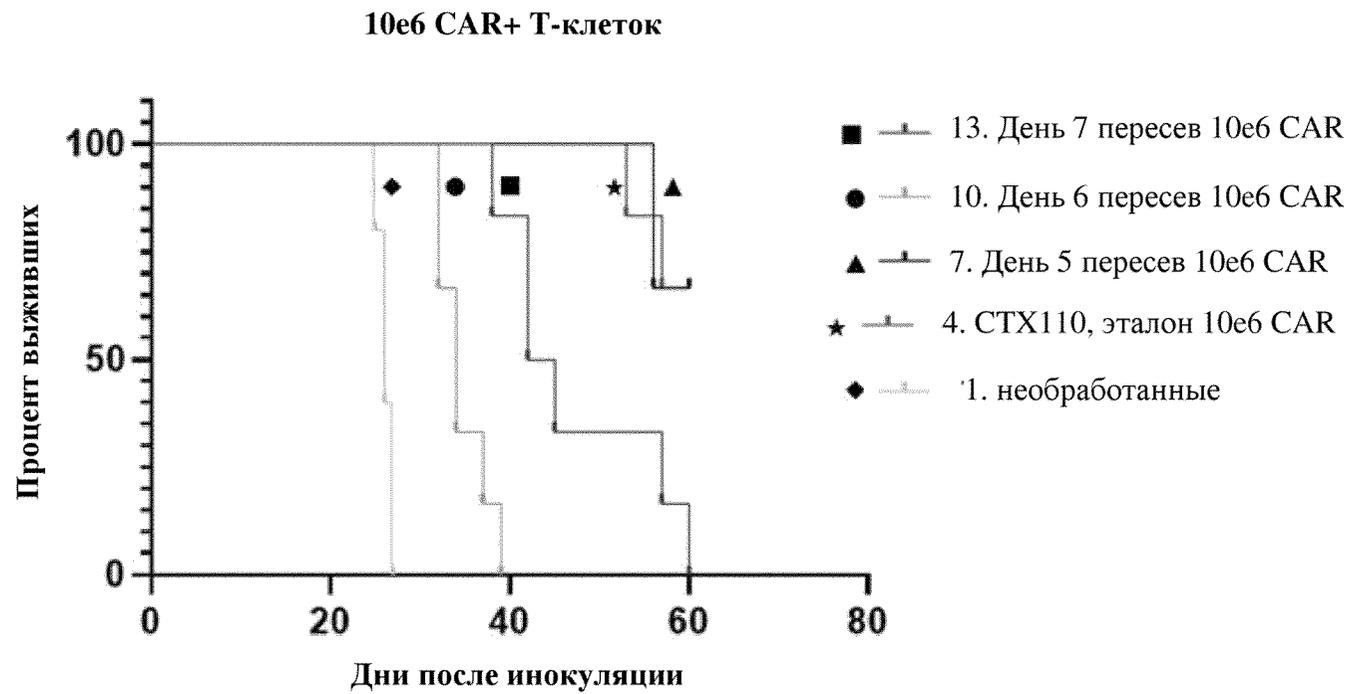


Фиг. 17А

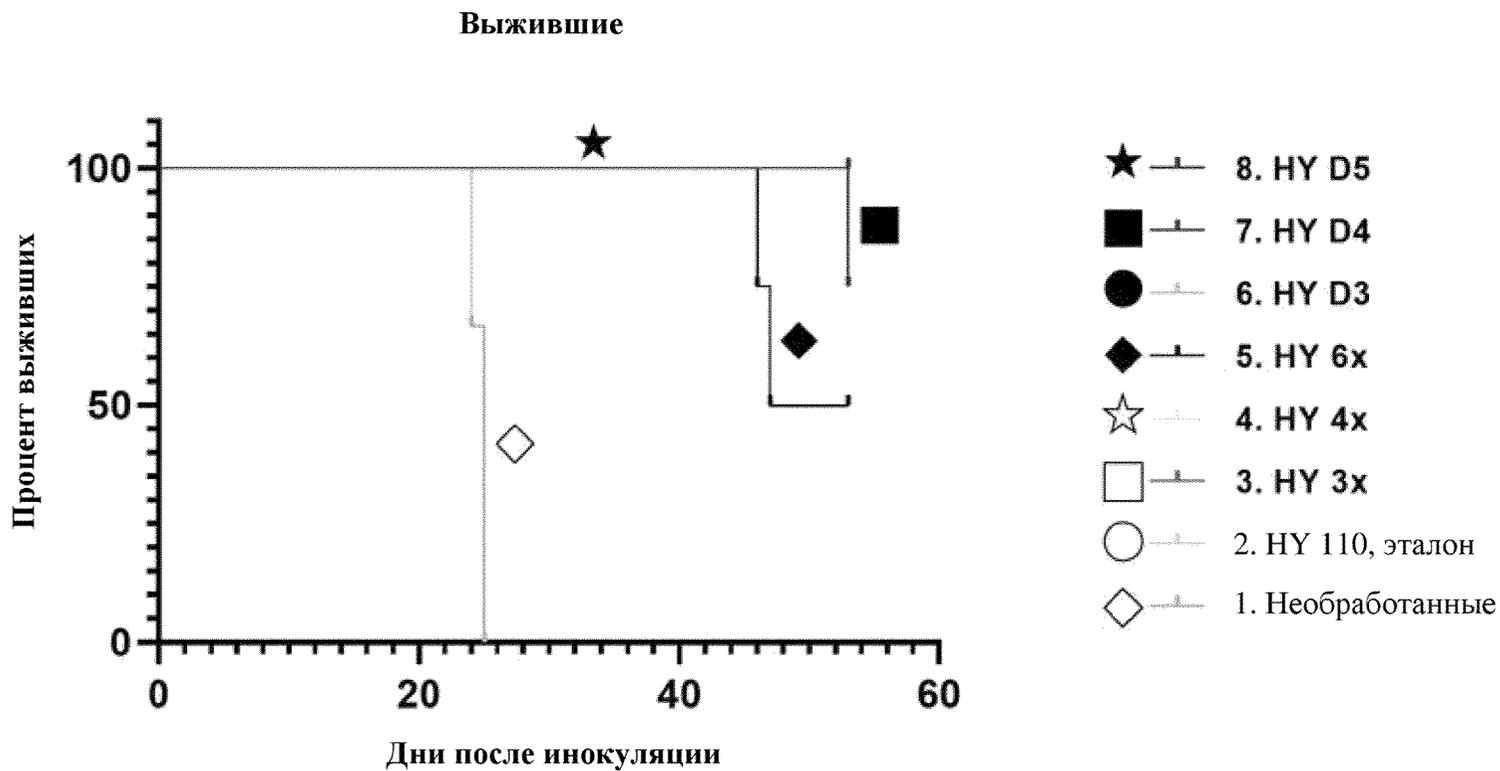
4e6 CAR+ Т-клеток



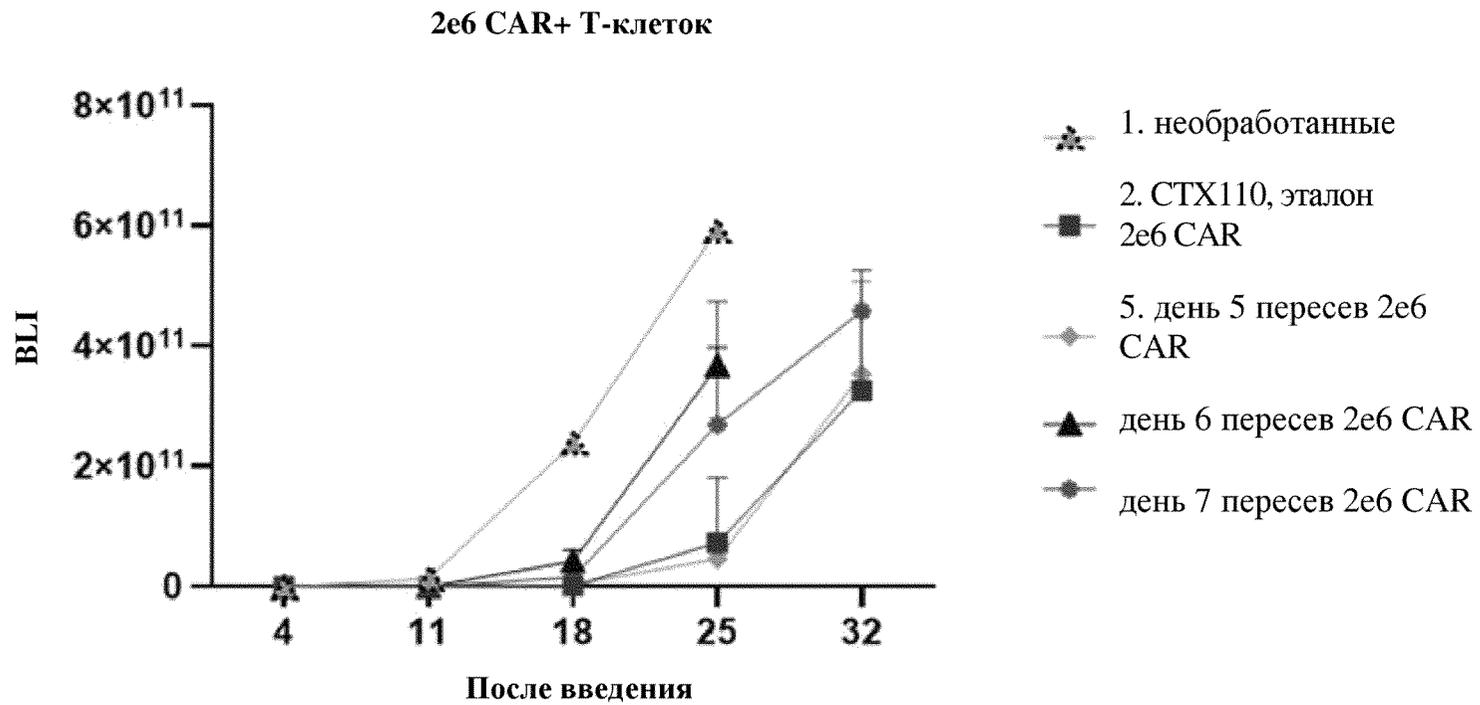
Фиг. 17В



Фиг. 17С

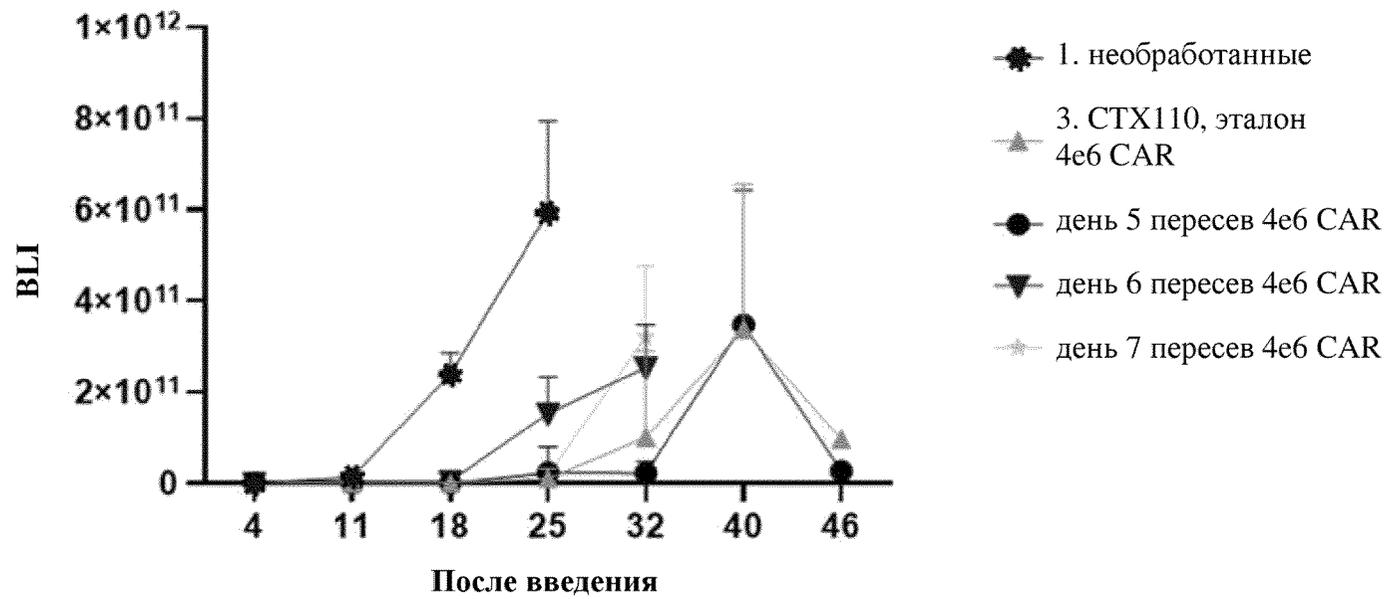


Фиг. 17D



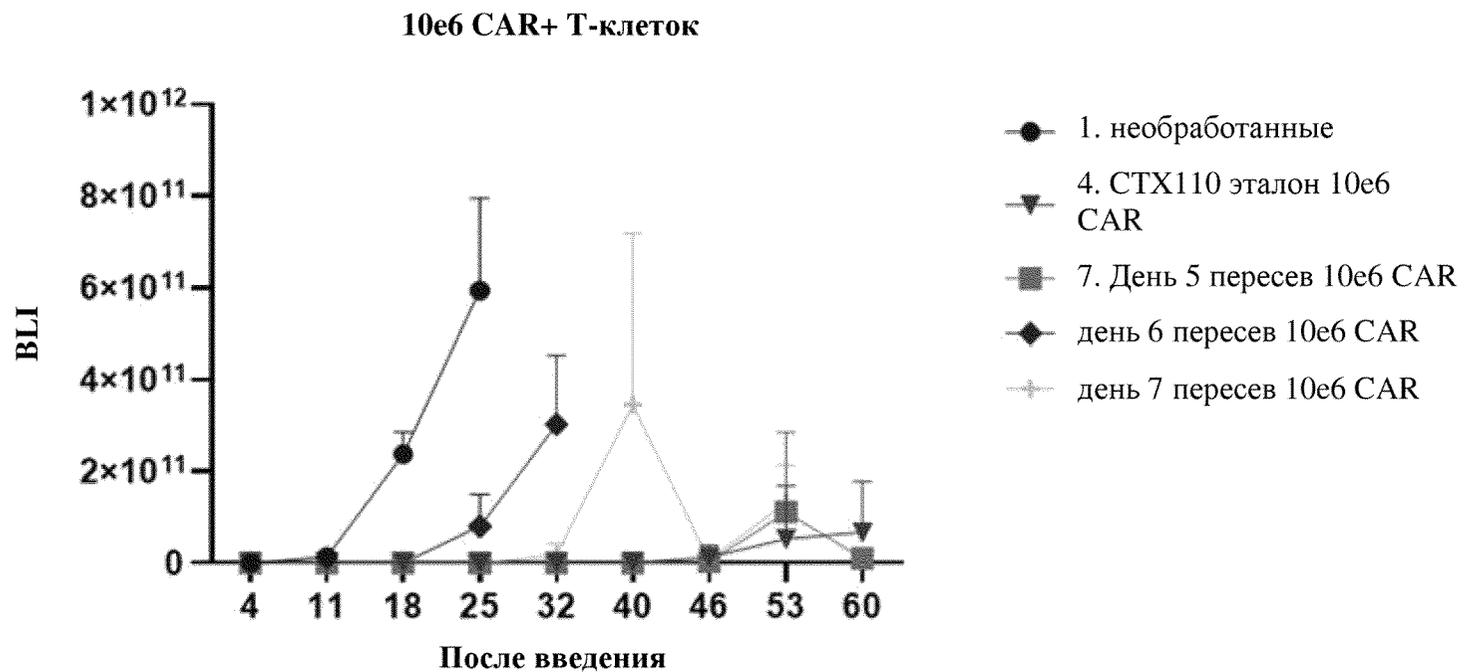
Фиг. 18А

4e6 CAR+ T-клеток

