

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291458** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.26

(22) Дата подачи заявки
2020.11.13

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

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ CAR-T-КЛЕТОК

(31) 62/934,999

(32) 2019.11.13

(33) US

(86) PCT/IB2020/060722

(87) WO 2021/095012 2021.05.20

(71) Заявитель:
КРИСПР ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Карсон Джули, Калаицидис
Деметриос, Тань Сююань, Юй Хой
(US)

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

(57) Аспекты 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 средств терапии на основе CAR-T-клеток.



202291458

A1

A1

202291458

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574147EA/55

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ CAR-T-КЛЕТОК

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США №62/934999, поданной 13 ноября 2019 года, которая включена в данный документ 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-T-клетки получают путем генной инженерии либо из иммунных клеток пациента (аутологичных), либо из иммунных клеток неродственных доноров-людей (аллогенных). Получение высококачественных CAR-T-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-T-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 (например, улучшения стабильности и эффективности тройного редактирования генома), описанных в данном документе, что обеспечивает получение стабильного запаса клинически применимых видов терапии на основе CAR-T-клеток.

Соответственно, один аспект настоящего изобретения предусматривает способ получения генетически сконструированных Т-клеток, причем способ включает (i) получение первой популяции Т-клеток; (ii) введение в первую популяцию Т-клеток первого рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса, содержащего первый фермент Cas9 и первую направляющую РНК (gRNA), нацеливающуюся на ген *CD70*, с получением второй популяции Т-клеток, где вторая популяция Т-клеток содержит Т-клетки с нарушенным геном *CD70*; (iii) введение во вторую популяцию Т-клеток второго RNP-комплекса, содержащего второй фермент Cas9 и вторую gRNA, нацеливающуюся на ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (*TRAC*), и третьего RNP-комплекса, содержащего третий фермент Cas9 и третью gRNA, нацеливающуюся на ген бета-2-микроглобулина (*β2M*), с получением третьей популяции Т-клеток, где третья популяция Т-клеток содержит активированные Т-клетки с нарушенным геном *CD70*, нарушенным геном *TRAC* и нарушенным геном *β2M*; (iv) инкубацию 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 гену *TRAC*, и где четвертая популяция Т-клеток содержит активированные Т-клетки, экспрессирующие CAR и имеющие нарушенный ген *CD70*, нарушенный ген *TRAC* и нарушенный ген *β2M*; (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 *CD70*, нарушенный ген *TRAC* и нарушенный ген *β2M*; 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 получают с помощью способа, предусматривающего (a) получение клеток крови от донора-человека и (b) обогащение $CD4^+$ Т-клеток и/или $CD8^+$ Т-клеток из клеток крови. В некоторых вариантах осуществления стадию (b) проводят с использованием магнитных гранул, конъюгированных с антителами к $CD4$ и/или к $CD8$. В некоторых вариантах осуществления 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. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают (c) криоконсервацию обогащенных $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток, полученных на стадии (b).

В некоторых вариантах осуществления стадию (ii) осуществляют посредством электропорации. В некоторых вариантах осуществления концентрация первого фермента Cas9 составляет приблизительно 0,15 мг/мл, и концентрация первой gRNA, нацеливающейся на ген *CD70*, составляет приблизительно 0,16 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация клеток на стадии (ii) составляет от приблизительно 100×10^6 клеток/мл до приблизительно 400×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация клеток на стадии (ii) составляет от приблизительно 100×10^6 клеток/мл до приблизительно 350×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация клеток на стадии (ii) составляет приблизительно 300×10^6 клеток/мл.

В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают после стадии (ii) и перед стадией (iii) стадию инкубации второй популяции Т-клеток в присутствии средства, активирующего Т-клетки, в сосуде для культивирования клеток с получением активированной популяции Т-клеток, где активированная популяция Т-клеток содержит активированные Т-клетки с нарушенным геном *CD70*. Средство, активирующее Т-клетки, может предусматривать агонист $CD3$ и агонист $CD28$, и где агонист $CD3$ и агонист $CD28$ присоединены к частице наноматрицы. Инкубацию второй популяции Т-клеток в присутствии средства, активирующего Т-клетки, в сосуде для культивирования клеток можно проводить при плотности высевания клеток, составляющей приблизительно

$2 \times 10^6/\text{см}^2$, и концентрации клеток, составляющей приблизительно 2×10^6 клеток/мл, в течение приблизительно 72 часов. В некоторых вариантах осуществления отношение средства, активирующего Т-клетки, к среде в смеси составляет приблизительно 1:12,5 (об./об.). В еще других вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, могут дополнительно включать разбавление средства, активирующего Т-клетки, в активированной популяции Т-клеток после инкубации второй популяции Т-клеток в присутствии средства, активирующего Т-клетки, для снижения степени активации и 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 второй RNP-комплекс и третий RNP-комплекс вводят в активированные Т-клетки в одном событии электропорации. В некоторых вариантах осуществления количество второго фермента Cas9 во втором RNP-комплексе такое же, как количество третьего фермента Cas9 в третьем RNP-комплексе. В некоторых вариантах осуществления концентрация второго фермента Cas9 составляет приблизительно 0,3 мг/мл, концентрация третьего фермента Cas9 составляет приблизительно 0,3 мг/мл, концентрация второй gRNA, нацеливающейся на ген *TRAC*, составляет приблизительно 0,08 мг/мл, и концентрация третьей gRNA, нацеливающейся на ген *$\beta 2M$* , составляет приблизительно 0,2 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация клеток на стадии (iii) составляет от приблизительно 100×10^6 клеток/мл до приблизительно 400×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация клеток на стадии (iii) составляет приблизительно 300×10^6 клеток/мл. В других вариантах осуществления общее количество клеток в каждом сосуде, используемом на стадии (iii) (например, электропорации), может составлять от приблизительно 5×10^8 до приблизительно $2,5 \times 10^9$ клеток, например приблизительно 7×10^8 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 3×10^9 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 культивирования четвертой популяции Т-клеток в сосуде для культивирования клеток при плотности высевания, составляющей от приблизительно 2×10^5 клеток/см² до приблизительно 5×10^5 клеток/см², в течение от приблизительно 7 дней до приблизительно 12 дней. В некоторых вариантах осуществления четвертую популяцию Т-клеток можно

высеивать в сосуд для культивирования клеток при плотности высеивания, составляющей от приблизительно 150000 клеток/см² до приблизительно 600000 клеток/см². В некоторых вариантах осуществления четвертую популяцию Т-клеток культивируют при плотности высеивания от приблизительно 3×10^5 клеток/см² до приблизительно 5×10^5 клеток/см². 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 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 и/или третий фермент Cas9 представляет собой фермент Cas9 из Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (spCas9). В некоторых вариантах осуществления первый фермент Cas9, второй фермент Cas9 и третий фермент Cas9 являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первый фермент Cas9, второй фермент Cas9 и третий фермент Cas9 содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления первая gRNA, нацеливающаяся на ген *CD70*, содержит спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления первая gRNA, нацеливающаяся на ген *CD70*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления вторая gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC*, содержит спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления вторая gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления третья gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, содержит спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления третья gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления первая gRNA, вторая gRNA, третья gRNA и/или их комбинация 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 CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), трансмембранный домен происходит от CD8a и/или костимулирующий домен происходит от 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления фрагмент scFv связывает CD70. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность

под SEQ ID NO: 46.

Соответственно, один аспект настоящего изобретения предусматривает способ получения генетически сконструированных Т-клеток, причем способ включает (i) получение первой популяции Т-клеток; (ii) введение в первую популяцию Т-клеток первого рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса, содержащего первый фермент Cas9 и первую направляющую РНК (gRNA), нацеливающуюся на ген *CD70*, с получением второй популяции Т-клеток, где вторая популяция Т-клеток содержит Т-клетки с нарушенным геном *CD70*; (iii) инкубирование второй популяции Т-клеток в присутствии средства, активирующего Т-клетки, в сосуде для культивирования клеток с получением третьей популяции Т-клеток, где третья популяция Т-клеток содержит активированные Т-клетки с нарушенным геном *CD70*; (iv) введение в третью популяцию Т-клеток второго RNP-комплекса, содержащего второй фермент Cas9 и вторую gRNA, нацеливающуюся на ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (*TRAC*), и третьего RNP-комплекса, содержащего третий фермент Cas9 и третью gRNA, нацеливающуюся на ген бета-2-микроглобулина (*$\beta 2M$*), с получением четвертой популяции Т-клеток, где четвертая популяция Т-клеток содержит активированные Т-клетки с нарушенным геном *CD70*, нарушенным геном *TRAC* и нарушенным геном *$\beta 2M$* ; (v) инкубацию четвертой популяции Т-клеток с вектором на основе аденоассоциированного вируса (AAV) с получением пятой 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 гену *TRAC*, и где пятая популяция Т-клеток содержит активированные Т-клетки, экспрессирующие CAR и имеющие нарушенный ген *CD70*, нарушенный ген *TRAC* и нарушенный ген *$\beta 2M$* ; (vi) размножение пятой популяции Т-клеток, за счет чего получают популяцию размноженных Т-клеток; (vii) 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 *CD70*, нарушенный ген *TRAC* и нарушенный ген *$\beta 2M$* ; и (viii) сбор популяции генетически сконструированных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления популяция генетически сконструированных Т-клеток, полученная описанным в данном документе способом.

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

На **фиг. 1** представлен график, на котором показано размножение Т-клеток после редактирования Т-клеток, полученных в мелкомасштабном производственном процессе. RNP-комплексы указаны в скобках. 2d: Т-клетки, активированные в течение 2 дней (48

часов); 3d: Т-клетки, активированные в течение 3 дней (72 часа); 1х ЕР: одиночная электропорация; 2х ЕР: двухстадийная электропорация.

На **фиг. 2А-2В** представлены графики, на которых показано влияние однократной электропорации или двухстадийной электропорации на скорость транслокации. **Фиг. 2А:** график, на котором показан процент транслокаций из 11 указанных транслокаций. **Фиг. 2В:** график, на котором показан процент транслокаций из 8 указанных транслокаций.

На **фиг. 3А-3В** представлены схемы способов получения СТХ130 Т-клеток, которые экспрессируют CAR к CD70 и имеют генетически нарушенные гены CD70, $\beta 2M$ и TRAC. На **фиг. 3А** представлена схема иллюстративного производственного процесса получения Т-клеток, экспрессирующих CAR к CD70, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления технологии, описанной в данном документе. CAR: химерный антигенный рецептор; EDTA: этилендиаминтетрауксусная кислота; HSA: человеческий сывороточный альбумин; IL: интерлейкин; PBS: фосфатно-солевой буферный раствор; rAAV: рекомбинантный аденоассоциированный вирус; sgRNA: однонаправленная рибонуклеиновая кислота; TCR $\alpha\beta$: альфа-цепь Т-клеточного рецептора и бета-цепь Т-клеточного рецептора; дополненный X-VIVO™ 15: X-VIVO™ 15 с 5% АВ сыворотки крови мужчины, 100 МЕ/мл rhIL-2 и 100 МЕ/мл rhIL-7. На **фиг. 3В** представлена схема иллюстративного производственного процесса получения лекарственного продукта, содержащего Т-клетки, экспрессирующие CAR к CD70, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления технологии, описанной в данном документе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на разработке усовершенствованных способов получения для получения CAR-Т-клеток, в частности, аллогенных CAR-Т-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) повышенной экспрессии % CAR⁺ и уменьшенной утрате клеток после электропорации в результате улучшенных условий активации Т-клеток, представленных в данном документе;

(b) улучшенной согласованности и улучшенной эффективности нарушения гена $\beta 2M$ в Т-клетках в результате улучшенных опосредованных CRISPR-Cas9 условий редактирования генов активированных Т-клеток, представленных в данном документе;

(c) более низким скоростям транслокации в результате улучшенных условий электропорации Т-клеток, представленных в данном документе;

(d) повышенному запасу средства терапии на основе CAR Т-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-

Т-клеток с применением усовершенствованных производственных процессов, описанных в данном документе;

(f) упрощенным условиям трансдукции AAV при сохранении высоких уровней экспрессии CAR в Т-клетках.

Соответственно, в данном документе предусмотрены способы получения генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих конструкцию CAR, такую как конструкция CAR, нацеливающаяся на раковый антиген, например CD70, и характеризующихся нокаутом генов *CD70*, *TRAC* и *$\beta 2M$* . Популяции генетически сконструированных Т-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 Т-клеток

Аспекты настоящего изобретения предусматривают способы получения генетически сконструированных Т-клеток, содержащих нарушенный ген кластера дифференцировки 70 (*CD70*), нарушенный ген бета-2-микроглобулина (*$\beta 2M$*) и нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (*TRAC*) и встроенную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR).

Нарушение гена *CD70* предотвращает взаимное уничтожение клеток при производстве генетически сконструированных Т-клеток. В качестве альтернативы или в дополнение, нарушение гена *CD70* делает возможным улучшение здоровья и функционирования (например, увеличенную пролиферацию, снижение истощения) генетически сконструированных Т-клеток. Нарушение гена *$\beta 2M$* и гена *TRAC* придает генетически сконструированным Т-клеткам отсутствие аллореактивности и делает их подходящими для аллогенной трансплантации. Вставка нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, позволяет генетически сконструированной Т-клетке экспрессировать на своей поверхности CAR, где он нацеливает генетически сконструированную Т-клетку на раковые клетки.

Соответственно, способы получения генетически сконструированных Т-клеток, раскрытые в данном документе, в некоторых вариантах осуществления включают применение редактирования генов с помощью CRISPR-Cas9 для нарушения экспрессии генов *CD70*, *TRAC* и *$\beta 2M$* , а также применение трансдукции аденоассоциированного вируса (AAV) для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR.

В целом, способ получения CAR-Т-клеток, раскрытый в данном документе, может предусматривать: (i) обогащение CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток из подходящего источника иммунных клеток человека, (ii) активацию обогащенных CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток; (iii) генетическое конструирование активированных Т-клеток с получением CAR-Т-клеток с нарушенными генами *CD70*, *TRAC* и *$\beta 2M$* ; и сбор генетически сконструированных Т-клеток для терапевтического применения. При необходимости обогащенные CD4⁺/CD8⁺ Т-клетки можно хранить за счет криоконсервации для применения в дальнейшем. В качестве альтернативы или в дополнение, генетически сконструированные Т-клетки можно

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

(i) Обогащение Т-клеток

В любом из способов получения, раскрытых в данном документе, в качестве исходного материала можно применять клетки крови человека. Например, Т-клетки можно получать из дозы крови, собранной у субъекта с применением методик, известных специалисту в данной области, таких как осаждение, например разделение с помощью FICOLL™. В качестве альтернативы Т-клетки для применения в получении генетически сконструированных Т-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 использовать образцы Лейкопак от подходящего донора-человека. Как известно в данной области, 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 Т-клеток, которые находят применение в способах по настоящему изобретению, особым образом не ограничены. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки из банка Т-клеток можно применять в качестве исходного материала в любом из способов получения, раскрытых в данном документе. Банк Т-клеток может содержать Т-клетки с генетическим редактированием определенных генов (например, генов, вовлеченных в самообновление клеток, апоптоз и/или истощение или репликативное старение Т-клеток) для улучшения персистенции Т-клеток в клеточной культуре. Банк Т-клеток может быть получен из истинных Т-клеток, например нетрансформированных Т-клеток, терминально-дифференцированных Т-клеток, Т-клеток, имеющих стабильный геном, и/или Т-клеток, которые зависят от цитокинов и факторов роста для пролиферации и размножения. В качестве альтернативы такой банк Т-клеток можно получать из клеток-предшественников, таких как гемопоэтические стволовые клетки (например, iPSC), например культуры *in vitro*. В некоторых примерах Т-клетки в банке Т-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 Т-клеток, так что нарушение или снижение экспрессии таких генов приводит к улучшению персистенции в культуре. Примеры отредактированных генов в банке Т-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 быть 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 $CD4^+$, $CD8^+$ или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления $CD4^+$ Т-клетки могут быть получены обогащением из клеток крови человека. В других вариантах осуществления $CD8^+$ Т-клетки могут быть получены обогащением. В конкретных примерах как $CD4^+$, так и $CD8^+$ Т-клетки очищены из клеток крови человека.

