

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291945** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.30

(51) Int. Cl. **C12N 15/79 (2006.01)**

(22) Дата подачи заявки
2021.01.15

(54) ЗАЩИТНЫЕ ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛИ ДЛЯ РЕГУЛИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

(31) **62/962,764; 62/962,739; 62/962,730**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.01.17**

**Кларк Райан, Хоффман Грег, Мэй
Эндрю, Там Элеоноре (US)**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/013735**

(74) Представитель:

(87) **WO 2021/146627 2021.07.22**

Медведев В.Н. (RU)

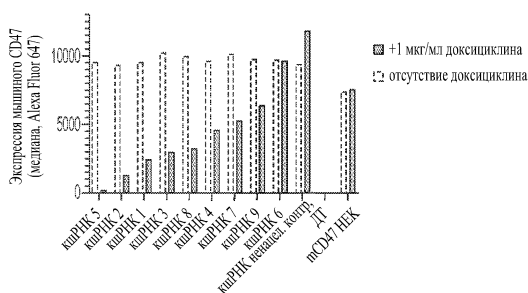
(71) Заявитель:

**САНА БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК.
(US)**

(57) В изобретении описаны клетки, включая плюрипотентные стволовые клетки, которые условно экспрессируют иммуносупрессивный фактор, и соответствующие способы их применения и получения. В некоторых вариантах осуществления описанные клетки не экспрессируют человеческие лейкоцитарные антигены МНС I и МНС II, а в некоторых случаях также не экспрессируют один или более комплексов TCR. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенность клеток контролируется активацией системы контролируемой экспрессии при приведении в контакт клеток со специфическим фактором или агентом.

LTR—U6ter—kshRNA—EF1a—letR—kshRNA—HygroR—LTR

Нокдаун экспрессии мышиного CD47
с помощью индуцируемой кшРНК



Индуктируемый мышиный CD47, нацеленный на кшРНК

A1

202291945

202291945

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575103EA/081

ЗАЩИТНЫЕ ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛИ ДЛЯ РЕГУЛИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

[0001] В данной заявке испрашивается преимущество согласно § 119(е) раздела 35 Свода законов США по предварительной заявке на патент США № 62/962730, поданной 17 января 2020 г., 62/962739, поданной 17 января 2020 г., и 62/962764, поданной 17 января 2020 г., описание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка подается совместно с перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием SANA006WO1SeqList.txt, созданного 14 января 2021 г. и имеющего размер 33948 байт. Информация в электронном формате перечня последовательностей включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Дегенеративные заболевания представляют непропорционально большую угрозу здоровью человека. Часто связанные с возрастом, эти заболевания приводят к прогрессирующему разрушению пораженных тканей и органов и, в конечном итоге, к инвалидности и смерти больного. Перспектива регенеративной медицины заключается в том, чтобы заменить больные или отсутствующие клетки новыми здоровыми клетками. За последние пять лет возникла новая парадигма регенеративной медицины - применение человеческих плюрипотентных стволовых клеток (чПСК) для получения любого типа взрослых клеток для трансплантации пациентам. В принципе, клеточная терапия на основе чПСК может излечить большинство, если не все дегенеративные заболевания, однако успех такой терапии может быть ограничен иммунным ответом субъекта.

[0004] Стратегии, которые рассматривались для преодоления иммунного отторжения, включают HLA-типирование (например, однояйцовые близнецы или банки пуповинной крови), введение иммуносупрессивных препаратов субъекту, блокирующие антитела, миелосупрессию/химеризм мозаичного типа, хранилища HLA-совместимых стволовых клеток и терапию аутологичными стволовыми клетками.

[0005] Сохраняется потребность в новых подходах, композициях и способах преодоления иммунного отторжения, связанного с клеточной терапией.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В одном аспекте в данном документе предложен способ контроля иммуногенности сконструированной клетки, включающий: (а) получение выделенной клетки; (b) введение в выделенную клетку (i) нуклеиновой кислоты, содержащей промотор индуцируемой РНК-полимеразы, функционально связанный с

последовательностью кшРНК, нацеленной на иммуносупрессивный фактор, и (ii) нуклеиновой кислоты, содержащей промотор, функционально связанный с трансктивирующим элементом, соответствующим индуцируемому промотору РНК-полимеразы для получения сконструированной клетки; и (с) воздействие экзогенного фактора на сконструированную клетку для активации трансктивирующего элемента, тем самым контролируя иммуногенность клетки.

[0007] В одном аспекте в данном документе предложен способ контроля иммуногенности сконструированной клетки, включающий: (а) получение выделенной клетки; (b) введение в выделенную клетку нуклеиновой кислоты, содержащей (i) последовательность, кодирующую индуцируемый элемент дегрон, функционально связанный с иммуносупрессивным фактором, или (ii) последовательность, кодирующую иммуносупрессивный фактор, функционально связанный с индуцируемым элементом дегрон, для получения сконструированной клетки; и (с) воздействие экзогенного фактора на сконструированную клетку для активации индуцируемого элемента дегрон, тем самым контролируя иммуногенность сконструированной клетки.