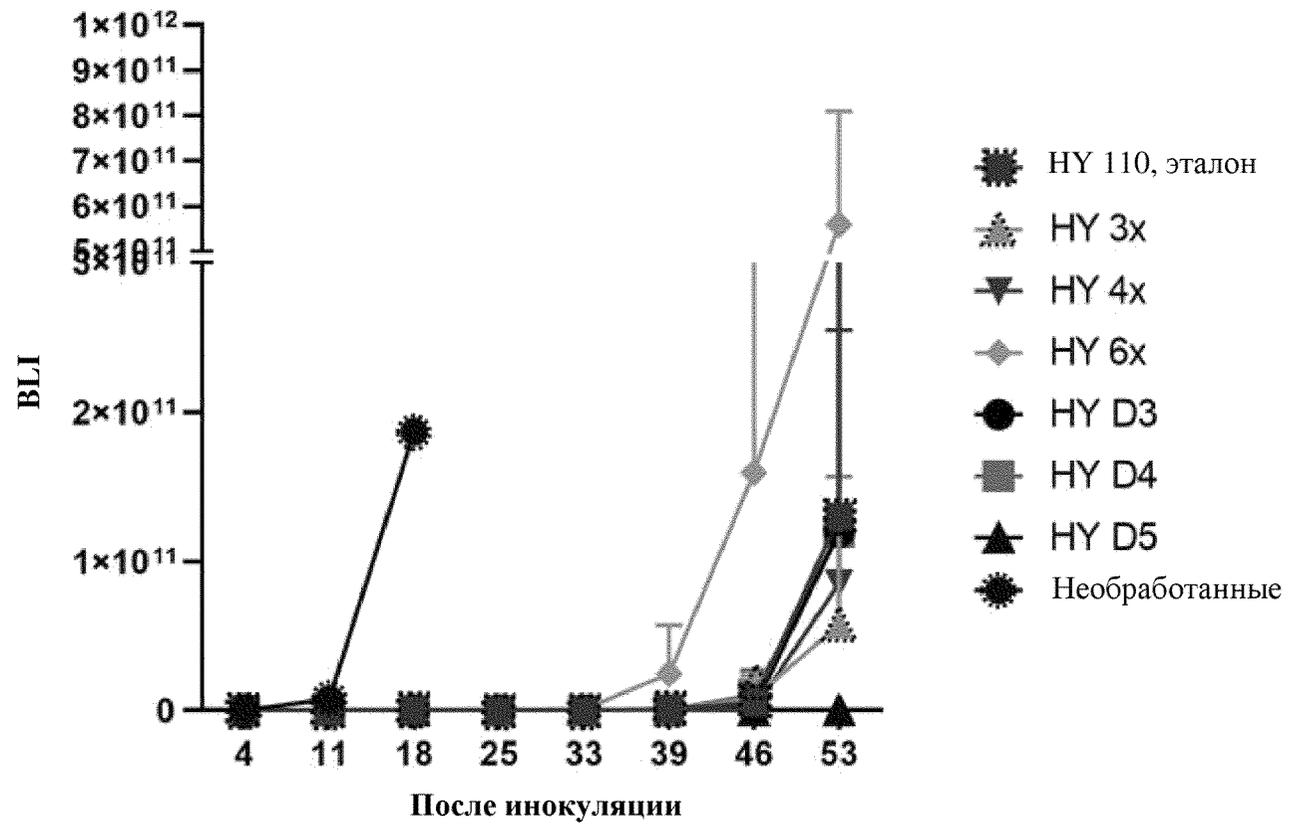


Фиг. 18В

Фиг. 18С



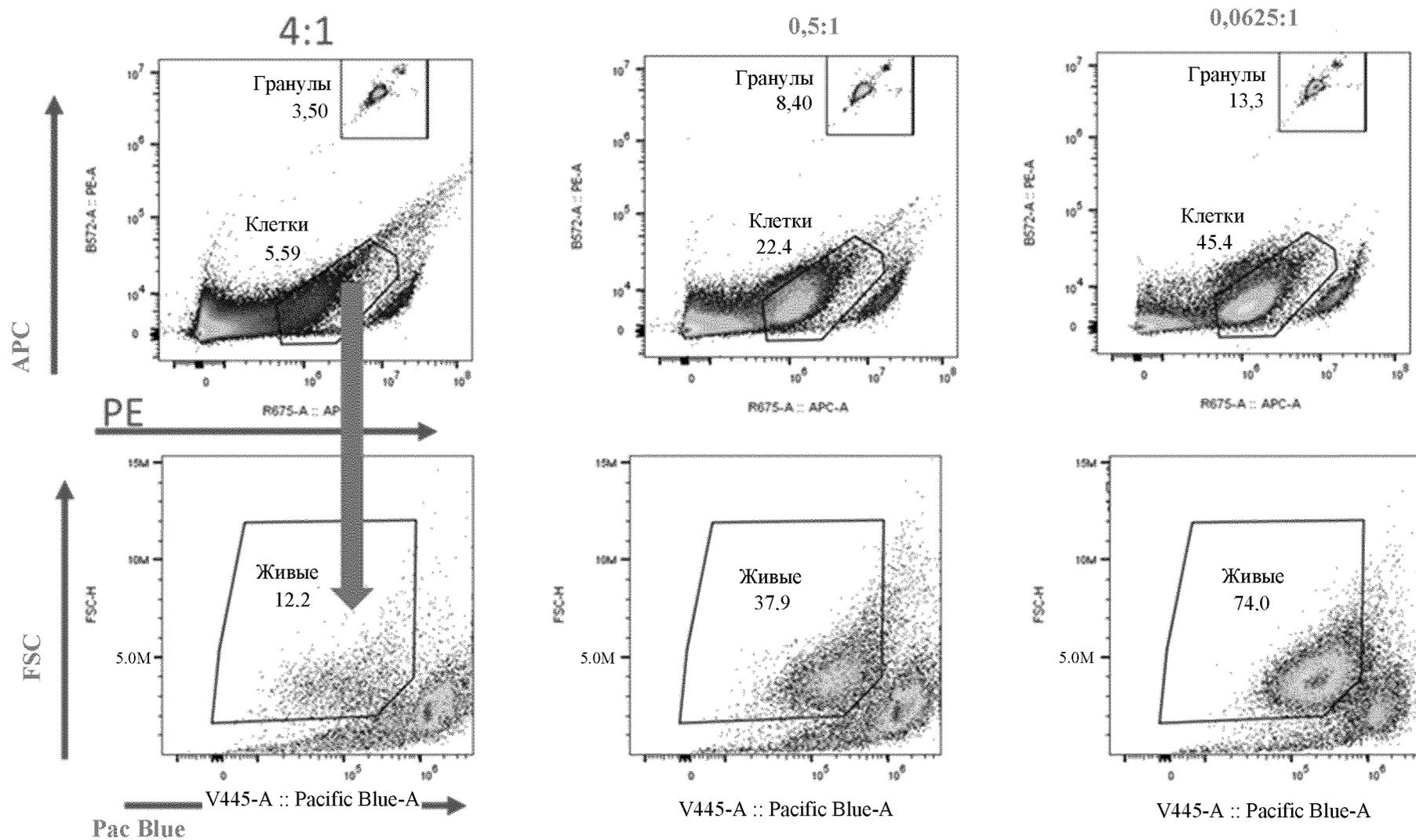
42/52



Фиг. 18D

СТАДИЯ ПРОЦЕССА	ЦЕЛЬ СТАДИИ
Обогащение Т-клеток	Обогащение соответствующими Т -клетками
↓	
Криоконсервация Т-клеток	Хранение Т-клеток до наступления потребности
↓	
Размораживание и активация Т-клеток	Активация Т-клеток с помощью агонистов CD3 и CD28
↓	
Разведение	Разведение для снижения активации, обеспечение восстановление клеток
↓	
Электропорация и транслукция	Нарушение гено TRAC и B2M и вставка кассеты экспрессии CAR в локус TRAC
↓	
Размножение клеток	Размножение клеток
↓	
Деплеция по TCRαβ	Удаление TCRαβ <sup>+</sup> клеток
↓	
Восстановление клеток	Обеспечение восстановления клеток
↓	
Сбор клеточной культуры (лекарственная субстанция)	Сбор клеток при подготовке к производству лекарственного продукта, Сбор образцов клеток для испытаний на безопасност