$CD4^+$ Т-клетки и/или $CD8^+$ Т-клетки можно выделять из подходящего источника клеток крови, такого как описанные в данном документе, с применением любого способа, известного в уровне 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 $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток можно осуществлять с применением антител к $CD4$ и $CD8$, конъюгированных с магнитными гранулами. Популяцию клеток, содержащую $CD4^+$ и $CD8^+$ 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 $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки, связавшиеся с гранулами, можно собирать с применением стандартных способов.

Полученные обогащением Т-клетки (например, $CD4^+$ Т-клетки и $CD8^+$ 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, $CD4^+$ и/или $CD8^+$ 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 обогащенных Т-клеток может характеризоваться чистотой, составляющей по меньшей мере приблизительно 70% целевых

Т-клеток (например, CD4⁺ и/или CD8⁺ 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, 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. 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. В случаях когда в настоящей заявке и формуле изобретения описаны конкретные значения, если не указано иное, тогда термин "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) Опосредованное CRISPR-CAS9 редактирование генов обогащенных Т-клеток

Обогащенные Т-клетки, полученные любым из описанных в данном документе способов, могут быть подвергнуты редактированию гена для нокаута CD70, например посредством технологии редактирования гена с помощью CRISPR-Cas9. Нокаут гена CD70 на первой стадии электропорации с последующим нокаутом генов TRAC и $\beta 2M$ на второй стадии электропорации значительно повышал эффективность редактирования и уменьшал количество транслокаций, производимых во время редактирования генов. См. примеры ниже.

Ген CD70 кодирует представителя суперсемейства факторов некроза опухоли, и его экспрессия ограничена активированными Т-лимфоцитами и В-лимфоцитами и зрелыми дендритными клетками. CD70 участвует в выживаемости опухолевых клеток и регуляторных Т-клеток посредством взаимодействия со своим лигандом CD27. Нарушение

гена *CD70* сводит к минимуму риск взаимного уничтожения клеток во время производства генетически сконструированных Т-клеток и позволяет улучшить здоровье и функционирование полученных генетически сконструированных Т-клеток.

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 транс-активирующей 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 на них. 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: нехомологичное 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.

(a) Cas9

В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазу Cas9 (CRISPR-ассоциированный белок 9) используют в способе с участием CRISPR для создания 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 могут быть использованы Cas9 дикого типа или могут быть использованы модифицированные версии Cas9 (например, развитые версии Cas9 или ортологи или варианты Cas9), представленные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления Cas9 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 нуклеаза 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.

(b) Направляющие РНК (gRNA)

Опосредованное CRISPR-Cas9 редактирование генов, описанное в данном документе, включает применение направляющей РНК или gRNA. Используемый в данном документе термин "gRNA" относится к нуклеиновой кислоте, нацеливающейся на геном, которая способна направлять Cas9 к конкретной целевой последовательности в пределах гена *CD70*, или гена *TRAC*, или гена $\beta 2M$ для редактирования гена в конкретной 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 *CD70*, представлена под SEQ ID

NO: 2. См. также международную заявку № PCT/IB2019/000500, поданную 10 мая 2019 г., опубликованную как WO2019/215500, соответствующие раскрытия которой включены в данный документ посредством ссылки в отношении заявленного объекта и цели, упомянутых в данном документе. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с использованием последовательности гена *CD70*, расположенной на хромосоме 19 (GRCh38: хромосома 19: 6583183-6604103; Ensembl: ENSG00000125726).

В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область *CD70*, и Cas9 создают разрывы в геномной области *CD70*, что приводит к вставкам/делециям в гене *CD70* с нарушением экспрессии mRNA или белка. В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область *CD70*, обуславливают возникновение вставок/делеций в гене *CD70*, содержащем по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в **таблице 11**. В некоторых вариантах осуществления gRNA (SEQ ID NO: 2), нацеливающаяся на геномную область *CD70*, обуславливает возникновение вставок/делеций в гене *CD70*, содержащем по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в **таблице 11**.

Иллюстративная gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC*, представлена под SEQ ID NO: 6. См. также международную заявку № PCT/IB2018/001619, поданную 11 мая 2018 г., которая опубликована как WO2019/097305A2, соответствующие раскрытия которой включены в данный документ посредством ссылки в отношении заявленного объекта и цели, упомянутых в данном документе. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с использованием 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 mRNA 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: 6), нацеливающаяся на геномную область *TRAC*, обуславливает возникновение вставок/делеций в гене *TRAC*, содержащем по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в **таблице 9**.

Иллюстративная gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, представлена под SEQ ID NO: 10. См. также международную заявку № PCT/IB2018/001619, поданную 11 мая 2018 г., которая опубликована как WO2019/097305A2, соответствующие раскрытия которой включены в данный документ посредством ссылки в отношении цели и заявленного объекта, упомянутых в данном документе. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с использованием 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 mRNA 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: 10), нацеливающаяся на геномную область $\beta 2M$, обуславливает возникновение вставок/делеций в гене $\beta 2M$, содержащем по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей, представленных 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 посредством его 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, 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'-концу 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 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 последовательность-мишень CD70 представляет собой 5'-GCTTTGGTCCCATTGGTCGC-3' (SEQ ID NO: 15), то спейсерная последовательность gRNA представляет собой 5'-GCUUUGGUCCCAUUGGUCGC-3' (SEQ ID NO: 5). В другом примере, если целевая последовательность TRAC представляет собой 5'-AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3' (SEQ ID NO: 17), то спейсерная последовательность gRNA представляет собой 5'-AGAGCAACAGUGCUGUGGCC-3' (SEQ ID NO: 9). В еще другом примере, если целевая последовательность β 2M представляет собой 5'-GCTACTCTCTCTTTCTGGCC-3' (SEQ ID NO: 19), то спейсерная последовательность gRNA представляет собой 5'-GCUACUCUCUCUUUCUGGCC-3' (SEQ ID NO: 13). 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'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-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 *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 *CD70*, представлена под SEQ ID NO: 4. Иллюстративная спейсерная последовательность gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC*, представлена под SEQ ID NO: 8. Иллюстративная спейсерная последовательность gRNA, нацеливающаяся на ген *β2M*, представлена под SEQ ID NO: 12.

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 ошибочно спаренных оснований, 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 ошибочно спаренного основания.

Неограничивающие примеры gRNA, которые можно использовать, как предусмотрено в данном документе, представлены в РСТ/IB2018/001619, поданной 11 мая 2018 г., которая опубликована как WO2019/097305A2, и РСТ/IB2019/000500, поданной 10 мая 2019 г., опубликованной как WO2019/215500, соответствующие раскрытия каждой из предыдущих заявок включены в данный документ посредством ссылки в отношении целей и заявляемого объекта, упомянутых в данном документе. Для любой из последовательностей gRNA, предусмотренных в данном документе, подразумевается, что последовательности, для которых явно не указано, что они содержат модификации, охватывают как немодифицированные последовательности, так и последовательности, содержащие любые подходящие модификации.

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 5**.

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 нацеливающуюся 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 РСТ/IB2018/001619, поданной 11 мая 2018 г., которая опубликована как WO 2019/097305A2, и в РСТ/IB2019/000500, поданной 10 мая 2019 г., опубликованной как WO2019/215500, соответствующие раскрытия каждой из предшествующих заявок включены в данный документ посредством ссылки в отношении целей и заявляемого объекта, упомянутых в данном документе.

Редактирование генов CD70, TRAC и $\beta 2M$

В некоторых вариантах осуществления обогащенные Т-клетки, которые раскрыты в данном документе, могут быть подвергнуты редактированию генов в отношении гена *CD70*, гена *TRAC* и гена $\beta 2M$ за счет опосредованного CRISPR-Cas9 редактирования генов в условиях, раскрытых в данном документе, что приводит к более высоким и более стабильным значениям эффективности редактирования генов и более низким значениям скорости транслокации по сравнению с теми, которые обеспечиваются в традиционных условиях.

В конкретных примерах RNP-комплекс, нацеливающийся на ген *CD70*, может содержать приблизительно 0,15 мг/мл Cas9 (например, Cas9 с SEQ ID NO:1) и приблизительно 0,16 мг/мл gRNA, нацеливающейся на ген *CD70* (например, gRNA из CD70-7). 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.

RNP, нацеливающиеся на *CD70*, раскрытые в данном документе, могут быть введены в обогащенные Т-клетки путем смешивания RNP с подходящим количеством

обогащенных Т-клеток, и полученную таким образом смесь подвергают электропорации в подходящих условиях, обеспечивающих доставку RNP в клетки. В некоторых случаях подходящее количество обогащенных Т-клеток может находиться в диапазоне от приблизительно 100×10^6 клеток/мл до приблизительно 400×10^6 клеток/мл. Например, подходящее количество Т-клеток для стадии первой электропорации может составлять от приблизительно 200×10^6 клеток/мл до приблизительно 350×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация обогащенных Т-клеток может составлять приблизительно 100×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация обогащенных Т-клеток может составлять приблизительно 200×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация обогащенных Т-клеток может составлять приблизительно 300×10^6 клеток/мл или приблизительно 350×10^6 клеток/мл.

После электропорации Т-клетки с нарушенным геном *CD70* можно культивировать в свежей среде в течение подходящего периода для восстановления. Оценку эффективности генного редактирования можно осуществлять в соответствии со стандартной практикой. Полученные таким образом генетически отредактированные Т-клетки могут быть подвергнуты стадии активации Т-клеток с повышением эффективности последующего редактирования генов и стадии размножения Т-клеток.

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.

В некоторых вариантах осуществления способы получения, раскрытые в данном документе, могут предусматривать несколько стадий редактирования генов для последовательного редактирования генов-мишеней (*CD70*, *TRAC* и $\beta 2M$) в Т-клетках и введения нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в Т-клетки для экспрессии. Каждая стадия редактирования генов может включать стадию электропорации для введения в Т-клетки направляющих РНК, фермента(-ов) Cas9 и/или нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, для генетического редактирования генов-мишеней (*CD70*, *TRAC* и $\beta 2M$) и для экспрессии CAR в Т-клетках.

В некоторых вариантах осуществления *CD70* редактируют в первом событии электропорации, а $\beta 2M$ /*TRAC* редактируют во втором событии электропорации. См., например, **фиг. 3А**. Однако, не предполагается, что описанные в данном документе способы ограничиваются этой последовательностью стадий. По данным, представленным на **фиг. 2А** и **2В** предполагают, что обе направляющие для *CD70* и $\beta 2M$, доставленные при первой электропорации, благоприятно приводили к снижению значений скорости транслокации. Таким образом, в других вариантах осуществления и *CD70*, и $\beta 2M$ могут быть нацелены

при первом событии электропорации.

В некоторых случаях одна или несколько направляющих РНК, нацеливающих на ген *CD70*, и фермент Cas9 могут быть введены в Т-клетки для разрушения гена *CD70* на стадии первой электропорации, а одна или несколько направляющих РНК, нацеливающих на гены *TRAC* и $\beta 2M$, фермент Cas9 и кодирующая CAR нуклеиновая кислота могут быть введены в Т-клетки на стадии второй электропорации после стадии первой электропорации, чтобы нарушить гены *TRAC* и $\beta 2M$ и ввести кодирующую CAR нуклеиновую кислоту в Т-клетки. В некоторых примерах Т-клетки могут быть подвергнуты активации с применением одного или нескольких средств, активирующих Т-клетки, например средств, описанных в данном документе, после стадии 1^{ой} электропорации и перед стадией 2^{ой} электропорации. Как показано в **примере 3** ниже, эта схема позволяет осуществлять эффективное генетическое редактирование по меньшей мере гена $\beta 2M$ на стадии второй электропорации, сохраняя при этом высокий уровень Т-клеток с нарушенным геном *CD70*, полученным в результате стадии первой электропорации.

На стадии первого редактирования гена первый RNP-комплекс, содержащий первый фермент Cas9 и первую gRNA, нацеливающуюся на ген *CD70*, вводят в обогащенные Т-клетки с получением Т-клеток с нарушенным геном *CD70*. Такие Т-клетки можно активировать перед выполнением стадии второго редактирования генов, чтобы уменьшить степень потери клеток в результате стадии первого редактирования генов.

На стадии второго редактирования генов второй RNP-комплекс, содержащий второй фермент Cas9 и вторую gRNA, нацеливающуюся на ген *TRAC*, и третий RNP-комплекс, содержащий третий фермент Cas9 и третью gRNA, нацеливающуюся на ген $\beta 2M$, вводят в Т-клетки с получением Т-клеток с нарушенными генами *CD70*, *TRAC*, $\beta 2M$. Фермент Cas9 и gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC* и ген $\beta 2M$, могут образовывать один или несколько рибонуклеопротеиновых (RNP) комплексов, которые могут быть доставлены в активированные Т-клетки с нарушенным геном *CD70*, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления второй RNP-комплекс и третий RNP-комплекс, введенные в Т-клетки с нарушенным геном *CD70*, который может быть необязательно активирован, могут содержать одинаковое количество фермента Cas9. Например, как второй RNP-комплекс, так и третий RNP-комплекс могут содержать приблизительно 0,1-0,3 мг/мл (например, приблизительно 0,1-0,2 мг/мл) фермента Cas9 (например, фермента Cas9 с SEQ ID NO:1). В некоторых примерах каждый из второго RNP-комплекса и третьего RNP-комплекса может содержать приблизительно 0,15 мг/мл фермента Cas9, который может представлять собой фермент Cas9 с SEQ ID NO:1.

В других вариантах осуществления второй RNP-комплекс и третий RNP-комплекс могут содержать разные количества фермента Cas9. В некоторых примерах второй RNP-комплекс, нацеливающийся на ген *TRAC*, может содержать большее количество фермента Cas9 по сравнению с третьим RNP-комплексом, нацеливающимся на ген $\beta 2M$. В качестве альтернативы, второй RNP-комплекс, нацеливающийся на ген $\beta 2M$, может содержать большее количество фермента Cas9 по сравнению с третьим RNP-комплексом,

нацеливающимся на ген *TRAC*.

Второй RNP-комплекс и третий RNP-комплекс могут содержать одинаковое количество gRNA (одна нацеливающаяся на *TRAC*, а другая нацеливающаяся на *β2M*). В качестве альтернативы, второй RNP-комплекс и третий RNP-комплекс 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 *β2M*, 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 *β2M*, 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 с 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 *β2M*, может содержать приблизительно 0,15 мг/мл Cas9 (например, Cas9 с SEQ ID NO:1) и приблизительно 0,2 мг/мл gRNA, нацеливающейся на ген *β2M* (например, gRNA из β2M-1).