[0008] В еще одном аспекте в данном документе предложен способ контроля иммуногенности сконструированной клетки, включающий: (а) получение выделенной клетки; (b) введение в выделенную клетку: (i) первой конструкции, содержащей от 5'-конца к 3'-концу: первый промотор и ген иммуносупрессивного фактора; (ii) вторую конструкцию, содержащую от 5'-конца к 3'-концу: второй промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Cas9 или ее вариант; и (ii) третью конструкцию, содержащую от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы, последовательность направляющей РНК (нРНК), нацеленную на иммуносупрессивный фактор, третий промотор и трансктивирующий элемент, соответствующий индуцируемому промотору РНК-полимеразы; и (с) воздействие экзогенного фактора на сконструированную клетку для активации трансктивирующего элемента, тем самым контролируя иммуногенность сконструированной клетки.

[0009] В еще одном аспекте в данном документе предложен способ контроля иммуногенности сконструированной клетки, включающий: (а) получение выделенной клетки; (b) введение в выделенную клетку (i) нуклеиновой кислоты, содержащей промотор индуцируемой РНК-полимеразы, функционально связанный с геном иммунного сигнального фактора, и (ii) нуклеиновой кислоты, содержащей промотор, функционально связанный с трансктивирующим элементом, соответствующим индуцируемому промотору РНК-полимеразы для получения сконструированной клетки; и (с) воздействие экзогенного фактора на сконструированную клетку для активации трансктивирующего элемента, тем самым контролируя иммуногенность сконструированной клетки.

[0010] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение сконструированной клетки субъекту перед стадией (с).

[0011] В некоторых вариантах осуществления стадия (b) любого из способов включает введение в выделенную клетку одиночной конструкции нуклеиновой кислоты,

содержащей (i) промотор индуцируемой РНК-полимеразы, функционально связанный с последовательностью кшРНК, нацеленной на иммуносупрессивный фактор, и (ii) промотор, функционально связанный с трансактивирующим элементом. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы; последовательность кшРНК; промотор; и трансактивирующий элемент.

[0012] В некоторых вариантах осуществления стадия (b) включает введение в выделенную клетку одиночной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей (i) промотор индуцируемой РНК-полимеразы, функционально связанный с геном иммунного сигнального фактора, и (ii) промотор, функционально связанный с трансактивирующим элементом.

[0013] В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы, ген иммунного сигнального фактора, промотор и трансактивирующий элемент.

[0014] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка сконструирована таким образом, чтобы экзогенно экспрессировать иммуносупрессивный фактор. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка сверхэкспрессирует иммуносупрессивный фактор в отсутствие экзогенного фактора, который активирует трансактивирующий элемент.

[0015] В некоторых вариантах осуществления промотор индуцируемой РНК-полимеразы представляет собой промотор U6Tet. В некоторых вариантах осуществления промотор индуцируемой РНК-полимеразы представляет собой промотор U6Tet, трансактивирующий элемент представляет собой репрессорный элемент Tet, а экзогенный фактор представляет собой тетрациклин или его производное. В некоторых вариантах осуществления промотор индуцируемой РНК-полимеразы представляет собой промотор TRE, а трансактивирующий элемент представляет собой элемент Tet-On, а экзогенный фактор представляет собой тетрациклин или его производное.

[0016] В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер соединяет индуцируемый элемент дегрон с иммуносупрессивным фактором. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер выбран из группы, состоящей из (GSG)_n, (GGGS)_n и (GGSGGGGS)_n, где n равен 1-10.

[0017] В некоторых вариантах осуществления стадия (b) включает введение в выделенную клетку конструкции с одной нуклеиновой кислотой, содержащей промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой.

[0018] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор, выбранный из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC. В некоторых вариантах осуществления первый, второй и/или третий промоторы представляют собой конститутивные промоторы, каждый из которых независимо выбран

из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[0019] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, CI-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8.

[0020] В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит от 5'-конца к 3'-концу: промотор U6Tet, последовательность кшПНК, нацеленную на CD47, промотор EF1a и репрессорный элемент Tet, где экзогенный фактор представляет собой тетрациклин или его производное.

[0021] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[0022] В некоторых вариантах осуществления индуцируемый элемент дегрон выбран из группы, состоящей из индуцируемого лигандом элемента дегрон, пептидного элемента дегрон и элемента пептидной протеолиз-таргетированной химеры (PROTAC). В некоторых вариантах осуществления индуцируемый лигандом элемент дегрон выбран из элемента дегрон отключения с помощью малых молекул (SMASH), чувствительного к Shield-1 элемента дегрон, чувствительного к ауксину элемента дегрон, и чувствительного к рапамицину элемента дегрон. В некоторых вариантах осуществления индуцируемый лигандом элемент дегрон представляет собой элемент дегрон отключения с помощью малых молекул (SMASH), а экзогенный фактор представляет собой асунапревир.

[0023] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит 5'-плечо гомологии и 3'-плечо гомологии для направленной интеграции в локус «безопасная гавань», выбранный из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5.

[0024] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную человеческую клетку, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой. В некоторых вариантах осуществления выделенная человеческая клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию CITA, B2M и/или NLRC5.

[0025] В некоторых вариантах осуществления выделенная человеческая клетка является гипоиммуногенной и является либо стволовой клеткой, либо ее дифференцированной клеткой, причем стволовая клетка выбрана из группы, состоящей из эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, взрослой стволовой клетки, и при этом дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки сердца, клетки печени, клетки почки, клетки поджелудочной железы, нервной клетки, иммунной клетки,

мезенхимальной клетки и эндотелиальной клетки. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека является гипоиммуногенной. В некоторых вариантах осуществления выделенная человеческая клетка представляет собой стволовую клетку. В некоторых случаях стволовая клетка выбрана из группы, состоящей из эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[0026] В другом аспекте в данном документе предложена конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы; последовательность кшРНК, нацеленную на иммуносупрессивный фактор; конститутивный промотор; и трансктивирующий элемент, соответствующий индуцируемому промотору РНК-полимеразы.