Фиг. 19

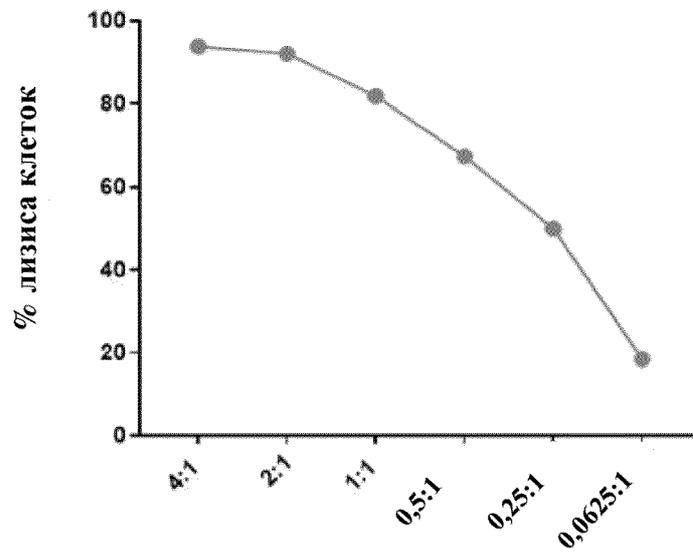


45/52

Фиг. 20

46/52

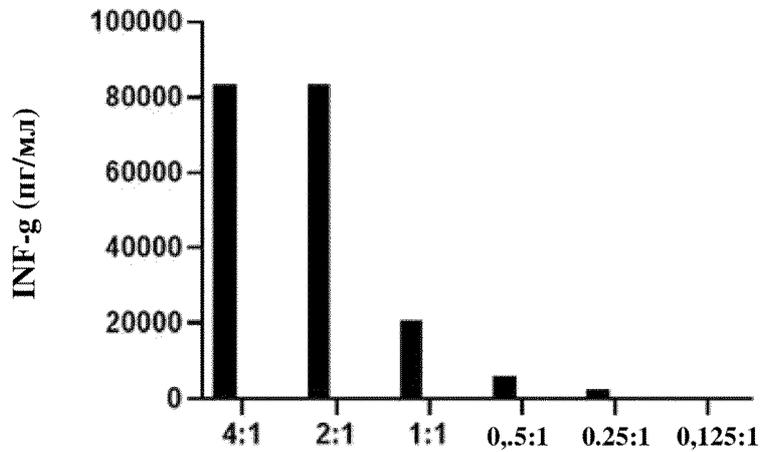
Токсичность Т-клеток с CAR к CD19: клетки Raji  
(24 ч)