В некоторых вариантах осуществления второй RNP-комплекс и третий RNP-комплекс могут быть введены в активированную Т-клетку посредством электропорации последовательно, т. е. посредством двух событий электропорации. В качестве альтернативы, второй RNP-комплекс и третий RNP-комплекс могут быть введены в активированные Т-клетки одновременно, т. е. посредством одного события электропорации. В этом случае второй RNP-комплекс и третий RNP-комплекс могут быть объединены с образованием смеси до события 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 100×10^6 клеток/мл до приблизительно 300×10^6 клеток/мл. Например, подходящее количество Т-клеток для стадии электропорации может находиться в диапазоне от приблизительно 200×10^6 клеток/мл до приблизительно 300×10^6 клеток/мл. В некоторых примерах концентрация активированных Т-клеток может составлять приблизительно 100×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация активированных Т-клеток может составлять приблизительно 200×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация активированных Т-клеток может составлять приблизительно 300×10^6 клеток/мл.

В некоторых вариантах осуществления подходящее количество активированных Т-

клеток может находиться в диапазоне от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 1×10^{10} клеток, например от приблизительно 5×10^8 до приблизительно 8×10^9 клеток, от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 5×10^9 клеток или от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 3×10^9 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 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 6** ниже.

В конкретных примерах второй RNP-комплекс и третий RNP-комплекс, описанные выше, содержащие приблизительно 0,3 мг/мл фермента Cas9 в целом (например, фермента Cas9 с SEQ ID NO:1), приблизительно 0,08 мг/мл gRNA TA-1 и приблизительно 0,2 мг/мл gRNA β 2M-1, можно смешать с активированными Т-клетками в количестве от приблизительно 100×10^6 клеток/мл до приблизительно 400×10^6 клеток/мл (например, приблизительно 300×10^6 клеток/мл). Затем смесь подвергают электропорации для доставки RNP в Т-клетки.

В некоторых примерах первый фермент Cas9, второй фермент Cas9 и третий фермент Cas9 являются одинаковыми, например Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (spCas9) или фермент Cas9, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

После электропорации клетки можно культивировать в свежей среде в течение подходящего периода для восстановления. Эффективность редактирования генов может быть определена в соответствии с обычной практикой. Полученные таким образом генетически отредактированные Т-клетки можно подвергать трансдукции вирусным вектором для доставки нуклеиновой кислоты, выполненной с возможностью экспрессии CAR.

(iii) Активация Т-клеток

Любые Т-клетки, описанные в данном документе, например Т-клетки с геном *CD70*, нарушенным в результате стадии 1^{ой} электропорации, могут быть подвергнуты стадии активации, чтобы обеспечить пролиферацию Т-клеток и размножение Т-клеток. Условия активации Т-клеток, описанные в данном документе, обеспечивают высокую эффективность активации Т-клеток, высокий процент экспрессии CAR⁺ и уменьшают степень потери клеток в результате редактирования гена *CD70*. Кроме того, описанные в данном документе условия активации Т-клеток обеспечивают более высокие значения эффективности редактирования генов и более высокие значения скорости размножения Т-клеток после редактирования по сравнению с традиционными условиями. См. примеры ниже.

В некоторых вариантах осуществления активация Т-клеток может быть достигнута с применением 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, активирующее Т-клетки средство 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 таких ситуациях средства, активирующие Т-клетки, могут быть конъюгированы с одним и тем же элементом-носителем. В качестве альтернативы, каждое средство, активирующее Т-клетки, может быть конъюгировано с другими элементами-носителями. 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 Т-клетки с нарушенным геном *CD70*, как описано в данном документе, могут быть помещены в сосуд для культивирования клеток с подходящей плотностью высевания клеток и подходящей концентрацией клеток и инкубированы в присутствии любого из раскрытых в данном документе средств, активирующих Т-клетки, в течение подходящего периода, чтобы вызвать активацию 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 $1,0 \times 10^6$ до $2,5 \times 10^6$ (например, $2 \times 10^6/\text{см}^2$), а подходящая концентрация клеток может составлять от приблизительно $1,0 \times 10^6$ до $2,5 \times 10^6$ (например, $2 \times 10^6/\text{мл}$). Т-клетки с нарушенным геном *CD70* можно инкубировать со средством, активирующим Т-клетки, в течение приблизительно 60-80 часов, например

приблизительно 66 часов или приблизительно 72 часов.

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, $2 \times 10^6/\text{мл}$). Т-клетки с нарушенным геном *CD70* можно инкубировать со средством, активирующим Т-клетки, в течение приблизительно 66-80 часов, например приблизительно 72 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 получение 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 с нарушенным геном *CD70*, полученные в результате любого из описанных в данном документе способов активации Т-клеток, можно культивировать в течение ночи (например, в течение приблизительно 16 часов), чтобы позволить Т-клеткам восстановиться перед редактированием генов. В некоторых случаях культура активированных Т-клеток с нарушенным геном *CD70* может все еще содержать средство, активирующее Т-клетки. В других случаях культура активированных Т-клеток с нарушенным геном *CD70* может характеризоваться незначительным присутствием или отсутствием средства, активирующего Т-клетки.

(iv) Трансдукция Т-клеток

Генетически отредактированные Т-клетки с нокаутом генов *CD70*, *TRAC* и/или *$\beta 2M$* могут быть подвергнуты трансдукции вирусным вектором, таким как вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), который содержит последовательность

нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), для получения популяции 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 CD3дзета (ζ или z) Т-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 ζ 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 вариабельный фрагмент (scFv) антитела или другой фрагмент антитела), и внутриклеточный домен, содержащий сигнальный домен комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) (например, CD3 ζ), 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: 52) и MALPVTALLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 53). 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 переменный фрагмент (scFv, который может содержать переменную область тяжелой цепи антитела (V_H) и переменную 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 отрезков 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 являться специфичным в отношении антигена-мишени, представляющего интерес, например, патологического антигена, такого как опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой "ассоциированный с опухолью антиген", относящийся к иммуногенной молекуле, такой как белок, которая, как правило, экспрессируется на более высоком уровне в опухолевых клетках, чем в не являющихся 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 к связыванию с CD70. В некоторых примерах конструкции CAR, раскрытые в данном документе, содержат внеклеточный домен scFv, способный к связыванию с CD19. В некоторых примерах конструкции CAR, раскрытые в данном документе, содержат внеклеточный домен scFv, способный связываться с BCMA. Пример CAR к CD70 представлен 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 FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR (SEQ ID NO: 54) или IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY (SEQ ID NO: 55). Можно применять другие трансмембранные домены.

(c) 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 ζ 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 ζ представляет собой цитоплазматический сигнальный домен Т-клеточного рецепторного комплекса. CD3 ζ 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 ζ обеспечивает первичный сигнал активации Т-клеток, но не полностью компетентный сигнал активации, который требует костимулирующей передачи 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 ζ . 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 ζ и костимулирующий домен CD28. В других вариантах осуществления CAR включает сигнальный домен CD3 ζ и костимулирующий домен 4-1BB. В еще других вариантах осуществления CAR включает сигнальный домен CD3 ζ , 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 РСТ/IB2018/001619, поданной 11 мая 2018 г., которая опубликована как WO 2019/097305A2, и в РСТ/IB2019/000500, поданной 10 мая 2019 г., соответствующие раскрытия каждой из предшествующих заявок включены в данный документ посредством ссылки в отношении целей и заявляемого объекта, упомянутых в данном документе.

Например, CAR связывает CD70 (также известный как "CD70 CAR" или "CAR к CD70"). Аминокислотная последовательность иллюстративного CAR, который связывает CD70, представлена под SEQ ID NO: 46 (см. **таблицу 12** в **примере 5** ниже).

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 транскрипции образуют капсиды, которые инкапсулируют геном AAV для доставки в целевые клетки. Поверхностные рецепторы на этих капсидах обеспечивают серотип AAV, который определяет, с какими целевыми органами капсиды будут в первую очередь связываться, и, таким образом, какие клетки будут наиболее эффективно заражаться AAV. В настоящее время известно двенадцать серотипов AAV человека. В некоторых вариантах осуществления AAV 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 эффективно доставляют в клетки-мишени, особенно при рассмотрении выбора подходящего серотипа AAV. Наконец, AAV обладают способностью инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, поскольку геном может сохраняться в клетке-хозяине без интеграции. Эта особенность делает их идеальным кандидатом для генной терапии.

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 "зона безопасности".

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 потере 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 удалена (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 генного 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. Например, один или несколько дидезоксинуклеотидных остатков добавляют к 3'-концу линейной молекулы, и/или самокомплементарные олигонуклеотиды лигируются с одним или обоими концами. См., например, Chang *et al.*, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls *et al.*, (1996) Science 272:886-889. Дополнительные способы защиты экзогенных полинуклеотидов от разрушения включают без ограничения добавление концевой(-ых) аминогруппы(-групп) и применение модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, фосфотиоатные, фосфорамидатные, и остатки О-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 α . 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 описанную в данном документе конструкцию CAR (например, CAR, связывающий CD70), можно инкубировать с подходящим количеством Т-клеток, таких как раскрытые в данном документе генетически отредактированные Т-клетки, в течение подходящего периода, чтобы сделать возможным проникновение вирусного вектора в Т-клетки. Например, процесс трансдукции может предусматривать применение диапазона оптимизированной множественности заражения (MOI), который обеспечивает повышение процентного содержания CAR⁺ Т-клеток. В некоторых случаях MOI 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 MOI 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 MOI 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, связывающий CD70 (например, как описано в **таблице 12 в примере 5** ниже), и MOI такого вектора на основе AAV для применения в процессе трансдукции составляет приблизительно 20000. В других вариантах осуществления вектор на основе AAV кодирует

CAR, связывающий CD19, и MOI такого вектора на основе AAV для применения в процессе трансдукции составляет приблизительно 20000. В других вариантах осуществления вектор на основе AAV кодирует CAR, связывающий BCMA, и MOI 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, характеризующиеся нокаутом генов *CD70*, *TRAC* и $\beta 2M$ и экспрессирующие CAR, могут быть размножены *in vitro*, как описано ниже.

(v) Размножение Т-клеток

Генетически сконструированные Т-клетки, раскрытые в данном документе, можно размножать *in vitro* в подходящих условиях для получения популяции генетически сконструированных Т-клеток в 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/см² до приблизительно 600000 клеток/см², в сосуд для клеток. Например, Т-клетки можно высевать в количестве от приблизительно 300000 клеток/см² до приблизительно 500000 клеток/см² 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/см², по меньшей мере приблизительно 62500 клеток/см² или по меньшей мере приблизительно 83000 клеток/см². 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/см², по меньшей мере приблизительно 250000 клеток/см² или по меньшей мере приблизительно 300000 клеток/см², или по меньшей мере приблизительно 400000 клеток/см², или по меньшей мере приблизительно 500000 клеток/см², или по меньшей мере приблизительно 600000 клеток/см². В некоторых аспектах плотность высевания составляет приблизительно 250000 клеток/см². В других аспектах плотность высевания составляет приблизительно 500000 клеток/см². В других аспектах плотность высевания составляет приблизительно 600000 клеток/см².

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 2×10^5 клеток/см² до приблизительно 7×10^5 клеток/см², 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 2×10^5 клеток/см² до приблизительно 7×10^5 клеток/см², от приблизительно 2×10^5 клеток/см² до приблизительно 5×10^5 клеток/см², от приблизительно 2×10^5 клеток/см² до приблизительно 4×10^5 клеток/см², от 2×10^5 клеток/см² до приблизительно 3×10^5 клеток/см², от 3×10^5 клеток/см² до приблизительно 5×10^5 клеток/см² или от 4×10^5 клеток/см² до приблизительно 5×10^5 клеток/см², 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 3×10^5 клеток/см² до приблизительно 5×10^5 клеток/см², 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 популяции размноженных Т-клеток, раскрытой в данном документе, для

получения популяции аллогенных Т-клеток, предназначенных для применения в клеточной терапии. Используемый в данном документе термин "деплеция $\text{TCR}\alpha\beta^+$ Т-клеток" относится к осуществлению деpleции $\text{TCR}\alpha\beta^+$ Т-клеток из популяции клеток, содержащей их. После деpleции $\text{TCR}\alpha\beta^+$ Т-клеток полученная популяция Т-клеток может характеризоваться очень низким уровнем $\text{TCR}\alpha\beta^+$ 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 $\text{TCR}\alpha\beta^+$ Т-клетки, т. е. присутствие $\text{TCR}\alpha\beta^+$ Т-клеток невозможно определить с помощью стандартного способа (например, в иммунном анализе с применением антитела, связывающегося с $\text{TCR}\alpha\beta^+$ или с помощью проточной цитометрии).

Деpleцию $\text{TCR}\alpha\beta^+$ Т-клеток можно осуществлять с применением средства, которое распознает $\text{TCR}\alpha\beta^+$ Т-клетки, для захвата $\text{TCR}\alpha\beta^+$ Т-клеток, за счет чего их отделяют от клеток, не содержащих $\text{TCR}\alpha\beta^+$, 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 $\text{TCR}\alpha\beta$, и сбора несвязавшихся клеток. Собранные таким образом несвязавшиеся клетки (клетки, не содержащие $\text{TCR}\alpha\beta^+$) вначале можно культивировать для обеспечения восстановления клеток, например, несвязавшиеся клетки можно культивировать на протяжении ночи для обеспечения восстановления клеток.

(vii) Сбор генетически сконструированных Т-клеток

Генетически сконструированные Т-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 Т-клеток может предусматривать сбор клеток, которые были подвергнуты деpleции по $\text{TCR}\alpha\beta^+$. Собранную популяцию генетически сконструированных Т-клеток можно применять в качестве лекарственной субстанции. Используемая в данном документе "лекарственная субстанция" относится к популяции генетически модифицированных Т-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 Т-клеток (лекарственная субстанция). Популяция генетически сконструированных Т-клеток содержит нарушенный ген *CD70*, 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 *CD70*. 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 Т-клеток, полученных с помощью способов, описанных в данном документе, экспрессируют CAR. В других аспектах эти клетки, которые экспрессируют CAR, дополнительно не экспрессируют обнаруживаемый уровень поверхностного *CD70*, и/или определяемый уровень поверхностного TCR, и/или определяемый уровень поверхностного $\beta 2M$.

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 5%, не более приблизительно 2% или не более приблизительно 1% Т-клеток, которые экспрессируют поверхностный *CD70*.

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 α/β + 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 способами, описанными в данном документе, включающая фермент Cas9, gRNA, нацеливающуюся на ген *CD70*, gRNA, нацеливающуюся на ген *TRAC*, gRNA, нацеливающуюся на ген $\beta 2M$, и вектор на основе AAV, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR (например, CAR *CD70*, или CAR *CD19*, или CAR 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 (В-ALL) и/или хронический лимфоцитарный лейкоз (С-CLL)), лимфому (например, В-клеточную неходжкинскую лимфому (В-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), глиобластома 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 популяция генетически сконструированных Т-клеток вводится системно, что относится к введению популяции клеток не непосредственно в целевой участок, ткань или орган, а таким образом, что вместо этого они достигают кровеносной системы субъекта, а следовательно предусмотрены метаболизм и другие подобные процессы. 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 генетически сконструированных Т-клеток в популяции, требуемому для предупреждения или облегчения по меньшей мере одного или нескольких признаков или симптомов медицинского состояния (например, рака), и относится к количеству генетически сконструированных Т-клеток в популяции, 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 с применением стандартных экспериментов.