[0027] В одном аспекте в данном документе предложена конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы; ген иммунного сигнального фактора; промотор; и трансктивирующий элемент, соответствующий индуцируемому промотору РНК-полимеразы.

[0028] В некоторых вариантах осуществления промотор индуцируемой РНК-полимеразы представляет собой промотор U6Tet. Во многих вариантах осуществления промотор индуцируемой РНК-полимеразы представляет собой промотор TRE.

[0029] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессорный фактор конструкции выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, Cl-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, и Mfge8. В некоторых вариантах осуществления иммунный сигнальный фактор конструкции выбран из группы, состоящей из B2M, MIC-A, MIC-B, HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFXANK, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAETI/ULBP1, RAET1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3, и других лигандов NKG2D.

[0030] В некоторых вариантах осуществления промотор конструкции выбран из группы, состоящей из промотора EF1a, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[0031] В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит от 5'-конца к 3'-концу: промотор U6Tet, последовательность кшРНК, нацеленную на CD47, промотор EF1a и репрессорный элемент Tet.

[0032] В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит от 5'-конца к 3'-концу: промотор TRE, ген иммунного сигнального фактора, промотор EF1a и элемент Tet-On.

[0033] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[0034] Также предложена композиция, содержащая выделенную клетку, содержащую любую из описанных в данном документе конструкций.

[0035] Также предложена композиция, содержащая выделенную клетку,

содержащую любую из конструкций, описанных в данном документе, где выделенная клетка сконструирована таким образом, чтобы экзогенно экспрессировать иммуносупрессивный фактор. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка сверхэкспрессирует иммуносупрессивный фактор в отсутствие экзогенного фактора, который активирует трансактивирующий элемент. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка подвергается воздействию экзогенного фактора для активации трансактивирующего элемента. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой стволовую клетку, выбранную из группы, состоящей из эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[0036] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит выделенные дифференцированные клетки, полученные культивированием любой из стволовых клеток, описанных в данном документе, в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[0037] В некоторых аспектах в данном документе предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий: (а) введение пациенту любой композиции, описанной в данном документе; и (b) воздействие экзогенного фактора на композицию для активации промотора индуцируемой РНК-полимеразы, тем самым контролируя иммуногенность клеток композиции.

[0038] Предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) фактор, выбранный из группы, состоящей из: индуцируемой кшРНК, нацеленной на CD47, индуцируемого элемента дегрон, контролирующего CD47, или элемента дегрон SMASH, контролирующего CD47.

[0039] В данном документе также предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию B2M и СПТА, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) фактор, выбранный из группы, состоящей из: индуцируемой кшРНК, нацеленной на CD47, индуцируемого элемента дегрон, контролирующего CD47, или элемента дегрон SMASH, контролирующего CD47.

[0040] Кроме того, в данном документе описана плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, (ii) сверхэкспрессию CD47, (iii) Cas9 или ее вариант, и (iv) индуцируемую направляющую РНК, нацеленную на CD47.

[0041] Кроме того, в данном документе описана плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию B2M и СПТА, (ii) сверхэкспрессию CD47, (iii) Cas9 или ее вариант и (iv) индуцируемую направляющую РНК, нацеленную на CD47.

[0042] Кроме того, в данном документе описана плюрипотентная стволовая клетка,

имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) систему индуцируемой деградации белка для модулирования экспрессии CD47, выбранную из группы, состоящей из системы отключения с помощью малых молекул (SMASH), индуцируемого Shield-1 дегрона, индуцируемого ауксином дегрона, индуцируемого IMid дегрона, пептидного дегрона, протелиз-таргетированной химеры, и антитела для направленной деградации.

[0043] Кроме того, в данном документе описана плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) систему индуцируемой деградации белка для модулирования экспрессии CD47, выбранную из группы, состоящей из системы отключения с помощью малых молекул (SMASH), индуцируемого Shield-1 дегрона, индуцируемого ауксином дегрона, индуцируемого IMid дегрона, пептидного дегрона, протеолиз-таргетированной химеры и антитела для направленной деградации.

[0044] В данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) систему регуляции РНК для модулирования экспрессии CD47, выбранную из группы, состоящей из индуцируемой кшРНК, индуцируемой киРНК, интерференции CRISPR (CRISPRi) и РНК-нацеленной нуклеазной системы.

[0045] В данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) систему регуляции РНК для модулирования экспрессии CD47, выбранную из группы, состоящей из индуцируемой кшРНК, индуцируемая киРНК, интерференции CRISPR (CRISPRi) и РНК-нацеленной нуклеазной системы

[0046] В данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) систему регуляции ДНК для модулирования экспрессии CD47, выбранную из группы, состоящей из системы экспрессии на основе тканеспецифического промотора, системы экспрессии на основе индуцируемого промотора, регулируемой молекулой системы на основе рибопереклочателя, и системы редактирования генома на основе индуцируемой нуклеазы

[0047] В данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) систему регуляции ДНК для модулирования экспрессии CD47, выбранную из группы, состоящей из системы экспрессии на основе тканеспецифического промотора, системы экспрессии на основе индуцируемого промотора, регулируемой молекулой системы на основе рибопереклочателя, и системы редактирования генома на основе индуцируемой нуклеазы

[0048] В данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или

молекул МНС класса II, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) индуцируемую систему для модулирования экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления индуцируемая система уменьшает или снижает экспрессию CD47 в клетке.