Соотношение эффекторные CAR-T-клетки: целевые клетки

Фиг. 21 А

Продукция IFN $\gamma$  в среде для культивирования

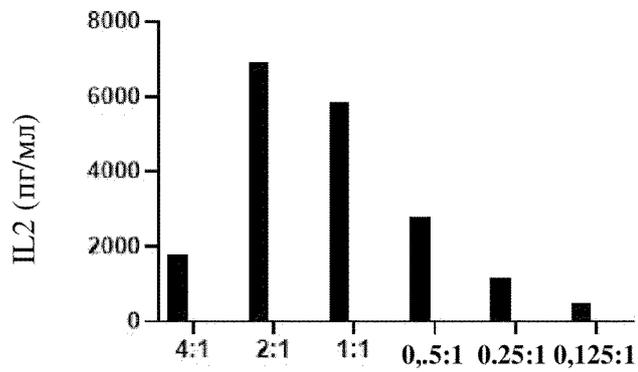


Соотношение эффекторные CAR-T-клетки: целевые клетки

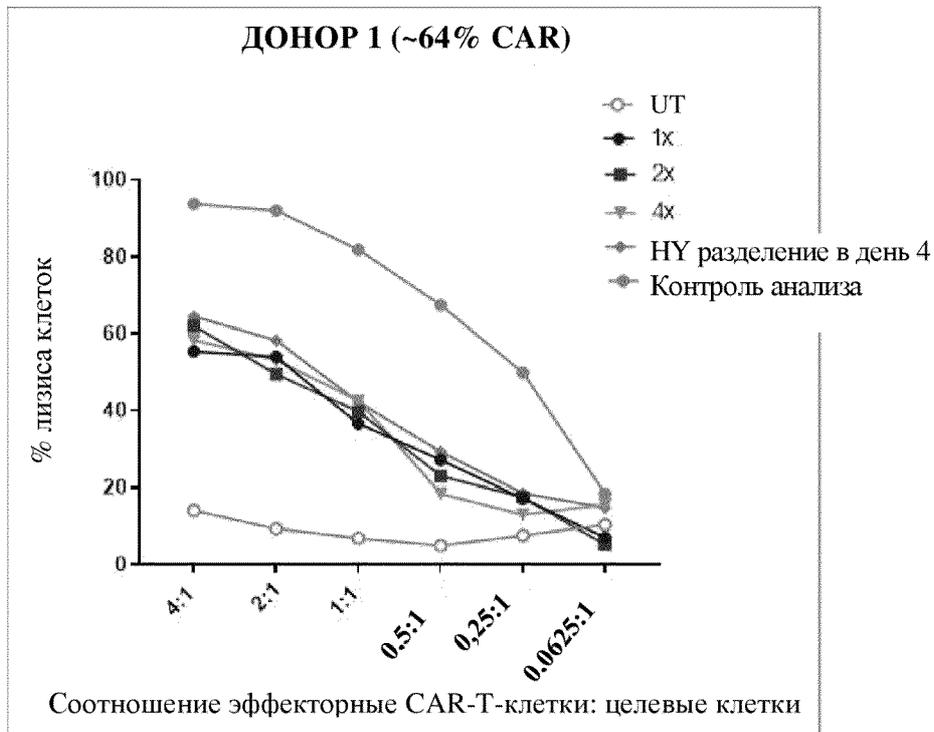
Фиг. 21В

47/52

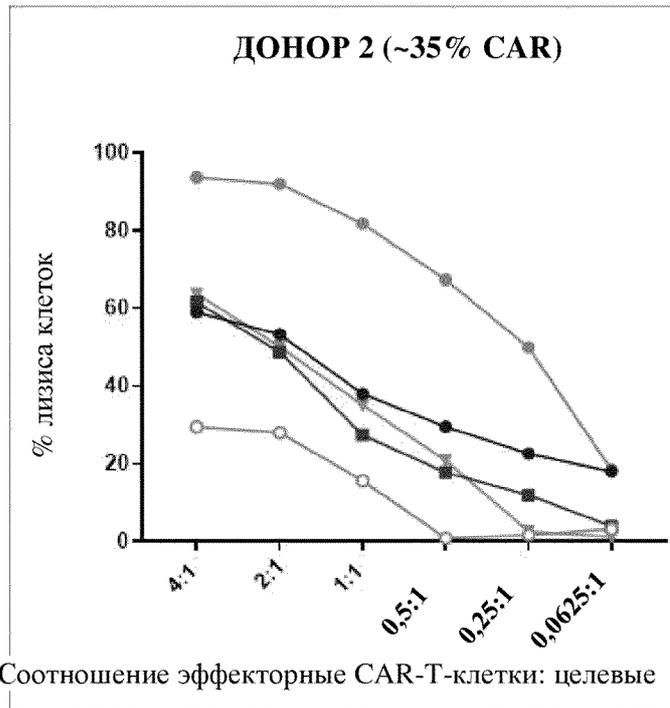
Продукция IL2 в среду для культивирования