Эффективное количество популяции генетически сконструированных Т-клеток может составлять по меньшей мере 10^2 клеток, по меньшей мере 5×10^2 клеток, по меньшей мере 10^3 клеток, по меньшей мере 5×10^3 клеток, по меньшей мере 10^4 клеток, по меньшей мере 5×10^4 клеток, по меньшей мере 10^5 клеток, по меньшей мере 2×10^5 клеток, по меньшей мере 3×10^5 клеток, по меньшей мере 4×10^5 клеток, по меньшей мере 5×10^5 клеток, по меньшей мере 6×10^5 клеток, по меньшей мере 7×10^5 клеток, по меньшей мере 8×10^5 клеток, по меньшей мере 9×10^5 клеток, по меньшей мере 1×10^6 клеток, по меньшей мере 2×10^6 клеток, по меньшей мере 3×10^6 клеток, по меньшей мере 4×10^6 клеток, по меньшей мере 5×10^6 клеток, по меньшей мере 6×10^6 клеток, по меньшей мере 7×10^6 клеток, по меньшей мере 8×10^6 клеток, по меньшей мере 9×10^6 клеток или величину, кратную этим значениям.

Эффективность лечения с применением популяции генетически сконструированных Т-клеток, полученной, как описано в данном документе, может быть определена специалистом в данной области. 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 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. 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 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 представлены 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⁺ и CD8⁺ Т-клеток из Лейкопаков.

СПОСОБЫ

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 О);
- антитело к Т-лимфотропному вирусу человека (HTLV-I/II);
- тестирование на нуклеиновые кислоты HIV-1/HCV/HBV;
- тестирование на нуклеиновую кислоту WNV;
- антитело к *Trypanosoma cruzi* (избирательное тестирование на болезнь Шагаса, один тест на протяжении жизни для каждого донора);
- HIV/HBV/HCV;
- CMV;
- IDS.

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.

Парт ия	Поставщик	ID донора- источни ка	Возраст	Вес донора (фунты)	ВМІ	Этническая принадлежн ость	ABO/Rh	Объем проду кта (мл)	WBC ($\times 10^9$)	Лимфо циты, %
1	HemaCare	D327083	26	144	19,0	Испаноязычн ый/латиноам ериканец	О-ПОЛ	279	9,77	79
2	HemaCare	141402	29	160	22,9	Европеоид	А-ПОЛ	302	13,59	75,9
3	HemaCare	141121	26	154	24,8	Испаноязычн ый	О-ПОЛ	250	8,75	74,7
4	HemaCare	136723	20	130	20,9	Европеоид	А-ПОЛ	305	12,81	70,1
5	HemaCare	D64140	28	272	42,6	Испаноязычн ый/латиноам ериканец	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	HemaCare	141722	20	135	19,9	Испаноязычн ый	О-ПОЛ	308	13,24	78,5
8	HemaCare	D327737	36	200	26,4	Афроамерик анец	В-ПОЛ	310	14,57	81,3
9	HemaCare	D326737	31	225	29,7	Афроамерик анец	АВ- ПОЛ	314	10,99	77,9

Гематологический анализ Лейкопак с помощью Sysmex

Образцы из поступающих Лейкопаксов 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 Т-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⁺ и CD8⁺ Т-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® 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® II.

Проточная цитометрия

Приблизительно 1×10^6 общих ядерных клеток блокировали с помощью 5 мкл Human TruStain FcX™ 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 Лейкопаксов находился 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	Клетка-мишень			
				Число клеток ($\times 10^9$)	% CD3	Жизнеспособность (%)	Извлечение (%)
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

Среднее (А)		68,48	53,05	2,25	94,75	94,75	31,54
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
Среднее (В)		62,04	12,41	4,70	94,02	95,20	54,69

В совокупности эти результаты демонстрируют, что Т-клетки из Лейкопаков здоровых доноров (HD) обогащались по CD4⁺ и CD8⁺ 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. Редактирование генов и/или уровни экспрессии CAR исследовали на Т-клетках, активированных в различных условиях, для определения оптимизированных условий активации Т-клеток, которые обеспечивают превосходные уровни редактирования генов и/или экспрессии CAR. Вкратце, генетически сконструированные Т-клетки получали в небольшом масштабе, в ходе которого обогащенные Т-клетки размораживали и затем активировали в течение 48 или 72 часов с помощью одной или двух электропораций перед активацией, а процент экспрессии CAR⁺ определяли через 7 дней после трансдукции посредством проточной цитометрии.

Чтобы начать мелкомасштабный производственный процесс, криопробирки 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 в 10-кратный объем полной питательной среды (X-VIVO™ 15, 5% АВ сыворотки человека, 50 нг/мл IL7 и 10 нг/мл IL2) и осаждали посредством центрифугирования при 300g в течение 10 минут при комнатной температуре. Клетки ресуспендировали до концентрации 1×10⁶ клеток/мл и подвергали активации, опосредованной коллоидной полимерной наноматрицей, конъюгированной с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28, который улучшал последующую модификацию, или подвергали электропорации для введения компонентов для зависимого от CRISPR-Cas9 редактирования генов.

Изолированные Т-клетки активировали посредством рекомбинантных CD3 и CD28, ковалентно присоединенных к коллоидной полимерной наноматрице. Коллоидную полимерную наноматрицу, конъюгированную с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28, наносили на клетки в соотношении 1:12,5 или 40 мкл на 1×10⁶ клеток в необработанном флаконе. Клетки поддерживали с помощью коллоидной

полимерной наноматрицы, конъюгированной с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28, в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ в течение 48 часов или 72 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 1×10^6 клеток/мл перед генной модификацией.

Для электропорации общее число клеток и жизнеспособность клеток определяли путем добавления трипанового синего и подсчета на цитометре COUNTESS®. Затем клетки центрифугировали при 300g в течение 10 минут при комнатной температуре. Осадок клеток промывали в 10 мл буфера для электропорации и снова центрифугировали. Во время центрифугирования клеток готовили рибонуклеопротеиновые (RNP) комплексы. RNP-комплексы формируют отдельно, а затем объединяют вместе при выполнении нескольких редактирований. Четыре отдельных RNP-комплекса формировали с использованием gRNA и Cas9 в указанных концентрациях (**таблица 3**). Каждый RNP-комплекс формировали с Cas9, содержащим SEQ ID NO: 1. См. также **пример 5** для информации о последовательностях Cas9 и gRNA.

Таблица 3. RNP-комплексы, содержащие gRNA и Cas9.

RNP- комплекс	Концентрация		Концентрация
	gRNA (мкг/мл)	Последовательность gRNA	
gRNA для CD70+Cas9	160	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCGCguuuuaga	150-170
		gcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaa cuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 2)	
gRNA для TRAC+Cas9	80	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCCguuuuaga	150
		gcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaa cuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 6)	
gRNA для β2M+Cas9	200	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuaga	150
		gcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaa cuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 10)	
gRNA для PD1+Cas9	160	C*U*G*CAGCUUCUCCAACACAguuuuaga	170
		gcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaa cuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 66)	

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™ 15 (без человеческой сыворотки крови AB, IL2 или IL7). Клетки оставляли постоять в инкубаторе в течение 20 минут. Общее число клеток и жизнеспособность клеток определяли путем добавления трипанового синего и подсчета на цитометре COUNTESS®.

Исходя из общего числа клеток после отстаивания, может потребоваться дополнительное разведение клеток с помощью X-VIVO™ 15 (без человеческой сыворотки крови AB, IL2 или IL7) для достижения требуемой концентрации. Общее число клеток необходимо для расчета объема AAV, необходимого для осуществления трансдукции.

$\text{мкл необходимого AAV} = (\text{общее число клеток}) \cdot (\text{необходимое значение MOI (т. е. 20 тыс.)}) / (\text{квг вируса/мл (т. е. } 1,5 \times 10^{13} \text{)})$

AAV и клеточную суспензию смешивали и оставляли инкубироваться в необработанной колбе при 37°C и 5% CO₂ 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 статического сосуда для культивирования добавляли 100 мл полной питательной среды. Генетически модифицированные клетки высевали в концентрации от 5×10^5 клеток/мл до 1×10^6 клеток/мл в 100 мл полной питательной среды. Сосуд для статического культивирования инкубировали в течение трех-четырех дней, чтобы обеспечить размножение клеток. IL2 и IL7 пополняли каждые три-четыре дня до конечной рабочей концентрации 100 Ед/мл или 10 нг/мл IL2 и 50 нг/мл IL7. 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.

(i) Оптимизированные условия для активации Т-клеток увеличивали процент экспрессии CAR⁺

Электропорацию применяли для введения gRNA и Cas9 в Т-клетки для зависимого от CRISPR-Cas9 редактирования четырех генов-мишеней, включая гены *CD70*, *PDI*, *β2M* и *TRAC*. Одну электропорацию проводили для одновременного нацеливания на все четыре гена. При проведении двух электропораций RNP-комплексы, нацеливающиеся на гены *CD70* и *PDI*, вводили в Т-клетки при первой электропорации, а RNP-комплексы, нацеливающиеся на гены *β2M* и *TRAC*, вводили в эти Т-клетки при второй электропорации.

Как показано в **таблице 4**, Т-клетки, активированные в течение 48 часов перед одной или двумя электропорациями, продемонстрировали процент экспрессии CAR⁺ 54,7% и 57,5%, соответственно. Т-клетки, активированные в течение 72 часов, демонстрировали примерно на 10% больший общий % экспрессии CAR⁺, чем Т-клетки, активированные в течение 48 часов, независимо от того, подвергали ли Т-клетки электропорации один или

два раза (таблица 4).

Таблица 4. Процент экспрессии CAR⁺ Т-клеток, активированных в течение 48 часов или 72 часов.

Условие активации (часы)	Процент экспрессии CAR ⁺	
	1х электропорация (CD70, PD1, β2M, TRAC)	2х электропорации (1) CD70, PD1 (2) β2M, TRAC
48	54,7%	57,5%
72	63,0%	68,4%

Из этих результатов видно, что активация Т-клеток в течение 72 часов увеличивала процент экспрессии CAR⁺ по сравнению с экспрессией, обеспечиваемой 48 часами активации Т-клеток. Аналогичные результаты наблюдали, когда RNP-комплекс, нацеливающийся на PD1, не был включен в электропорацию.

(ii) Оптимизированные условия для активации Т-клеток снижали степень потери клеток при электропорации

Первую стадию электропорации выполняли на Т-клетках для введения компонентов для зависимого от CRISPR-Cas9 редактирования гена *CD70* и гена *PD1*. Число клеток определяли до и после активации Т-клеток в течение 48 часов или 72 часов.

Как показано в **таблице 5**, когда Т-клетки активировали в течение 48 часов, число клеток, полученное до второй электропорации, было меньше, чем число клеток, первоначально высеванных для активации. Напротив, когда Т-клетки активировали в течение 72 часов, число клеток, полученное до второй электропорации, было больше, чем число клеток, первоначально высеванных для активации (**таблица 5**).

Таблица 5. Число клеток до и после активации Т-клеток в течение 48 часов или 72 часов.

	Продолжительность активации Т-клеток	
	48 часов	72 часа
Число клеток в начале активации	16.8×10 ⁶	16.8×10 ⁶
Число клеток в конце активации	10.7×10 ⁶	36×10 ⁶

Из этих результатов видно, что активация Т-клеток в течение 72 часов ослабляла степень потери клеток после первой электропорации, которую наблюдали, когда Т-клетки были активированы только в течение 48 часов. Аналогичные результаты наблюдали, когда RNP-комплекс, нацеливающийся на PD1, не был включен в электропорацию.

ПРИМЕР 3. Идентификация оптимизированных условий для нокаута β2M.

В этом примере сообщается об идентификации оптимизированных условий для нокаута β2M с использованием зависимого от CRISPR-Cas9 редактирования генов. Нокаут

$\beta 2M$ можно осуществить либо при первой электропорации, либо при второй электропорации. Нокаут TCR обычно осуществляют при второй электропорации или перед трансдукцией, чтобы обеспечить опосредованную HDR вставку CAR к CD70. Нокаут CD70 обычно осуществляют при первоначальной электропорации для предотвращения возможного взаимного уничтожения клеток перед введением CAR к CD70.

Вкратце, генетически сконструированные Т-клетки получали в мелкомасштабном процессе, в котором формировали RNP-комплексы, нацеливающиеся на $\beta 2M$, и вводили в Т-клетки с помощью однократной электропорации или двухстадийного процесса электропорации. Подробности см. в **примере 2** выше.

Для нокаута $\beta 2M$ при первой электропорации RNP-комплексы, нацеливающиеся на гены *CD70* и *$\beta 2M$* , вводили в Т-клетки при первой электропорации, а RNP-комплексы, нацеливающиеся на гены *PD1* и *TRAC*, вводили в Т-клетки при второй электропорации. Для нокаута $\beta 2M$ при второй электропорации RNP-комплексы, нацеливающиеся на гены *CD70* и *PD1*, вводили в Т-клетки при первой электропорации, а RNP-комплексы, нацеливающиеся на гены $\beta 2M$ и *TRAC*, вводили в Т-клетки при второй электропорации. Т-клетки также подвергали электропорации в одном событии электропорации с RNP-комплексами, нацеливающимися на гены *CD70*, *PD1*, *$\beta 2M$* и *TRAC*.

Как показано в **таблице 6**, когда при первой электропорации включали RNP-комплекс, нацеливающийся на $\beta 2M$, остаточная экспрессия $\beta 2M^+$ составляла приблизительно 60% через 7 дней после трансдукции, независимо от того, активировались ли Т-клетки в течение 48 часов или 72 часов. Остаточная экспрессия $\beta 2M^+$ составляла приблизительно 20%, когда RNP-комплекс, нацеливающийся на $\beta 2M$, включали при одной электропорации или при второй электропорации (**таблица 6**). Остаточную экспрессию *CD70*⁺ не обнаруживали через 7 дней после трансдукции (**таблица 7**). Остаточные клетки, экспрессирующие *CD70*⁺, могли элиминировать путем нокаута RNP-комплексом, нацеливающимся на *CD70*, или элиминировать с помощью клеток *CAR*⁺ *CD70*. Аналогичные рост Т-клеток и жизнеспособность Т-клеток наблюдали для каждого из испытанных условий нокаута $\beta 2M$ (**фиг. 1**).

Таблица 6. Влияние условий нокаута $\beta 2M$ на экспрессию $\beta 2M$.

Условие активации (часы)	Экспрессия $\beta 2M^+$		
	1х электропорация (CD70, PD1, $\beta 2M$, TRAC)	2х электропорации (1) CD70, PD1 (2) $\beta 2M$, TRAC	2х электропорации (1) CD70, $\beta 2M$ (2) PD1, TRAC
48	26,0%	19,5%	64,2%
72	27,8%	21,6%	64,7%

Таблица 7. Влияние условий нокаута $\beta 2M$ на экспрессию CD70.

Условие активации (часы)	Экспрессия CD70 ⁺		
	1х электропорация (CD70, PD1, $\beta 2M$, TRAC)	2х электропорации (1) CD70, PD1 (2) $\beta 2M$, TRAC	2х электропорации (1) CD70, $\beta 2M$ (2) PD1, TRAC
48	0,29%	0,41%	0,30%
72	0,19%	0,43%	0,26%

Из этих результатов видно, что введение RNP-комплекса, нацеливающегося на $\beta 2M$, на второй стадии электропорации обеспечивает превосходное нокаутирование $\beta 2M$ при сохранении эффективного нокаута CD70 или роста и жизнеспособности клеток. Аналогичные результаты наблюдали, когда RNP-комплекс, нацеливающийся на PD1, не был включен в электропорацию.