[0049] Также в данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) индуцируемую систему для модулирования экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления индуцируемая система снижает или уменьшает экспрессию CD47.

[0050] В некоторых случаях предложен дифференцированная клетка, полученная из любой из описанных плюрипотентных стволовых клеток, при этом дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки сердца, клетки печени, клетки почки, клетки поджелудочной железы, нервной клетки, иммунной клетки, мезенхимальной клетки и эндотелиальной клетки.

[0051] В одном аспекте описана конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: промотор, индуцируемый элемент дегрон, необязательную последовательность, кодирующую гибкий линкер, и ген иммуносупрессивного фактора.

[0052] В еще одном аспекте описана конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: промотор, ген иммуносупрессивного фактора, необязательную последовательность, кодирующую гибкий линкер, и индуцируемый элемент дегрон.

[0053] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор, выбранный из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[0054] Во многих вариантах осуществления гибкий линкер выбран из группы, состоящей из (GSG)_n (SEQ ID NO:3), (GGGS)_n (SEQ ID NO:1) и (GGGSGGGS)_n (SEQ ID NO: 2), где n равен 1-10

[0055] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, CI-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8.

[0056] В некоторых вариантах осуществления индуцируемый элемент дегрон выбран из группы, состоящей из индуцируемого лигандом элемента дегрон, индуцируемого пептидного элемента дегрон и элемента пептидной протеолиз-таргетированной химеры (PROTAC). В некоторых вариантах осуществления индуцируемый лигандом элемент дегрон выбран из элемента дегрон отключения с помощью малых молекул (SMASH), чувствительного к Shield-1 элемента дегрон, чувствительного к ауксину элемента дегрон, и чувствительного к рапамицину элемента дегрон.

[0057] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит 5'-плечо гомологии и 3'-плечо гомологии для направленной интеграции в

геномный локус «безопасная гавань», выбранный из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5.

[0058] Предложена композиция, содержащая выделенную клетку, содержащую любую из описанных конструкций.

[0059] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[0060] Предложена композиция, содержащая выделенные дифференцированные клетки, полученные культивированием любой из описанных стволовых клеток в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[0061] В одном из аспектов в данном документе предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий: (а) введение описанной композиции пациенту; и (b) воздействие экзогенного фактора на композицию для активации индуцируемого элемента дегрон, тем самым контролируя иммуногенность клеток композиции.

[0062] В одном аспекте в настоящем документе предложена композиция, содержащая выделенную клетку, содержащую ДНК-направленную нуклеазную систему для контроля иммуногенности клетки, содержащую: (а) первый элемент, содержащий от 5'-конца к 3'-концу: первый промотор и иммуносупрессивный фактор ген; (b) второй элемент, содержащий от 5'-конца к 3'-концу: второй промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Cas9 или ее вариант; и (c) третий элемент, содержащий от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы, последовательность направляющей РНК (нРНК), нацеленную на иммуносупрессивный фактор, третий промотор и трансактивирующий элемент, соответствующий индуцируемому промотору. В определенных вариантах осуществления иммуногенность клетки можно контролировать при воздействии на нее экзогенного фактора для индукции активности трансактивирующего элемента. В некоторых вариантах осуществления промотор индуцируемой РНК-полимеразы представляет собой промотор а U6Tet, трансактивирующий элемент представляет собой репрессорный элемент Tet, а экзогенный фактор представляет собой тетрациклин или его производное.

[0063] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, CI-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8.

[0064] В некоторых вариантах осуществления первый, второй и/или третий промоторы представляют собой конститутивные промоторы, каждый из которых независимо выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора

CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[0065] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную человеческую клетку, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой. В некоторых вариантах осуществления выделенная человеческая клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА, В2М и/или NLRC5.

[0066] В некоторых вариантах осуществления выделенная человеческая клетка является гипоиммуногенной и является стволовой клеткой. В некоторых случаях стволовая клетка выбрана из группы, состоящей из эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[0067] В данном документе предложена композиция, содержащая выделенные дифференцированные клетки, полученные культивированием описанной стволовой клетки в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[0068] В одном аспекте предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий: (а) введение композиции, описанной выше; и (б) воздействие экзогенного фактора на композицию для активации промотора индуцируемой РНК-полимеразы, тем самым контролируя иммуногенность клеток композиции.

[0069] В одном аспекте предложена композиция, содержащая выделенную клетку млекопитающего, содержащую модификацию, содержащую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую систему условной экспрессии одного или более иммуносупрессивных факторов.

[0070] В одном аспекте предложена композиция, содержащая выделенную клетку млекопитающего, содержащую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую систему условной экспрессии одного или более иммунных сигнальных факторов.

[0071] В некоторых вариантах осуществления экспрессия одного или более иммуносупрессивных факторов контролируется экзогенным фактором. В некоторых вариантах осуществления экспрессия одного или более иммунных сигнальных факторов контролируется экзогенным фактором.