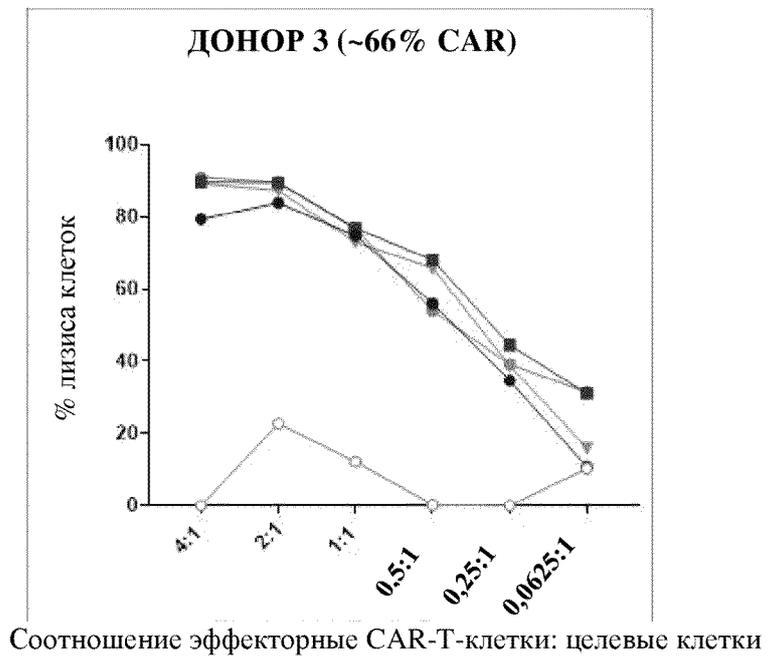
Фиг. 21С



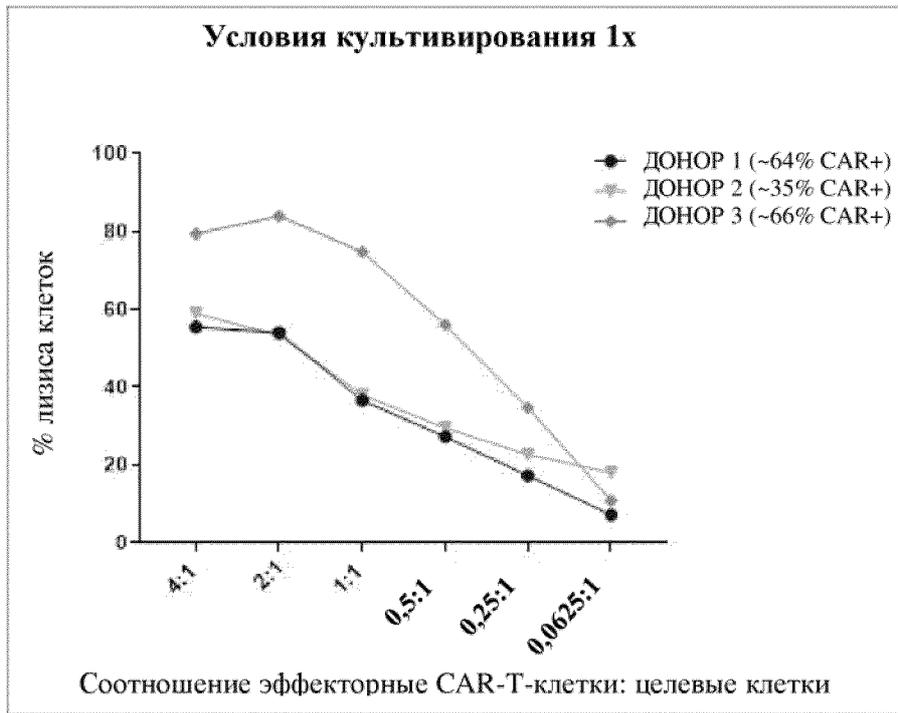
Фиг. 22А



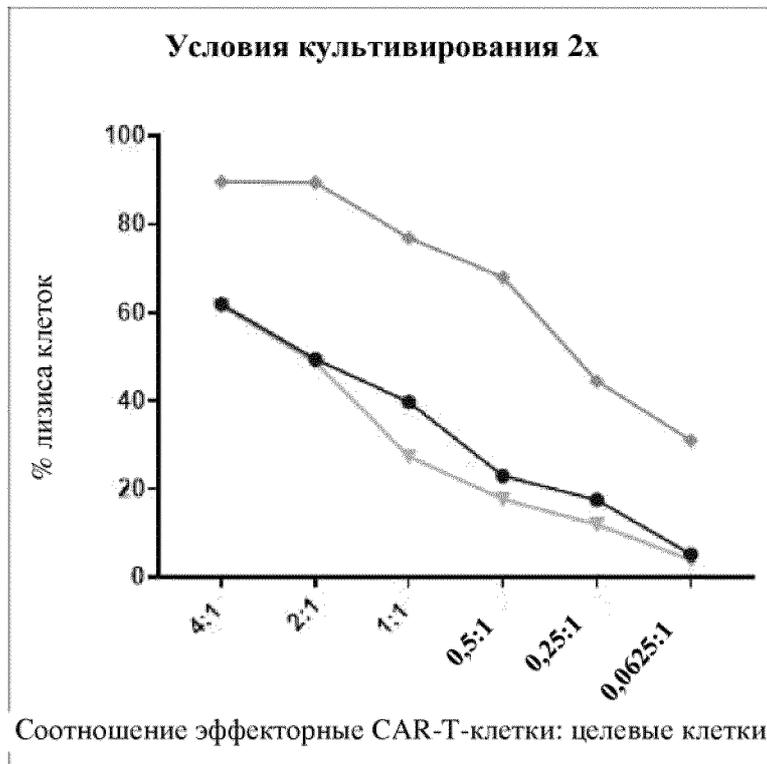
Фиг. 22В



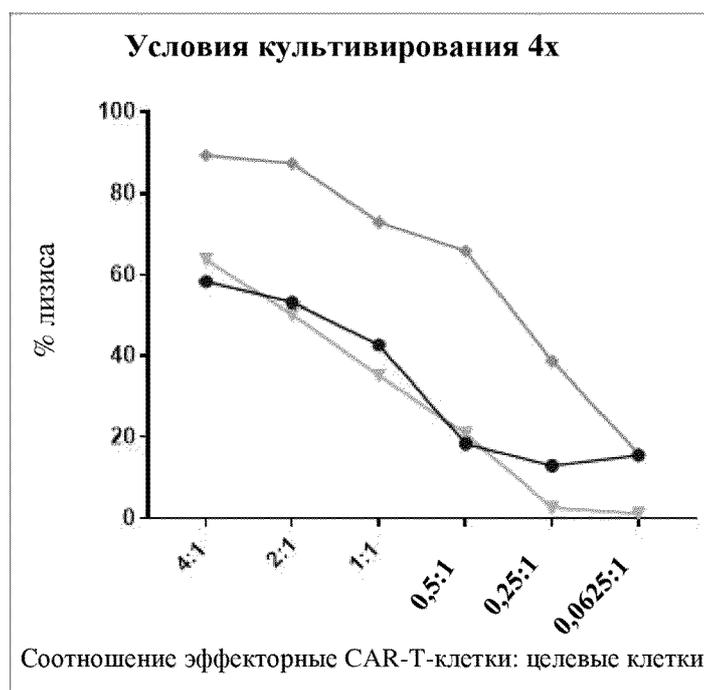
Фиг. 22С



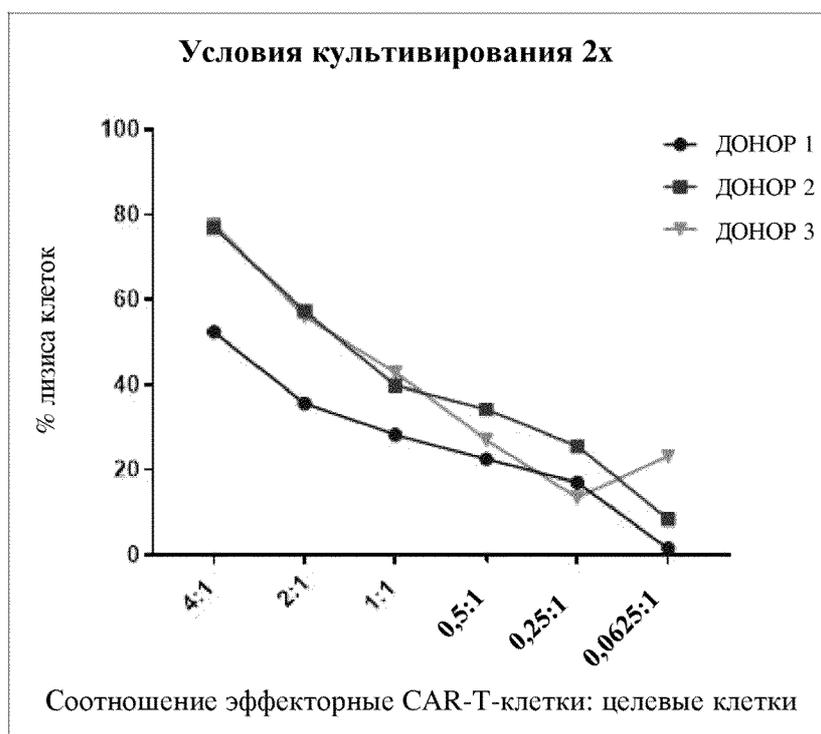
Фиг. 23А



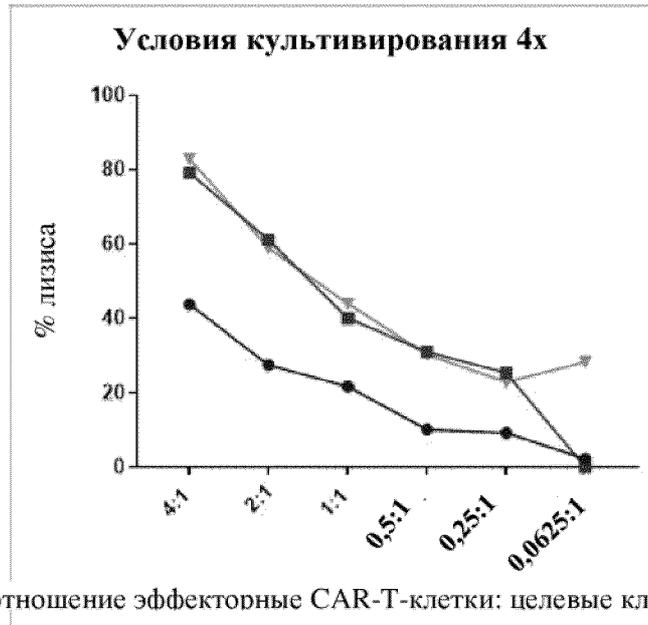
Фиг. 23В