ПРИМЕР 4. Идентификация оптимизированных условий для электропорации Т-клеток.

В этом примере сообщается об идентификации оптимизированных условий для введения множественных RNP-комплексов для зависимого от CRISPR-Cas9 редактирования генов в Т-клетки путем электропорации.

Вкратце, генетически сконструированные Т-клетки получали в мелкомасштабном процессе, в котором RNP-комплексы вводили в Т-клетки с помощью однократной электропорации или двухстадийного процесса электропорации. Подробности см. в **примере 2** выше. Скорость транслокации определяли с помощью ddPCR.

Т-клетки, генетически сконструированные с помощью одной электропорации, демонстрировали значительно более высокие скорости транслокации, чем клетки, подвергнутые электропорации в две стадии, за исключением случаев, когда RNP-комплексы, нацеливающиеся на PD1 и CD70, объединяли вместе в первой электропорации (**фиг. 2А**). Скорость транслокации составляла менее 2%, когда gRNA, нацеливающуюся на CD70, доставляли при первой электропорации (с помощью RNP-комплекса). См. **фиг. 2А и 2В**. Цитогенетический анализ Т-клеток, электропорированных с четырьмя RNP-комплексами, показал, что транслокации, вероятно, произошли в хромосомах, которые содержат PD1 (хромосома 2), $\beta 2M$ (хромосома 15), TCR (хромосома 14) и CD70 (хромосома 19) (данные не показаны).

В совокупности эти результаты продемонстрировали, что более низкие скорости транслокации могут быть достигнуты путем введения RNP-комплексов путем электропорации, проводимой в две стадии. Аналогичные результаты наблюдали, когда RNP-комплекс, нацеливающийся на PD1, не был включен в электропорацию.

ПРИМЕР 5. Разработка производственного процесса для получения генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих CAR к CD70 и имеющих генетически нарушенные гены CD70, TRAC и $\beta 2M$ (CTX130).

Обзор

CTX130 представляет собой средство иммунотерапии на основе Т-клеток, направленных на CD70, 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 нацеленное нарушение константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC), $\beta 2M$ и CD70. 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 $\beta 2M$ приводит к отсутствию экспрессии белков главного комплекса гистосовместимости I типа (MHC I) и предназначено для улучшения персистенции за счет снижения вероятности отторжения хозяином. Нарушение в CD70 приводит в результате к потере экспрессии CD70, что предупреждает возможное межклеточное взаимное уничтожение до встраивания CAR к CD70. Добавление CAR к CD70 обеспечивает направление модифицированных Т-клеток к опухолевым CD70-экспрессирующим клеткам.

CAR к CD70 состоит из одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) антитела к CD70, специфичного в отношении CD70, за которым следуют шарнирный и трансмембранный домен CD8, который слит с внутриклеточным косигнальным доменом 4-1BB и сигнальным доменом CD3 ζ .

Иллюстративный производственный процесс для получения CTX130 показан на **фиг. 3А**.

Постепенное изменение производственного процесса

На основе условий, определяемых оптимизированными процессами, описанными в **примерах 1-4**, производственный процесс CTX130 осуществляли в трех производственных масштабах, включая исследовательский масштаб, масштаб разработки и клинический масштаб. Процесс исследовательского масштаба выполняли в малом масштабе, и масштаб процесса исследовательского масштаба увеличивали и переводили в процесс масштаба разработки и в процесс клинического масштаба. Начальные кампании (4 партии) проводили с применением исходных материалов лабораторного качества для лекарственного вещества для возможности реализации и корректировки рабочих параметров. Впоследствии использование исходных материалов из источников GMP (sgRNAs, Cas9 и rAAV-145b) и количественные критерии приемлемости реализовали для процесса клинического масштаба, который функционально идентичен процессу масштаба разработки.

Выбор исходных материалов

Исходные материалы для получения CTX130 включают:

- Лейкопаки, собранные от здоровых доноров,
- бактериальную нуклеазу Cas9,
- три одиночные направляющие РНК (sgRNA), sgRNA для CD70-7, нацеливающаяся на локус CD70, TA-1, нацеливающаяся на локус TRAC, и $\beta 2M$ -1, нацеливающаяся на локус $\beta 2M$, и

- вектор на основе рекомбинантного AAV-6 (rAAV-145b), кодирующий ген CAR к CD70.

Информация о структуре компонентов, применяемых при создании генетических модификаций CTX110, а также отредактированных локусов генов TRAC и $\beta 2M$, представлен ниже:

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

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDS
GETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHE
RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRILIYLA AHMIKFRGHFLIEGDL
NPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKK
NGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADFLAA
KNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQ
SKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI
HLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP
WNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEG
MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLG
TYHDLKKIHKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLK
RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQ
VSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEEMARENQTTQ
KGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDI
NRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLN
AKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEND
KLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLES
EFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETN
GETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKD
WDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEA
KGYKEVKKDLIIKLPKYSLENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYE
KLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIR
EQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQL
GGD

Таблица 8. Последовательности sgRNA и последовательности генов-мишеней

Последовательности sgRNA		SEQ ID NO:
sgRNA для CD70 (CD70-7)	Модифицированная	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCGCguuuuagagcuagaaaaua gcaaguuaaaaaaaggcuaguccguuaucacuugaaaaaguggcaccgag ucggugcU*U*U*U
	Немодифицированная	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGCguuuuagagcuagaaaauagca aguuaaaaaaaggcuaguccguuaucacuugaaaaaguggcaccgagucg gugcUUUU
		2 3

sgRNA для CD70,	Модифицир ованная	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCGC	4
спейсер	Немодифиц ированная	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGC	5
sgRNA для TRAC (TA-1)	Модифицир ованная	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuagaaa gcaaguuaaaaaaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgag ucggugcU*U*U*U	6
	Немодифиц ированная	AGAGCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuagaaaagca aguuaaaaaaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucg gugcUUUU	7
sgRNA для TRAC,	Модифицир ованная	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCC	8
спейсер	Немодифиц ированная	AGAGCAACAGUGCUGUGGCC	9
sgRNA для β2M (β2M-1)	Модифицир ованная	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcuagaaa gcaaguuaaaaaaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgag ucggugcU*U*U*U	10
	Немодифиц ированная	GCUACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcuagaaaagca guuaaaaaaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucgg ugcUUUU	11
sgRNA для β2M,	Модифицир ованная	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCC	12
спейсер	Немодифиц ированная	GCUACUCUCUCUUUCUGGCC	13
Последовательности-мишени (PAM)			
sgRNA для CD70		GCTTTGGTCCCATTGGTCGC (GGG)	14
sgRNA для CD70		GCTTTGGTCCCATTGGTCGC	15
sgRNA для TRAC		AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (TGG)	16
sgRNA для TRAC		AGAGCAACAGTGCTGTGGCC	17
sgRNA для		GCTACTCTCTCTTTCTGGCC (TGG)	18

$\beta 2M,$

sgRNA для

GCTACTCTCTTTCTGGCC

19

 $\beta 2M,$

Иллюстративные формулы sgRNA

Последова

Nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnguuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaauaggcuagucc

20

тельность

sgRNA

guaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcuuuu

Последова

Nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnguuuagagcuagaaauagcaaguuaaaaauaggcuagucc

21

тельность

sgRNA

guuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc

Последова

n₍₁₇₋₃₀₎guuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaa

22

тельность

sgRNA

aaguggcaccgagucggugcu₍₁₋₈₎

* обозначает нуклеотид с 2'-О-метилфосфотиоатной модификацией.

"n" относится к спейсерной последовательности на 5'-конце.

Таблица 9. Отредактированная последовательность гена *TRAC*.

Описание	Последовательность (делеции обозначены с помощью тире (-); вставки обозначены жирным шрифтом)	SEQ ID NO:
Отредактированный ген <i>TRAC</i>	AA-----GAGCAACAAATCTGACT	23
Отредактированный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTGCTGT- GCCTGGAGCAACAAATCTGACT	24
Отредактированный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTG-----CTGGAGCAACAAATCTGACT	25
Отредактированный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGT-----GCCTGGAGCAACAAATCTGACT	26
Отредактированный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTG-----CTGACT	27
Отредактированный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTGCTGT GGGCCTGGAGCAACAAATCT GACT	28
Отредактированный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTGC-- TGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT	29
Отредактированный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTGCTGTGTGCCTGGAGCAACAAATCT GACT	30

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

Описание	Последовательность (делеции обозначены с помощью тире (-); вставки обозначены жирным шрифтом)	SEQ ID NO:
Отредактированный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT- GCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCC CGCT	31
Отредактированный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTC-- GCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCC CGCT	32
Отредактированный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTT----- CTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCG CT	33
Отредактированный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTG G ATAGCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTAC CCTCCCGCT	34
Отредактированный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGC----- GCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	35
Отредактированный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTG TGGCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCT CCCGCT	36

Таблица 11. Отредактированная последовательность гена $CD70$

Описание	Последовательность (делеции обозначены с помощью тире (-); вставки обозначены жирным шрифтом)	SEQ ID NO:
Отредактированный ген $CD70$	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGCG-- CAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	37
Отредактированный ген $CD70$	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGCGA A CCAAT GGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	38
Отредактированный ген $CD70$	CACACCACGAGGCAGATC----- ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	39
Отредактированный ген $CD70$	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGCG- CCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	40
Отредактированный ген $CD70$	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGC- ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	41
Отредактированный ген $CD70$	CACACCACGAGGCAGATCACCA----- AGCCCGCAGGACG	42

Таблица 12. Последовательности компонентов конструкции CAR к CD70.

Описание	Последовательность	SEQ ID NO:
CD70	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCC	43
rAAV	GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGA	
(scFV к	GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGG	43
CD70B c	GTTCTGCGGGCCGCACGCGTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTG	
41BB)	ACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGG	43
	CTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATC	
	AATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAAC	43
	TTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCC	
	AGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACA	43
	GTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTG	
	CCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAA	43
	TAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAGG	
	TTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACT	43
	GAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGT	
	CCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATG	43
	CTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCC	
	ACAGAGCCCCGCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAG	43
	CCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGGAAATGAGATCATGTCTAAC	
	CCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTG	43
	CCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTG	
	TCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAC	43
	AAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTG	
	CTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTGCCCGTCA	43
	GTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGG	
	GGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGG	43
	CGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCG	
	CCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGT	43
	AGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAG	
	AACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCT	43
	CTTTACGGGTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACT	
	GGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAA	43
	GTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCT	

CGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCC
GCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTG
CTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGC
TGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGG
CCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGG
CGGCGACGGGGCCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGA
GGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGG
TAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCG
CCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCG
GTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCG
GCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCG
GGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGG
CCTTTCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGT
ACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTT
GGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGA
TGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGG
CCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTT
TTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGG
TTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGACCACCATG
GCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGTTG
CTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTCCAGTTGGTGCAAAGCGG
GGCGGAGGTGAAAAAACCCGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCCT
GTAAGGCGTCCGGTTATACGTTACGAACTACGGGATGAATT
GGGTTCGCCAAGCGCCGGGGCAGGGACTGAAATGGATGGGG
TGGATAAATACCTACACCGGCGAACCTACATACGCCGACGC
TTTTAAAGGGCGAGTCACTATGACGCGCGATAACCAGCATATC
CACCGCATACATGGAGCTGTCCCGACTCCGGTCAGACGACA
CGGCTGTCTACTATTGTGCTCGGGACTATGGCGATTATGGCA
TGGACTACTGGGGTCAGGGTACGACTGTAAACAGTTAGTAGT
GGTGGAGGCGGCAGTGGCGGGGGGGGAAGCGGAGGAGGGG
GTTCTGGTGACATAGTTATGACCCAATCCCCAGATAGTTTGG
CGGTTTCTCTGGGCGAGAGGGCAACGATTAATTGTCGCGCAT
CAAAGAGCGTTTCAACGAGCGGATATTCTTTTATGCATTGGT
ACCAGCAAAAACCCGGACAACCGCCGAAGCTGCTGATCTAC
TTGGCTTCAAATCTTGAGTCTGGGGTGCCGGACCGATTTTCT

GGTAGTGGAAGCGGAACTGACTTTACGCTCACGATCAGTTCA
CTGCAGGCTGAGGATGTAGCGGTCTATTATTGCCAGCACAGT
AGAGAAGTCCCCTGGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAGTAGA
AATTAAGTGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCACG
CAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGC
TCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGC
ATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCTT
GGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGG
TACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACCTCGTTATTACTTTGTAT
TGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCT
GTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTAC
TCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAG
AAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGC
GCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTA
TAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGC
TTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTAAA
CCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACT
CCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTA
TGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTC
TACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGC
ACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATAAAATCG
CTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGG
AGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAAC
AGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAG
GGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGA
ATGGCCAGGTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAA
ACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAA
AACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAG
TCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGG
TGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAAC
TGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTT
ACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGC
CTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCT
CACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATC
ACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTG

GAGGAATTAAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAG
 CACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAA
 GTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTT
 GAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCT
 CTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATAACCAGCCCTACCAAGG
 GCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAA
 TGAGAAAGGTAACACGTGCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGT
 CCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCT
 CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGT
 CGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCG
 AGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

CD70	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATC	44
LHA-RHA	GAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGA	
(scFV κ	TTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTG	
CD70B c	GTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAA	
41BB)	ACCTCCCATTTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCA	
	CTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTT	
	CCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTT	
	TTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATT	
	AAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGG	
	CCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAA	
	GATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACG	
	AGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGA	
	GACCGTGA CTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCAT	
	CACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGG	
	AAATGAGATCATGTCCTAACCCTGATCCTCTTGTCACAGA	
	TATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTC	
	TAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGA	
	TTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTA	
	TATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTT	
	CAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCC	
	ACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAAC	
	CGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTG	
	ATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAG	
	AACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTC	

GCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGT
GGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGC
GTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTG
ATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGG
CCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAG
GCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTG
GCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCC
ATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGC
AAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGT
ATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCCGTGCG
TCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCG
GCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGC
CTGCTCTGGTGCTTGCCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGC
CCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGA
GCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTC
AAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAG
TCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCTCAGCCGTC
GCTTCATGTGACTCCACGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCAC
CTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCTTTAGGTT
GGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGT
GGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAA
TTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGTTCA
TTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATT
TCAGGTGTCGTGACCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTG
CTCCTCCCCTTGCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAG
GTCCAGTTGGTGCAAAGCGGGGCGGAGGTGAAAAAACCCGG
CGCTTCCGTGAAGGTGTCCTGTAAGGCGTCCGGTTATACGTT
CACGAACTACGGGATGAATTGGGTTCGCCAAGCGCCGGGGC
AGGGACTGAAATGGATGGGGTGGATAAATACCTACACCGGC
GAACCTACATACGCCGACGCTTTTAAAGGGCGAGTCACTATG
ACGCGCGATACCAGCATATCCACCGCATACATGGAGCTGTCC
CGACTCCGGTCAGACGACACGGCTGTCTACTATTGTGCTCGG
GACTATGGCGATTATGGCATGGACTACTGGGGTCAGGGTAC
GACTGTAACAGTTAGTAGTGGTGGAGGCGGCAGTGGCGGGG
GGGGAAGCGGAGGAGGGGGTTCTGGTGACATAGTTATGACC