[0072] В некоторых вариантах осуществления система включает систему индуцируемой деградации белка для снижения уровней белка одного или более иммуносупрессивных факторов. В некоторых вариантах осуществления система индуцируемой деградации белка выбрана из группы, состоящей из системы отключения с

помощью малых молекул (SMASH), индуцируемого Shield-1 дегрона, индуцируемого ауксином дегрона, индуцируемого IMid дегрона, пептидного дегрона, протеолиз-таргетированной химеры и антитела для направленной деградации. В некоторых вариантах осуществления система включает систему регуляции РНК для контролируемого снижения уровней РНК одного или более иммуносупрессивных факторов. В некоторых вариантах осуществления система регуляции РНК выбрана из группы, состоящей из индуцируемой кшРНК, индуцируемой киРНК, интерференции CRISPR (CRISPRi) и РНК-нацеленной нуклеазной системы. В некоторых вариантах осуществления система регуляции РНК контролируется индуцируемым лигандом фактором транскрипции, рецептором SynNotch или регулируемый лигандом рибопереклюкателем.

[0073] В некоторых вариантах осуществления система включает систему регуляции ДНК для снижения уровней экспрессии одного или более иммуносупрессивных факторов, выбранных из группы, состоящей из системы экспрессии на основе тканеспецифического промотора, системы экспрессии на основе индуцируемого промотора, регулируемой молекулой системы на основе рибопереклюкателя и системы редактирования генома на основе индуцируемой нуклеазы

[0074] В некоторых вариантах осуществления система экспрессии на основе индуцируемого промотора содержит промотор U6Tet и репрессорный элемент Tet.

[0075] В некоторых вариантах осуществления система включает систему индуцируемой стабилизации белка для повышения уровня белка одного или более иммунных сигнальных факторов.

[0076] В некоторых вариантах осуществления система индуцируемой стабилизации белка включает систему индуцируемой лигандом стабилизации белка, и систему индуцируемой малой молекулой стабилизации белка.

[0077] В некоторых вариантах осуществления система включает систему регуляции РНК для повышения уровней РНК одного или более иммунных сигнальных факторов.

[0078] В некоторых вариантах осуществления система регуляции РНК включает систему активации CRISPR (CRISPRa)

[0079] В некоторых вариантах осуществления система включает систему регуляции ДНК для повышения уровней экспрессии одного или более иммунных сигнальных факторов.

[0080] В некоторых вариантах осуществления система регуляции ДНК включает систему, выбранную из группы, состоящей из системы активации CRISPR (CRISPRa), тканеспецифического промотора, индуцируемого промотора и регулируемой молекулой системы на основе рибопереклюкателя

[0081] В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический промотор выбран из группы, состоящей из специфичного для клеток сердца промотора, специфичного для гепатоцитов промотора, специфичного для клеток почек промотора, специфичного для клеток поджелудочной железы промотора, специфичного для нервных клеток промотора, специфичного для иммунных клеток промотора, специфичного для

мезенхимальных клеток промотора и специфичного для эндотелиальных клеток промотора.

[0082] В некоторых вариантах осуществления индуцируемый промотор включает систему TetOn.

[0083] В некоторых вариантах осуществления регулируемая молекулой система на основе рибопереклювателя содержит регулируемый теофиллином рибопереклюватель, или регулируемый гуанином рибопереклюватель.

[0084] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома на основе индуцируемой нуклеазы включает систему, выбранную из группы, состоящей из редактирования генома CRISPR, включающего индуцируемую направляющую РНК, направленную на один или более иммуносупрессивных факторов, индуцируемого редактирования генома TALEN, индуцируемого редактирования генома ZFN и улучшенного малыми молекулами редактирования генома CRISPR.

[0085] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных факторов выбраны из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, СI-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8.

[0086] В некоторых вариантах осуществления один или более иммунных сигнальных факторов выбраны из группы, состоящей из бета-2-микроглобулина (B2M), родственного цепи МНС класса I белка A (MIC-A), родственного цепи МНС класса I белка B (MIC-B), HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFXANK, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1/ULBP1, RAET1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3 и других лигандов NKG2D.

[0087] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка млекопитающего представляет собой выделенную клетку человека, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой.

[0088] В некоторых вариантах осуществления выделенная человеческая клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА, B2M и/или NLRC5.

[0089] В некоторых вариантах осуществления выделенная человеческая клетка является гипоиммуногенной и является стволовой клеткой. В некоторых случаях стволовая клетка выбрана из группы, состоящей из эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[0090] Предложена композиция, содержащая выделенную дифференцированную клетку, полученную путем культивирования любой из описанных стволовых клеток в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервные клетки, иммунные клетки, мезенхимальных

клеток и эндотелиальных клеток.

[0091] В другом аспекте описан способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий: (а) введение описанной композиции; и (b) воздействие экзогенного фактора на композицию для контроля экспрессии одного или более иммуносупрессивных факторов, тем самым контролируя иммуногенность клеток композиции.

[0092] В одном аспекте описана конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) трансен защитного переключателя; (2) последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; (3) ген гипоиимунитета. В еще одном аспекте описана конструкция, содержащая от 5' к 3' концу: (1) ген гипоиимунитета; (2) последовательность проскока рибосом или линкер; (3) трансен защитного переключателя.