Фиг. 23С

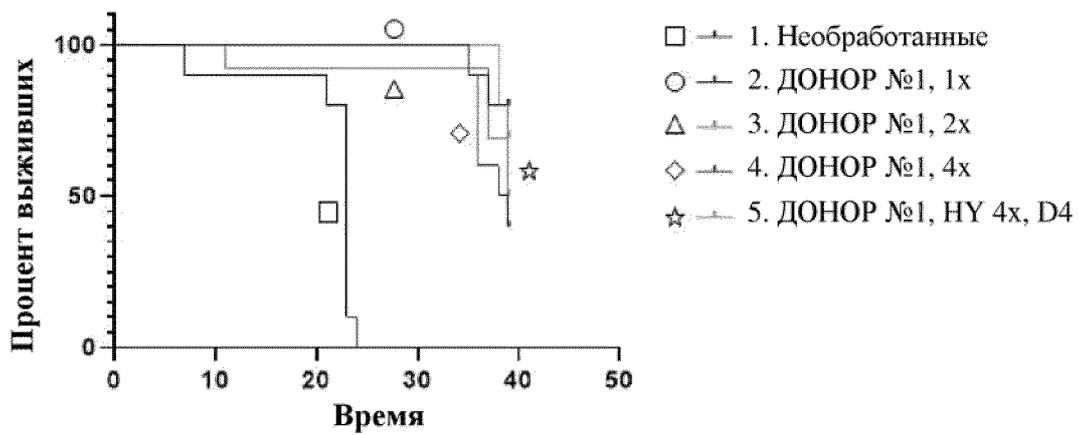


Фиг. 24А



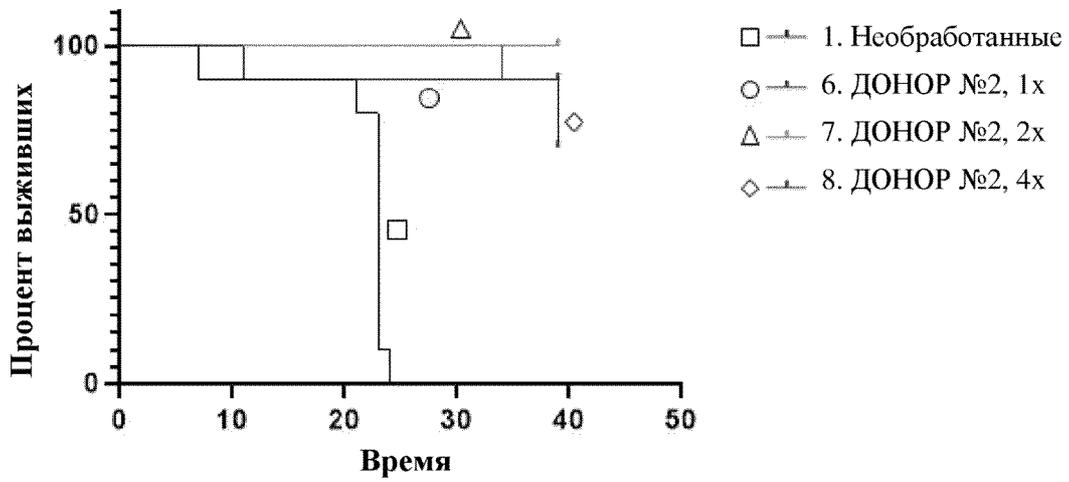
Фиг. 24В

**Выживание из выживания 4767: донор №1**



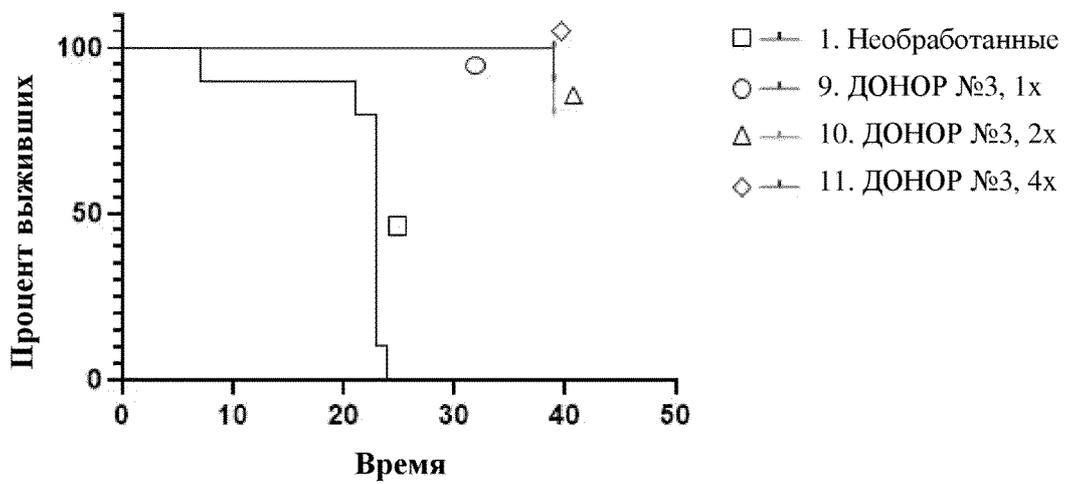
Фиг. 25А

## Выживание из выживания 4767: донор №2



Фиг. 25В

## Выживание из выживания 4767: донор №3



Фиг. 25С