CAATCCCCAGATAGTTTGGCGGTTTCTCTGGGCGAGAGGGCA
ACGATTAATTGTCGCGCATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGG
ATATTCTTTTATGCATTGGTACCAGCAAAAACCCGGACAACC
GCCGAAGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGTCTGG
GGTGCCGGACCGATTTTCTGGTAGTGGAAGCGGAACTGACTT
TACGCTCACGATCAGTTCAGTGCAGGCTGAGGATGTAGCGGT
CTATTATTGCCAGCACAGTAGAGAAGTCCCCTGGACCTTCGG
TCAAGGCACGAAAGTAGAAATTAAGTGTGCTGCTGCCTTTGT
CCCGGTATTTCTCCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCC
GCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCT
TAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGC
TGTTTCATACGAGGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACAT
TTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTC
ACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACG
GGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTAT
GAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCT
GCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGA
GTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCA
AGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCC
GCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGAC
CCGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGA
AGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGG
CCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGA
AAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAAC
CAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCC
CAGATAATAATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGT
GTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATG
TGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTT
CTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGG
CTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCAGAGCT
CTGGTCAATGATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGG
CCTTATCCATTGCCACCAAAACCCTCTTTTTACTAAGAAACA
GTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAA
AAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCC
CAGCCTCAGTCTCTCCAACCTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTG

CTCAGACTGTTTGCCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTA
 AGCCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGC
 CAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTC
 ACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAAT
 GCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAGTCAGATGAG
 GGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTTCTAGTTGGGGGAGCCC
 ATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAAT
 GTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACA
 AAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGA
 TACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGC
 CTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGG

Нуклеотидная последовательность CAR к CD70 (scFV к CD70B с 41BB)	ATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTG TTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTCCAGTTGGTGCAAAG CGGGGCGGAGGTGAAAAAACCCGGCGCTTCCGTGAAGGTGT CCTGTAAGGCGTCCGGTTATACGTTTACGAACTACGGGATGA ATTGGGTTCGCCAAGCGCCGGGGCAGGGACTGAAATGGATG GGGTGGATAAATACCTACACCGGCGAACCTACATACGCCGA CGCTTTTAAAGGGCGAGTCACTATGACGCGCGATACCAGCAT ATCCACCGCATACATGGAGCTGTCCCGACTCCGGTCAGACGA CACGGCTGTCTACTATTGTGCTCGGGACTATGGCGATTATGG CATGGACTACTGGGGTCAGGGTACGACTGTAACAGTTAGTA GTGGTGGAGGCGGCAGTGGCGGGGGGGGAAGCGGAGGAGG GGGTTCTGGTGACATAGTTATGACCCAATCCCCAGATAGTTT GGCGGTTTCTCTGGGCGAGAGGGCAACGATTAATTGTCGCGC ATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGGATATTCTTTTATGCATTG GTACCAGCAAAAACCCGGACAACCGCCGAAGCTGCTGATCT ACTTGGCTTCAAATCTTGAGTCTGGGGTGCCGGACCGATTTT CTGGTAGTGGAAGCGGAACTGACTTTACGCTCACGATCAGTT CACTGCAGGCTGAGGATGTAGCGGTCTATTATTGCCAGCACA GTAGAGAAGTCCCCTGGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAGTA GAAATTA AAAAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCCA GCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCC GCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAG GCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGG CTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCG	45
--	--	----

GGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTGCTACTCGTTATTACTTTGT
 ATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAACTC
 CTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACT
 ACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGA
 AGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAA
 GCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTG
 TATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGT
 GCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTA
 AACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAA
 CTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGG
 TATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCC
 TCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGAT
 GCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAA

Аминокислотная последовательность CAR к CD70 (scFV к CD70B с 41BB)	MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADA FKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGDIVMTQSPDSLAV SLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASN LESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSREVPWT FGQGTKVEIKSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVIT LYCNHRNRKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPENMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR CAGGTCCAGTTGGTGCAAAGCGGGGCGGAGGTGAAAAAACC CGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCCTGTAAGGCGTCCGGTTATAC GTTCACGAACTACGGGATGAATTGGGTTCGCCAAGCGCCGG GGCAGGGACTGAAATGGATGGGGTGGATAAATACCTACACC GGCGAACCTACATACGCCGACGCTTTTAAAGGGCGAGTCAC TATGACGCGCGATACCAGCATATCCACCGCATACATGGAGCT GTCCCGACTCCGGTCAGACGACACGGCTGTCTACTATTGTGC TCGGGACTATGGCGATTATGGCATGGACTACTGGGGTCAGG GTACGACTGTAACAGTTAGTAGTGGTGGAGGCGGCAGTGGC GGGGGGGGAAGCGGAGGAGGGGGTTCTGGTGACATAGTTAT	46
Нуклеотидная последовательность scFv для		47

	GACCCAATCCCCAGATAGTTTGGCGGTTTCTCTGGGCGAGAG GGCAACGATTAATTGTCGCGCATCAAAGAGCGTTTCAACGA GCGGATATTCTTTTATGCATTGGTACCAGCAAAAACCCGGAC AACCGCCGAAGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGT CTGGGGTGCCGGACCGATTTTCTGGTAGTGGAAGCGGAACT GACTTTACGCTCACGATCAGTTCACTGCAGGCTGAGGATGTA GCGGTCTATTATTGCCAGCACAGTAGAGAAGTCCCCTGGACC TTCGGTCAAGGCACGAAAGTAGAAATTA	
CD70B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAP	
Аминокислотная последовательность scFv (линкер подчеркнут)	GQGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMEL SRLRSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGTTVTVSS <u>GGGGSG</u> <u>GGGSGGGSG</u> DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGY SFMHWYQQKPGQPPKLLIYASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIK	48
VH к CD70	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAP GQGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMEL SRLRSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGTTVTVSS	49
VL к CD70	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQK PGQPPKLLIYASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIK	50
Линкер	GGGGSGGGSGGGGSG	51
Сигнальный пептид	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	52
Сигнальный пептид	MALPVTALLPLALLHAARP	53
Трансmemбран ный домен CD8a	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR	54
Трансmemбран ный CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY	55
Нуклеотидная последовательность 4-1BB	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACC ATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCT GTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAA	56

CTG

Аминокислотная последовательность 4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	57
Нуклеотидная последовательность CD28	TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATG ACTCCTCGCCGGCCTGGGCGACAAGAAAACATTACCAACC CTATGCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCC	58
Аминокислотная последовательность CD28	SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	59
Нуклеотидная последовательность CD3ζ	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCA GCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGAC GCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGA GACCCGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCA AGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGG AGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGG GGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGC AACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGC CTCCCAGA	60
Аминокислотная последовательность CD3ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	61
TRAC-LHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATC GAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGA TTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTG GTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAA ACCTCCCATTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCA CTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTT CCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTT TTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATT AAGTAGCCCTGCATTTACAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGG CCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGCCAA	62

GATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACG
 AGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAAGCATGA
 GACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCCAT
 CACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGG
 AAATGAGATCATGTCCTAACCCTGATCCTCTTGTCCCACAGA
 TATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTC
 TAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGA
 TTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTA
 TATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTT
 CA

Промотор
 EFl α

GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCAC
 AGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCG
 GTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGAT
 GTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAA
 CCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGC
 AACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGG
 TTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTATGGCCCTTGCGT
 GCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGAT
 CCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCC
 TTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGC
 CTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGC
 ACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCAT
 TAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAA
 GATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATT
 TCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCC
 CAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCC
 ACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTG
 CTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCT
 GGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCG
 GAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAA
 ATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCAC
 CCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTT
 CATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTC
 GATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTAGGTTGG
 GGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGG

GTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTC
 TCCTTGGAATTTGCCCTTTTGTAGTTTGGATCTTGGTTCATTC
 TCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCA
 GGTGTCGTGA

Синтетический сигнал поли(А) AATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTT
 TTGTGTG

64

TRAC-RHA TGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAAC
 AACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGT
 AAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCA
 GGAATGGCCAGGTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCT
 AAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCAC
 CAAAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGG
 CAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGA
 AGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCC
 AACTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCC
 CTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGT
 TGCCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCA
 GCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCA
 ATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAG
 TGGAGGAATTAAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCCAGAGGA
 AGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAA
 AAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGG
 TTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGG
 CTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAG
 GGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCA
 ATGAGAAAGG

65

Описание производственного процесса CTX130

(i) 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 50×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

(ii) Криоконсервация Т-клеток

Образцы клеток отбирали для подсчета клеток, определения жизнеспособности ($\geq 80\%$), а затем разделяли на аликвоты и помещали в криопакеты с этилвинилацетатом при целевом количестве клеток 2500×10^6 клеток/пакет (30-70 мл клеточной суспензии). Одного Лейкопака может быть достаточно для получения 1-2 пакетов Т-клеток. Каждый пакет запаивали, маркировали, хранили при температуре $2-8^\circ\text{C}$ до переноса в программируемую морозильную камеру, а затем переносили в паровую фазу жидкого азота для хранения.

(iii) Размораживание Т-клеток, первая электропорация и активация

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. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере для электропорации и снова центрифугировали при тех же условиях. Клетки ресуспендировали в буфере для электропорации второй раз до целевой концентрации 300×10^6 клеток/мл.

Нуклеазу Cas9 смешивали с sgRNA для CD70-7 в микроцентрифужной пробирке и инкубировали не менее 10 минут при комнатной температуре с образованием рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса. Затем Cas9/sgRNA смешивали с клетками, доводя Cas9 и sgRNA для CD70-7 до конечной концентрации 0,15 мг/мл и 0,16 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 колбу Эрленмейера объемом 125 мл и инкубировали при 37°C не менее 20 минут. Клетки отбирали для определения жизнеспособности ($\geq 50\%$) и подсчета. Затем 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 до целевой плотности 2×10^6 жизнеспособных клеток/мл в статические сосуды для культивирования клеток, каждый при общем объеме примерно 500 мл среды X-VIVO™ 15 с добавками/коллоидной полимерной наноматрицы, конъюгированной с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28.

Сосуды для статического культивирования клеток инкубировали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и $5 \pm 1\%$ CO_2 в течение 72 ± 4 часа. На протяжении всего процесса при каждом обращении с сосудами для статического культивирования их проверяли на наличие разрывов и утечек, а также на наличие прозрачной желтой среды.

(iv) Разбавление

Через три (3) дня в каждый сосуд для статического культивирования клеток добавляли среду X-VIVO™ 15 с добавками до конечного объема 5 л. Далее клетки инкубировали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и $5 \pm 1\%$ CO_2 в течение ночи.

(v) Вторая электропорация и трансдукция

Объем среды X-VIVO™ 15 с добавками уменьшали до конечного объема примерно 500 мл с помощью насоса, соединенного с погружной пробиркой сосуда для статического культивирования клеток.

Сосуд для статического культивирования клеток осторожно вращали, чтобы позволить клеткам ресуспендироваться в среде. Клетки отбирали для подсчета клеток, определения жизнеспособности ($\geq 70\%$).

Клетки переносили в центрифужные пробирки объемом 500 мл и центрифугировали при 540g при $20 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 15 минут. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере для электропорации и снова центрифугировали при тех же условиях. Клетки ресуспендировали в буфере для электропорации второй раз до целевой концентрации 300×10^6 клеток/мл.

Нуклеазу Cas9 смешивали с sgRNA для TA-1 и с sgRNA для $\beta 2\text{M}$ -1 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/sgRNA объединяли и смешивали с клетками, доводя Cas9, TA-1 и $\beta 2\text{M}$ -1 до конечной концентрации 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 колбу Эрленмейера объемом 125 мл и инкубировали при 37°C не менее 20 минут. Клетки отбирали для определения жизнеспособности ($\geq 70\%$) и подсчета. Клетки разбавляли до целевого значения 1×10^7 клеток/мл средой X-VIVO™ 15 и добавляли свежеразмороженный gAAV-145b при MOI 20000-50000 вг/клетка. Клетки инкубировали при 37°C , 5% CO_2 не менее 60 минут.

(vi) Размножение клеток

Клетки разбавляли средой X-VIVO™ 15 с добавками, отбирали образцы для определения жизнеспособности клеток ($\geq 70\%$) и подсчета, и высевали до плотности от $0,2 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/см² до $0,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/см² в два сосуда для статического культивирования клеток и один меньший по размеру сосуд для статического культивирования клеток, который использовали в качестве вспомогательной культуры для мониторинга клеток). Сосуды для статического культивирования клеток инкубировали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и $5 \pm 1\%$ 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.

Вспомогательную культуру клеток исследовали в отношении количества клеток, жизнеспособности и чистоты Т-клеток на протяжении всего размножения. Когда плотность клеток во вспомогательной культуре достигает примерно $30 \times 10^6/\text{см}^2$, проводят деплецию TCR $\alpha\beta$. Если плотность клеток вспомогательной культуры не достигает $30 \times 10^6/\text{см}^2$, на день 9 проводят деплецию TCR $\alpha\beta$ в основных культурах.

(vii) Деплеция TCR $\alpha\beta$

Среду в каждом сосуде для статического культивирования клеток уменьшали до конечного объема примерно 500 мл с помощью насоса, соединенного с погружной пробиркой статического сосуда для культивирования клеток. После того как основную часть среды удаляли, сосуды для статического культивирования клеток осторожно вращали, чтобы ресуспендировать клетки в среде.

Клетки переносили в центрифужные пробирки объемом 500 мл, снабженные погруженными пробирками, которые соединялись с сосудом для статического культивирования клеток. Клетки отбирали для определения жизнеспособности ($\geq 70\%$), подсчета и определения % CAR. Затем клетки центрифугировали при 540g при $20 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 15 минут. Осадок клеток ресуспендировали и объединяли менее чем в 650 мл PBS/EDTA, содержащего 0,5% HSA. Клеточную суспензию переносили в стерильный мешок, который подключали к автоматизированной системе обработки клеток. Автоматизированная система обработки клеток инкубирует клетки с биотин-конъюгированным антителом к TCR $\alpha\beta$. Клетки промывали и инкубировали с магнитными гранулами, связывающими биотин, чтобы обеспечить деплецию TCR $\alpha\beta^+$ клеток с применением автоматизированной системы обработки клеток.

Клетки исследовали в отношении количества клеток, для определения жизнеспособности ($\geq 70\%$) и % CAR.

(viii) 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 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и $5 \pm 1\%$ CO₂.

(ix) Сбор клеток (лекарственная субстанция)

Для сбора клеток сосуды для статического культивирования клеток извлекали из инкубатора и оставляли для осаждения клеток. Питательную среду удаляли из каждого сосуда для статического культивирования клеток с помощью насоса до конечного объема примерно 500 мл. Образцы удаленной среды отбирали на стерильность.

Сосуды для статического культивирования клеток осторожно вращали, чтобы позволить клеткам ресуспендироваться в среде. Содержимое каждого сосуда для статического культивирования клеток переносили в 3-литровый пакет для переноса с помощью насоса и отбирали образцы для определения концентрации, жизнеспособности и исследования партии лекарственной субстанции перед выпуском. Затем клетки

фильтровали через фильтр для переливания крови с размером пор 40 мкм под действием силы тяжести в отдельный стерильный пакет объемом 3 л.