[0093] В некоторых вариантах осуществления трансен защитного переключателя выбран из группы, состоящей из гена HSVtk, гена цитозиндезаминазы, гена нитроредуктазы, гена пурииннуклеозидфосфорилазы, гена пероксидазы хрена, гена iCaspase9, трансгена HER1, трансгена RQR8, трансгена CD20, трансгена CCR4, трансгена HER2, трансгена CD19, трансгена MUC1, трансгена EGFR, трансгена GD2, трансгена PSMA, трансгена CD16 и трансгена CD30.

[0094] В некоторых вариантах осуществления последовательность пропуска рибосом включает последовательность, кодирующую последовательность IRES, или последовательность, кодирующую 2A-кодирующую последовательность.

[0095] В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

[0096] В некоторых вариантах осуществления ген гипоиимунитета выбран из группы, состоящей из: CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, и Mfge8.

[0097] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит элемент регуляции транскрипции, функционально связанный с трансеном защитного переключателя, и последовательность полиаденилирования на 3'-конце гена гипоиимунитета, или элемент регуляции транскрипции, функционально связанный с геном гипоиимунитета, и последовательностью полиаденилирования на 3'-конце трансгена защитного переключателя.

[0098] В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент конструкции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[0099] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00100] В некоторых вариантах осуществления предложен способ доставки конструкции в выделенную клетку, включающий трансдукцию выделенной клетки

лентивирусной конструкцией, содержащей любую описанную конструкцию, и отбор сконструированной клетки, несущей трансген защитного переключателя и ген гипоиммунитета.

[00101] В данном документе предложена выделенная клетка или ее популяция, содержащая описанную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления конструкция была введена в целевой локус гена. В некоторых вариантах осуществления генный локус представляет собой локус «безопасная гавань», выбранный из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5, или локуса гена иммунного сигналинга, выбранный из группы состоящий из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, RFXANK, SIPA, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAETI/ULBP1, RAET1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3, и других лигандов NKG2D. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную человеческую клетку, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию SIPA, B2M и/или NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка является гипоиμмогенной и представляет собой стволовую клетку.

[00102] Также предложена дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования стволовой клетки в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00103] Предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту описанных дифференцированных клеток или их популяции. Предложен способ лечения пациента, включающий активацию защитного переключателя у пациента, которому ранее вводили описанные дифференцированные клетки или их популяцию.

[00104] В одном аспекте предложена конструкция для гомологичной репарации в локусе «безопасная гавань», содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань»; (2) трансген защитного переключателя; (3) последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; (4) ген гипоиμмунитета; (5) последовательность полиаденилирования; и (6) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань». В одном аспекте предложена конструкция для гомологичной репарации в локусе «безопасная гавань», содержащая от 5'- к 3'- концу: (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга; (2) трансген

защитного переключателя; (3) последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; (4) ген гипоиммунитета; (5) последовательность полиаденилирования; и (6) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга. В одном аспекте предложена конструкция для гомологичной репарации в локусе «безопасная гавань», содержащая от 5'- к 3'- концу: (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань»; (2) трансген защитного переключателя; (3) последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (4) ген основного клеточного фактора; (5) последовательность полиаденилирования; и (6) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань». В еще одном аспекте предложена конструкция для гомологичной репарации в ген иммунного сигналинга, содержащая от 5'- к 3'-концу: (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга; (2) трансген защитного переключателя; (3) последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (4) ген основного клеточного фактора; (5) последовательность полиаденилирования; и (6) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга. В еще одном аспекте предложена конструкция для гомологичной репарации в локусе гена основного клеточного фактора, содержащая от 5'- к 3'-концу: (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса гена основного клеточного фактора; (2) последовательность, кодирующую линкер; (3) трансген защитного переключателя; и (4) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса гена основного клеточного фактора.

[00105] В некоторых вариантах осуществления ген гипоиммунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, и Mfge8.

[00106] В некоторых вариантах осуществления основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы и белка субъединицы сплайсосомы.

[00107] В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» выбран из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5.

[00108] В некоторых вариантах осуществления локус иммунного сигнального гена выбран из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, RFXANK, SIPA, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1/ULBP1, RAE11L/ULBP6, RAET1N/ULBP3, и других лигандов NKG2D.

[00109] В некоторых вариантах осуществления локус гена иммунного сигналинга выбран из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D и HLA-E.

[00110] В некоторых вариантах осуществления последовательность пропуска рибосом включает последовательность, кодирующую последовательность IRES, или последовательность, кодирующую 2А-кодирующую последовательность.

[00111] В некоторых вариантах осуществления 2А-кодирующая последовательность выбрана из группы, состоящей из T2A, P2A, E2A и F2A.

[00112] В некоторых вариантах осуществления конструкция позволяет нацеливающей нуклеазе расщеплять локус «безопасная гавань» или локус гена иммунного сигналинга, тем самым позволяя конструкции рекомбинировать в локус посредством гомологичной репарации.

[00113] В некоторых вариантах осуществления конструкция позволяет нацеливающей нуклеазе расщеплять локус гена основного клеточного фактора, тем самым позволяя конструкции рекомбинировать в локус посредством гомологичной репарации.

[00114] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит элемент регуляции транскрипции, выбранный из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC, который расположен на 5'-конце трансгена защитного переключателя.

[00115] В некоторых вариантах осуществления трансген защитного переключателя выбран из группы, состоящей из гена HSVtk, гена цитозиндезаминазы, гена нитроредуктазы, гена пуриннуклеозидфосфорилазы, гена пероксидазы хрена, гена iCaspase9, трансгена HER1, трансгена RQR8, трансгена CD20, трансгена CCR4, трансгена HER2, трансгена CD19, трансгена MUC1, трансгена EGFR, трансгена GD2, трансгена PSMA, трансгена CD16 и трансгена CD30.

[00116] В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

[00117] В данном документе описана выделенная клетка или ее популяция, содержащая трансген защитного переключателя и ген гипоиммунитета, интегрированный в локус «безопасная гавань» или локус гена иммунного сигналинга, где любая из конструкций, указанных выше, рекомбинировала в эндогенный локус «безопасная гавань» клетки, или при этом любая из вышеуказанных конструкций рекомбинировала в локус эндогенного гена иммунного сигналинга клетки. В данном документе описана выделенная клетка или ее популяция, содержащая трансген защитного переключателя и ген основного клеточного фактора, интегрированный в локус «безопасная гавань» или локус гена иммунного сигналинга, где любая из вышеперечисленных конструкций рекомбинировала в эндогенный локус «безопасная гавань» клетки, или где любая из конструкций, указанных выше, рекомбинирована в локус эндогенного гена иммунного сигналинга клетки, и где клетка или ее популяция не способны экспрессировать основной клеточный фактор из эндогенного локуса.

[00118] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную сконструированную человеческую клетку, дополнительно имеющую

делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СПТА, В2М и/или NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой гипоиммуногенную и стволовую клетку. В некоторых случаях стволовая клетка выбрана из группы, состоящей из эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[00119] Предусмотрена дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования любой стволовой клетки, описанной в данном документе, в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00120] Описан способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту описанных дифференцированных клеток или их популяции. Также описан способ лечения пациента, включающий активацию защитного переключателя у пациента, которому ранее вводили описанные дифференцированные клетки или их популяцию.

[00121] Предложена независимая от гомологии донорная конструкция, содержащая от 5'- к 3'-концу: (1) 5'-концевой длинный повтор (LTR), содержащий левый элемент (LE); (2) элемент акцептор сплайсинга-вирусный пептид 2A (SA-2A); (3) трансген защитного переключателя; (4) последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (5) ген гипоиммунитета; (6) последовательность полиаденилирования; и (7) 3' LTR, содержащий правый элемент (RE).

[00122] Предложена независимая от гомологии донорная конструкция, содержащая от 5'- к 3'-концу: (1) 5'-длинные концевые повторы (LTR), содержащие левый элемент (LE); (2) элемент акцептор сплайсинга-вирусный пептид 2A (SA-2A); (3) трансген защитного переключателя; (4) последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (5) ген основного клеточного фактора; (6) последовательность полиаденилирования; и (7) 3' LTR, содержащий правый элемент (RE).

[00123] Предложена независимая от гомологии донорная конструкция, содержащая от 5'- к 3'-концу: (1) 5'-длинные концевые длинные повторы (LTR), содержащие левый элемент (LE); (2) элемент акцептор сплайсинга-вирусный пептид 2A (SA-2A); (3) ген основного клеточного фактора; (4) последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (5) трансген защитного переключателя; (6) последовательность полиаденилирования; и (7) 3' LTR, содержащий правый элемент (RE).

[00124] В некоторых вариантах осуществления ген гипоиммунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E,

PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, и Mfge8.

[00125] В некоторых вариантах осуществления основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы и белка субъединицы сплайсосомы.

[00126] В некоторых вариантах осуществления конструкция предназначена для интеграции в целевой локус гена выделенной клетки для нарушения экспрессии целевого гена.

[00127] В некоторых вариантах осуществления трансген защитного переключателя выбран из группы, состоящей из гена HSVtk, гена цитозиндезаминазы, гена нитроредуктазы, гена пуриноклеозидфосфорилазы, гена пероксидазы хрена, гена iCaspase9, трансгена HER1, трансгена RQR8, трансгена CD20, трансгена CCR4, трансгена HER2, трансгена CD19, трансгена MUC1, трансгена EGFR, трансгена GD2, трансгена PSMA, трансгена CD16 и трансгена CD30.

[00128] В некоторых вариантах осуществления целевой локус гена представляет собой локус гена иммунной передачи сигнала, выбранный из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, RFXANK, СИТА, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1I/ULBP1, RAET1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3 и других лигандов NKG2D. В некоторых вариантах осуществления целевой локус гена представляет собой локус гена иммунного сигналинга, выбранный из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D и HLA-E. В некоторых вариантах осуществления целевой локус гена представляет собой локус «безопасная гавань», выбранный из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5.

[00129] В данном документе описана выделенная клетка или ее популяция, содержащая любую из описанных конструкций, где конструкция интегрирована в эндогенный целевой ген для нарушения экспрессии целевого гена в выделенной клетке. В данном документе описана выделенная клетка или ее популяция, при этом выделенная клетка неспособна экспрессировать основной клеточный фактор из эндогенных локусов.

[00130] В некоторых вариантах осуществления конструкция интегрирована в целевой ген в целевом сайте нуклеазы или транспозазы. В некоторых вариантах осуществления один аллель целевого гена нарушен в результате воздействия нуклеазы или транспозазы. В некоторых вариантах оба аллеля целевого гена нарушены в результате воздействия нуклеазы или транспозазы. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную человеческую клетку, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА, B2M и/или NLRC5. В некоторых вариантах

осуществления выделенная клетка представляет собой гипоиммуногенную и стволовую клетку. В некоторых случаях стволовая клетка выбрана из группы, состоящей из эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[00131] В одном из аспектов в данном документе предложена дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования описанной стволовой клетки в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток. В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции. В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения пациента, включающий активацию защитного переключателя у пациента, которому ранее вводили дифференцированные клетки или их популяцию.