Определение характеристик CTX130

CTX130 представляет собой нацеливающуюся на CD70 Т-клеточную иммунотерапию, состоящую из аллогенных Т-клеток, которые экспрессируют CAR к CD70 и содержат генетически нарушенные гены *CD70*, *TRAC* и $\beta 2M$. Проводили доклинические фармакологические и токсикологические исследования, чтобы определить характеристики потенциальной эффективности и токсичности партий разработки CTX130, не соответствующих GMP.

Получение и определение характеристик партий разработки CTX130, не соответствующих GMP

Цель этого исследования состояла в том, чтобы определить, была ли достигнута воспроизводимая продукция Т-клеток с CAR к CD70, не соответствующих GMP, с использованием способов, описанных в данном документе.

Три отдельных донора Т-клеток человека редактировали для создания партий разработки CTX130, не соответствующих GMP, с RNP, содержащими Cas9 и gRNA к CD70, на начальной стадии, за которыми следуют RNP, содержащие Cas9 и gRNA к TRAC и $\beta 2M$, с последующей трансдукцией посредством AAV6, содержащего донорную матрицу, кодирующую CAR на второй стадии. Клетки впоследствии подвергали деплеции в отношении оставшихся остаточных клеток TCR⁺, используя колоночную очистку.

Вкратце, Т-клетки от 3 отдельных доноров размораживали и подвергали электропорации с RNP, содержащими Cas9 и gRNA, нацеливающуюся на локусы CD70, затем активировали с применением коллоидной полимерной наноматрицы, конъюгированной с рекомбинантными гуманизированными агонистами CD3 и CD28, в течение 3 дней. На день 4 гранулы разбавляли и Т-клеткам позволяли размножаться в течение дополнительного дня. В день 5 клетки подвергали электропорации с RNP, содержащими Cas9 и gRNA, нацеливающиеся на локусы TRAC и $\beta 2M$, с последующей инкубацией с AAV6, содержащим матрицу HDR, содержащую CAR к CD70. Через десять дней после второй стадии редактирования гена клетки анализировали с применением проточного цитометра для оценки эффективности нокаута TRAC, $\beta 2M$ и CD70, а также процентной доли клеток, экспрессирующих CAR. Окрашивание проводили с применением антител к белкам TRAC, $\beta 2M$ и CD70, а экспрессию CAR определяли с помощью окрашивания посредством антитела к Fab2 мыши, меченного биотином, с последующей инкубацией с флуоресцентным стрептавидином.

Анализ отредактированных клеток продемонстрировал $99,7 \pm 0,1\%$ отрицательных по TRAC клеток, $79,4 \pm 1,1\%$ отрицательных по $\beta 2M$ клеток и $98,9 \pm 0,3\%$ CD70⁻ клеток (**таблица 13**). Экспрессию CAR обнаруживали в $80,8 \pm 8,4\%$ клеток у 3 исследованных доноров (**таблица 13**). Получали дополнительную исследовательскую партию CTX130 с использованием четвертого донора (донор 4) с использованием того же процесса, но исследовательскую партию не подвергали деплеции в отношении оставшихся остаточных

TCR⁺ клеток.

Таблица 13. Сводные данные об эффективности редактирования партий CTX130 от 4 отдельных доноров.

Образец	% TCR ⁺	% β2M ⁺	% CD70 ⁺	% CAR ⁺
Донор 1	99,6	80,63	99,15	85,2
Донор 2	99,8	78,81	98,62	71,1
Донор 3	99,9	78,7	99,06	86,1
Среднее	99,7 ± 0,1	79,4 ± 1,1	98,9 ± 0,3	80,8 ± 8,4
Донор 4*	99,4	85,9	90,2	79

*Исследовательскую партию CTX130 получали без деплеции остаточных клеток TCR⁺; не входят в среднее значение.

(i) Высвобождение эффекторных цитокинов

Цель этого исследования состояла в том, чтобы оценить способность клеток CTX130 секретировать гамма-интерферон (IFNγ) и интерлейкин 2 (IL-2) при совместном культивировании с CD70⁺ или CD70⁻ клетками.

Клетки-мишени человека (линии CD70⁺ клеток A498 и ACHN и линия CD70⁻ клеток MCF7) совместно культивировали с Т-клетками при различных соотношениях (от 0,125:1 до 4:1 Т-клеток к клеткам-мишеням) при 50000 клеток-мишеней на лунку в 96-луночном планшете в течение 24 часов. Клетки-мишени инкубировали либо с клетками CTX130, либо с контрольными клетками (неотредактированными Т-клетками). Уровни IFNγ и IL-2 в супернатантах в среде для культивирования измеряли и они продемонстрировали, что CTX130 обладает способностью секретировать IFNγ и IL-2 при совместном культивировании с CD70⁺ клетками, но не при совместном культивировании с CD70⁻ клетками.

(ii) Цитотоксичность в отношении опухолевых клеток

Цель этого исследования состояла в том, чтобы оценить способность клеток CTX130 уничтожать CD70⁺ клетки. Вкратце, CD70⁺ клетки-мишени человека (A498 и ACHN) высевали по 50000 клеток-мишеней на лунку в 96-луночный планшет в течение ночи, а затем совместно культивировали либо с CTX130, либо с неотредактированными Т-клетками при различных соотношениях (от 0,125:1 до 4:1 Т-клеток к клеткам-мишеням) в течение 24 часов. Измеряли уничтожение клеток-мишеней, и они продемонстрировали, что клетки CTX130 уничтожают CD70⁺ клеточные линии *in vitro*.

(iii) Другие исследования

Другие исследования продемонстрировали способность клеток CTX130 ограничивать рост опухолевых клеток в подкожных моделях почечно-клеточного рака и синдрома Сезари и продемонстрировали, что лечение CTX130 хорошо переносилось мышами в отношении каждой из измеренных конечных точек, включая выживаемость, клинические признаки GvHD и массу тела.

(iv) Перекрестная реактивность в отношении тканей человека

Цель этого исследования состояла в том, чтобы оценить селективность CAR, связывающего CD70, содержащегося в CTX130, в исследовании перекрестной реактивности в отношении тканей на основе иммуногистохимии. Исследуемый образец, использованный в этом исследовании, представлял собой антитело, из которого получали часть scFv из CTX130. Стандартную панель из 32 тканей человека оценивали при двух концентрациях антител: оптимальной концентрации (2,5 мкг/мл) и высокой концентрации (10,0 мкг/мл) в попытке захватить любое потенциальное связывание с тканями человека. Для каждой тестируемой ткани оценивали срезы от 3 доноров. Положительное окрашивание от минимальной до умеренной степени наблюдали в некоторых лимфоидных тканях (лимфатических узлах и миндалинах), что соответствовало нормальным образцам экспрессии CD70. В остальных тканях панели окрашивания не наблюдали. Сильное окрашивание наблюдали в положительном контроле (опухолевые клетки почечно-клеточной карциномы человека).

(v) Цитокин-независимый рост

Целью данного исследования является оценка способности CTX130 пролиферировать в отсутствие сыворотки и цитокинов IL-2 и IL-7. Вкратце, клетки CTX130 из исследовательских партий и партий разработки, не соответствующих GMP, выращивали либо в полной Т-клеточной среде, либо в среде, содержащей сыворотку, но без цитокинов IL2 или IL7 (только сыворотка), либо без сыворотки или цитокинов (базовая среда). День 0 наступает через 14 дней после редактирования генома. Роста в отсутствие цитокинов не наблюдали как в отношении исследовательских партий, так и в отношении партий разработки, не соответствующих GMP. Эти результаты демонстрируют отсутствие роста и пролиферации в средах, не содержащих сыворотку и цитокины, после редактирования генома.

ПРИМЕР 6. Улучшенное размножение клеток

Оптимизированная электропорация для увеличения выхода размножения клеток CTX130

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 СТХ130, 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 см² 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 $300 \times 10^6 \leq x \leq 600 \times 10^6$ клеток можно высевать в 2× сосуда для культивирования, $600 \times 10^6 \leq x \leq 800 \times 10^6$ клеток можно высевать в 3× сосуда для культивирования или $\leq 800 \times 10^6$ клеток можно высевать в 4× сосуда для культивирования.

В некоторых аспектах в каждый сосуд для культивирования высевают от приблизительно 400000 клеток/см² до 500000 клеток/см². В качестве альтернативы в каждый сосуд для культивирования высевают от приблизительно 250000 клеток/см² до 500000 клеток/см², или в каждый сосуд для культивирования высевают от приблизительно 300000 клеток/см² до 500000 клеток/см², или в каждый сосуд для культивирования высевают от приблизительно 150000 клеток/см² до 250000 клеток/см², или в каждый сосуд для культивирования высевают от приблизительно 150000 клеток/см² до 500000 клеток/см², или в каждый сосуд для культивирования высевают от приблизительно 150000 клеток/см² до 600000 клеток/см².

В некоторых аспектах целевая плотность высевания составляет по меньшей мере приблизительно 150000 клеток/см², или по меньшей мере приблизительно 250000 клеток/см², или по меньшей мере приблизительно 300000 клеток/см², или по меньшей мере приблизительно 400000 клеток/см², или по меньшей мере приблизительно 500000 клеток/см².

В некоторых аспектах целевая плотность высевания составляет приблизительно 250000 клеток/см². В других аспектах целевая плотность высевания составляет приблизительно 500000 клеток/см².

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 7×10^8 клеток для трансдукции, до $1,4 \times 10^9$ клеток приводит к получению достаточного материала для засеивания 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 процесса производства СТХ130 аналогичны описанным в приведенных выше примерах.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Хотя в данном документе были описаны и проиллюстрированы несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, специалисты средней квалификации в данной области 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 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 применяют идеи настоящего изобретения. Специалисты в данной области поймут или смогут установить с применением не более чем стандартного эксперимента многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Следовательно, следует понимать, что вышеупомянутые варианты осуществления представлены только в качестве примера и что в пределах прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов варианты осуществления настоящего изобретения могут быть реализованы на практике иным образом, чем 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 предел 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 одинаково, т. е. "один или несколько" элементов, соединенных таким образом. Необязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных союзом "и/или", независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на "А и/или В" при использовании в сочетании с открытой фразой, такой как "содержащий", может относиться в одном варианте осуществления только к А (необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления только к В (необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления одновременно к А и В (необязательно включая другие элементы) и т. д.

Используемый в данном документе в описании и формуле изобретения союз "или" следует понимать как имеющий то же значение, что и "и/или", как определено выше. Например, при разделении пунктов в перечне союзы "или" или "и/или" следует интерпретировать как включающие, т. е. включающие по меньшей мере один, но также включающие более одного из числа или перечня элементов и необязательно дополнительные элементы, не внесенные в перечень. Только термины, явно указывающие на обратное, такие как "только один из" или "ровно один из" или, при использовании в формуле изобретения, "состоящий из", будут относиться к включению ровно одного элемента из числа или перечня элементов. Как правило, термин "или", используемый в данном документе, следует интерпретировать только как указывающий на исключающие 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) введение в первую популяцию Т-клеток первого рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса, включающего первый фермент Cas9 и первую направляющую РНК (gRNA), нацеливающуюся на ген *CD70*, с получением второй популяции Т-клеток, где вторая популяция Т-клеток содержит Т-клетки с нарушенным геном *CD70*;
- (iii) введение во вторую популяцию Т-клеток второго RNP-комплекса, включающего второй фермент Cas9 и вторую gRNA, нацеливающуюся на ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (*TRAC*), и третьего RNP-комплекса, включающего третий фермент Cas9 и третью gRNA, нацеливающуюся на ген бета-2-микроглобулина (*β2M*), с получением третьей популяции Т-клеток, где третья популяция Т-клеток содержит Т-клетки с нарушенным геном *CD70*, нарушенным геном *TRAC* и нарушенным геном *β2M*;
- (iv) инкубацию 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 гену *TRAC*, и где четвертая популяция Т-клеток содержит активированные Т-клетки, экспрессирующие CAR и имеющие нарушенный ген *CD70*, нарушенный ген *TRAC* и нарушенный ген *β2M*;
- (v) размножение четвертой популяции Т-клеток, за счет чего получают популяцию размноженных Т-клеток;
- (vi) удаление TCRαβ⁺ Т-клеток из популяции 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 *CD70*, нарушенный ген *TRAC* и нарушенный ген *β2M*; 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 (б).

7. Способ по любому из пп. 1-6, где стадию (ii) осуществляют путем электропорации.
8. Способ по п. 7, где концентрация первого фермента Cas9 составляет приблизительно 0,15 мг/мл, и концентрация первой gRNA, нацеливающейся на ген *CD70*, составляет приблизительно 0,16 мг/мл.
9. Способ по п. 7 или п. 8, где концентрация клеток на стадии (ii) составляет от приблизительно 100×10^6 клеток/мл до приблизительно 350×10^6 клеток/мл.
10. Способ по п. 9, где концентрация клеток на стадии (ii) составляет приблизительно 300×10^6 клеток/мл.
11. Способ по любому из пп. 1-10, где стадия размножения предусматривает высевание Т-клеток при плотности от приблизительно 150000 клеток/см² до приблизительно 600000 клеток/см², необязательно от приблизительно 300000 клеток/см² до приблизительно 500000 клеток/см² в сосуд для клеток.
12. Способ по любому из пп. 1-11, где способ дополнительно предусматривает после стадии (ii) и перед стадией (iii) инкубацию второй популяции Т-клеток в присутствии средства, активирующего Т-клетки, в сосуде для культивирования клеток с получением активированной популяции Т-клеток, где активированная популяция Т-клеток содержит активированные Т-клетки с нарушенным геном *CD70*.
13. Способ по п. 12, где средство, активирующее Т-клетки, включает агонист CD3 и агонист CD28, и где агонист CD3 и агонист CD28 присоединены к частице наноматрицы.
14. Способ по п. 12, где инкубацию второй популяции Т-клеток в присутствии средства, активирующего Т-клетки, в сосуде для культивирования клеток проводят при плотности высевания клеток, составляющей приблизительно 2×10^6 /см², и концентрации клеток, составляющей приблизительно 2×10^6 клеток/мл, в течение приблизительно 72 часов.
15. Способ по любому из пп. 12-14, где отношение средства, активирующего Т-клетки, к среде в смеси составляет приблизительно 1:12,5 (об./об.).
16. Способ по любому из пп. 12-15, дополнительно предусматривающий разбавление средства, активирующего Т-клетки, в активированной популяции Т-клеток после инкубации второй популяции Т-клеток в присутствии средства, активирующего Т-клетки, для снижения степени активации и обеспечения восстановления клеток перед стадией (iii).
17. Способ по любому из пп. 1-16, где стадию (iii) осуществляют путем электропорации.
18. Способ по любому из пп. 1-17, где на стадии (iii) предусмотрено одно событие электропорации.
19. Способ по любому из пп. 12-16, где второй RNP-комплекс и третий RNP-комплекс вводят в активированные Т-клетки в ходе одного события электропорации.
20. Способ по любому из пп. 17-19, где количество второго фермента Cas9 во втором RNP-комплексе является таким же, как количество третьего фермента Cas9 в третьем RNP-комплексе.

21. Способ по любому из пп. 17-20, где концентрация второго фермента Cas9 составляет приблизительно 0,15 мг/мл, концентрация третьего фермента Cas9 составляет приблизительно 0,15 мг/мл, концентрация второй gRNA, нацеливающейся на ген *TRAC*, составляет приблизительно 0,08 мг/мл, и концентрация третьей gRNA, нацеливающейся на ген *β2M*, составляет приблизительно 0,2 мг/мл.

22. Способ по любому из пп. 17-21, где концентрация клеток в популяции размноженных Т-клеток на стадии (v) составляет от приблизительно 100×10^6 клеток/мл до приблизительно 400×10^6 клеток/мл.

23. Способ по любому из пп. 17-21, где количество клеток на стадии (iv) составляет приблизительно 3×10^8 клеток.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где вектор на основе AAV характеризуется значением множественности заражения (MOI), составляющим от приблизительно 10000 до приблизительно 80000.

25. Способ по п. 24, где MOI вектора на основе AAV составляет приблизительно 20000.

26. Способ по п. 24 или п. 25, где вектор на основе AAV представляет собой вектор на основе AAV серотипа 6 (AAV6).

27. Способ по любому из пп. 1-26, где стадию (v) осуществляют путем культивирования четвертой популяции Т-клеток в сосуде для культивирования клеток при плотности высевания, составляющей от приблизительно 2×10^5 клеток/см² до приблизительно 7×10^5 клеток/см², в течение от приблизительно 6 дней до приблизительно 12 дней.

28. Способ по любому из пп. 1-26, где стадию (v) осуществляют путем культивирования четвертой популяции Т-клеток в сосуде для культивирования клеток при плотности высевания, составляющей от приблизительно 2×10^5 клеток/см² до приблизительно 5×10^5 клеток/см² в течение от приблизительно 7 дней до приблизительно 9 дней.

29. Способ по п. 27 или п. 28, где четвертую популяцию Т-клеток культивируют при плотности высевания, составляющей от приблизительно 3×10^5 клеток/см² до приблизительно 5×10^5 клеток/см².

30. Способ по п. 27 или п. 29, 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.

31. Способ по любому из пп. 27, 28 или п. 29, 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.

32. Способ по любому из пп. 1-30, где стадию (vi) осуществляют путем приведения размноженных клеток в контакт с гранулами, на которых иммобилизованы антитела к TCRαβ, и сбора несвязавшихся клеток.

33. Способ по любому из пп. 1-32, где первый фермент Cas9, второй фермент Cas9 и/или третий фермент Cas9 представляет собой нуклеазу Cas9 *Streptococcus pyogenes* (spCas9).

34. Способ по любому из пп. 1-33, где первый фермент Cas9, второй фермент Cas9 и третий фермент Cas9 являются одинаковыми.

35. Способ по п. 34, где первый фермент Cas9, второй фермент Cas9 и третий фермент Cas9 содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

36. Способ по любому из пп. 1-35, где первая gRNA, нацеливающаяся на ген *CD70*, содержит спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 4.

37. Способ по п. 36, где первая gRNA, нацеливающаяся на ген *CD70*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 2.

38. Способ по любому из пп. 1-37, где вторая gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC*, содержит спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 8.

39. Способ по п. 38, где вторая gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC*, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 6.

40. Способ по любому из пп. 1-39, где третья gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, содержит спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 12.

41. Способ по п. 40, где третья gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 10.

42. Способ по любому из пп. 36-41, где первая gRNA, вторая gRNA, третья gRNA и/или их комбинация содержат одну или несколько 2'-О-метилфосфотиоатных модификаций.

43. Способ по любому из пп. 1-42, где CAR содержит внеклеточный домен, нацеливающийся на раковый антиген, трансмембранный домен, костимулирующий домен и цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ .

44. Способ по п. 43, где внеклеточный домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), трансмембранный домен получен из CD8a, и/или костимулирующий домен получен из 4-1BB.

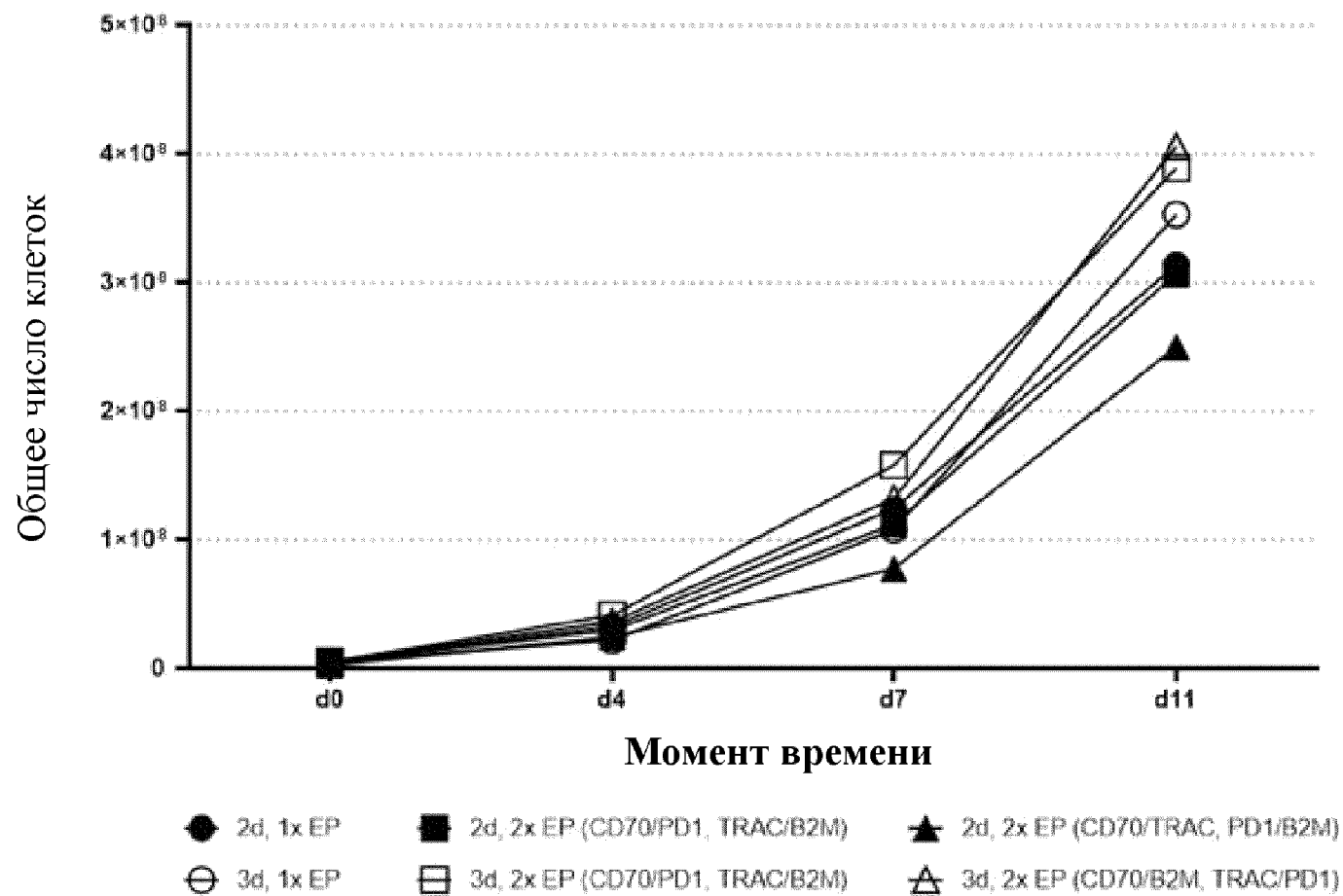
45. Способ по п. 44, где scFv-фрагмент связывает CD70.

46. Способ по п. 45, где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46.

47. Популяция генетически сконструированных Т-клеток, полученная с помощью способа по любому из пп. 1-46.

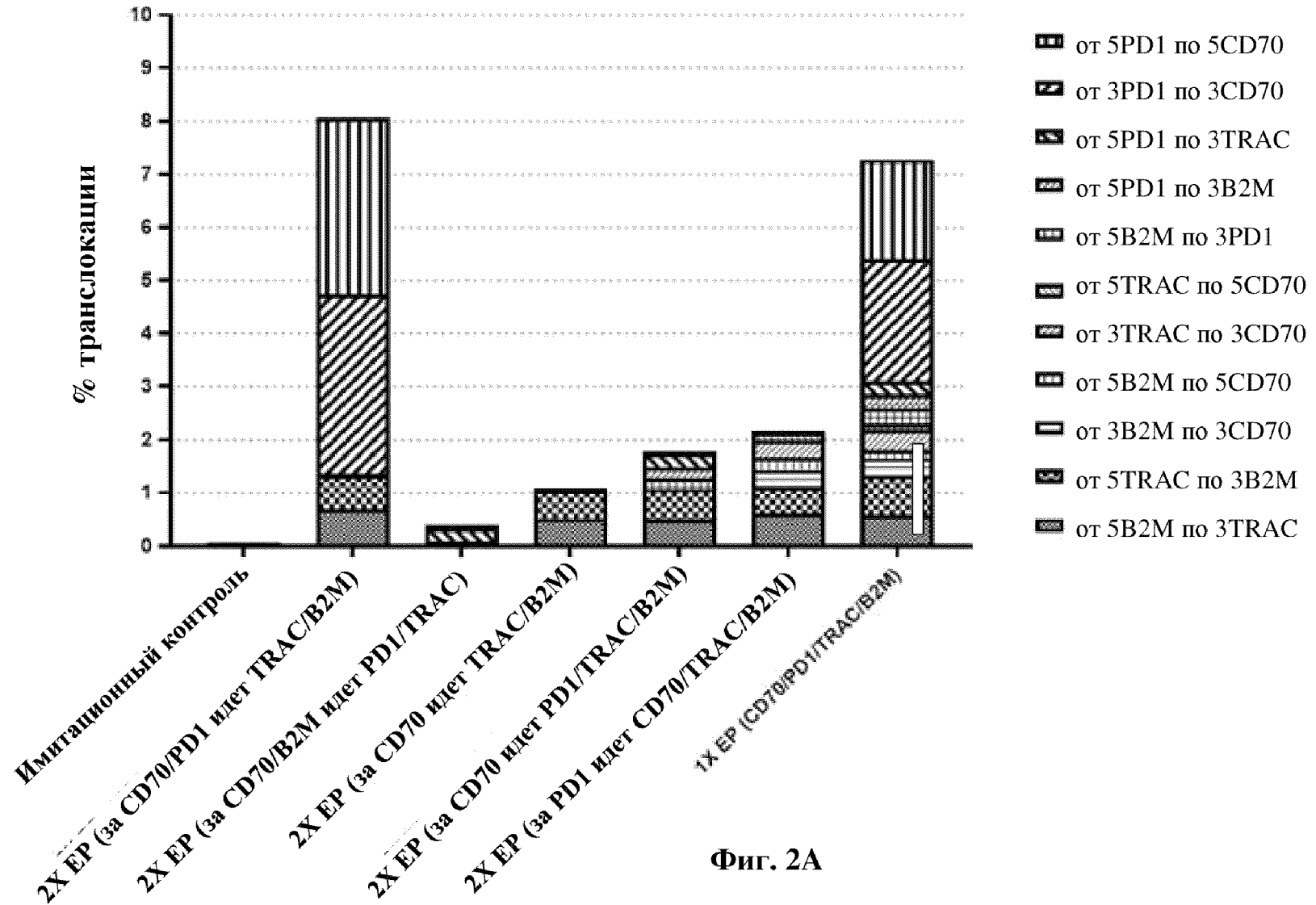
По доверенности

Активация и определение времени и порядок ЕР



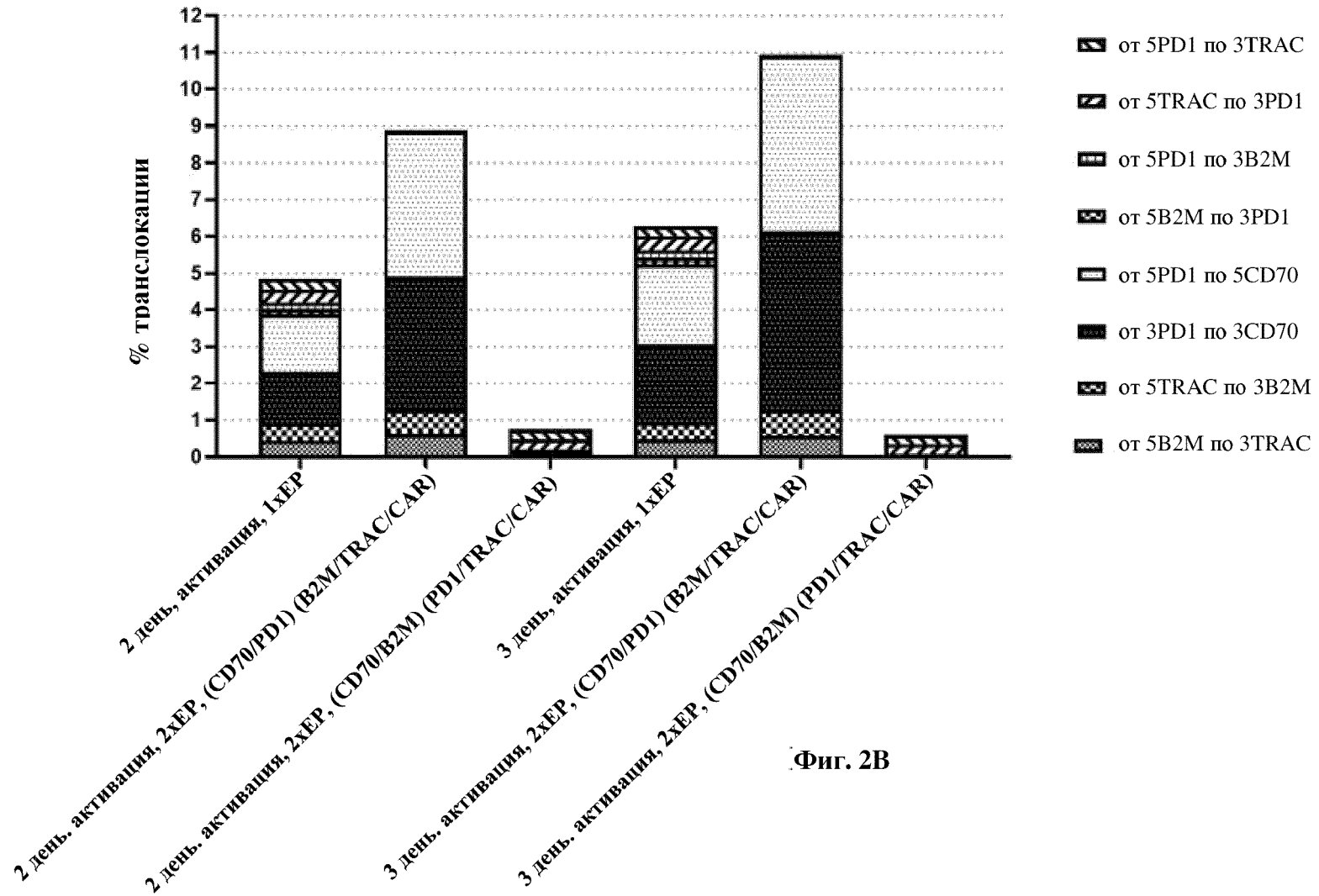
Фиг. 1

Данные транслокации JC005 – 11 видов



Фиг. 2А

Проценты транслокации у 8 видов





Фиг. 3А



Фиг. 3В