[00132] В данном документе предложена выделенная клетка или ее популяция, содержащая ген основного клеточного фактора, функционально связанный с последовательностью, кодирующей линкер, который функционально связан с трансгеном защитного переключателя.

[00133] В некоторых вариантах осуществления основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы и белка субъединицы сплайсосомы. В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

[00134] В некоторых вариантах осуществления трансген защитного переключателя выбран из группы, состоящей из гена HSVtk, гена цитозиндезаминазы, гена нитроредуктазы, гена пуриннуклеозидфосфорилазы, гена пероксидазы хрена, гена iCaspase9, трансгена HER1, трансгена RQR8, трансгена CD20, трансгена CCR4, трансгена HER2, трансгена CD19, трансгена MUC1, трансгена EGFR, трансгена GD2, трансгена PSMA, трансгена CD30 и трансгена CD16.

[00135] В одном из аспектов в данном документе предложен слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа, содержащий: (1) фактор гипоиммунитета, выбранный из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, Mfge8 и их мембраносвязанных форм; и (2) экспонированный на поверхности пептидный эпитоп, гетерологичный фактору гипоиммунитета, выбранный из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

[00136] В некоторых аспектах в данном документе предложена конструкция, кодирующая слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа, содержащая: (1)

последовательность, кодирующую фактор гипоиммунитета, выбранный из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL -10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, Mfge8 и их мембраносвязанных форм; и (2) последовательность, кодирующую экспонированный на поверхности пептидный эпитоп, гетерологичный фактору гипоиммунитета, выбранный из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

[00137] В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутузумаба, ублитуксимаба, окаратузумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотузумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томузотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RLic и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2xCD16 и их биоаналогов.

[00138] В некоторых вариантах реализации фактор гипоиммунитета и/или пептидный эпитоп находится на N-конце слитого белка.

[00139] В некоторых вариантах осуществления белок дополнительно содержит линкер, соединяющий фактор гипоиммунитета и пептидный эпитоп и/или расположенный на N-конце или С-конце слитого белка. В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

[00140] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая фактор гипоиммунитета конструкции, расположена на 5'-конце последовательности, кодирующей пептидный эпитоп, и/или последовательность, кодирующая пептидный эпитоп, расположена на 5'-конце последовательности, кодирующей фактор гипоиммунитета.

[00141] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкер, соединяющий последовательность, кодирующую фактор гипоиммунитета, и последовательность, кодирующую пептидный эпитоп, и/или расположенный на N-конце или С-конце слитого белка. В некоторых

вариантах осуществления линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

[00142] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит элемент регуляции транскрипции, выбранный из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит первое плечо гомологии и второе плечо гомологии, гомологичные целевому локусу гена, для гомологичной репарации на основе CRISPR. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00143] Также предложен способ доставки конструкции в выделенную клетку, включающий трансдукцию выделенной клетки лентивирусной конструкцией, содержащей конструкцию, описанную в данном документе; и отбор сконструированной клетки, экспрессирующей слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа. В некоторых вариантах осуществления предложен способ, включающий трансдукцию выделенной клетки любой из описанных конструкций и отбор выделенной клетки, которая экспрессирует слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа, кодируемый этой конструкцией.

[00144] Также предложена выделенная клетка или ее популяция, содержащая конструкцию, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную человеческую клетку, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СПТА, B2M и/или NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка является гипоиммуногенной и представляет собой стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка выбрана из группы, состоящей из эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[00145] Кроме того, в данном документе описана дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования описанной стволовой клетки в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почки, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00146] В некоторых случаях предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту описанных дифференцированных клеток или их популяции. В некоторых случаях предложен способ лечения пациента,

включающий введение пациенту, которому ранее вводили дифференцированную клетку или ее популяцию, антитела, которое связывает пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления антитело опосредует АЗКЦ или КЗЦ.

[00147] В некоторых аспектах описан слитый белок рекомбинантный CD47-внутренний пептидный эпитоп, содержащий от N- к С-концу: (1) фрагмент CD47 человека, содержащий домен IgV CD47; (2) первый линкер; (3) гетерологичный пептидный эпитоп; (4) второй линкер; и (5) трансмембранный домен CD47 человека.

[00148] В некоторых вариантах осуществления фрагмент CD47 человека, содержащий домен IgV, содержит аминокислотные остатки 1-127 белка CD47 человека. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD47 человека содержит аминокислотные остатки 128-348 белка CD47 человека. В некоторых вариантах осуществления первый и второй линкеры выбраны из любого из линкеров, представленных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30. В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутузумаба, ублитуксимаба, окаратузумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотузумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томизотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RL1c и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

[00149] В еще одном аспекте описана конструкция, содержащая от 5'- к 3'-концу: (1) элемент регуляции транскрипции; (2) последовательность, кодирующую фрагмент CD47 человека, содержащий домен IgV CD47; (3) первый линкер; (4) последовательность, кодирующую пептидный эпитоп; (5) второй линкер; и (6) последовательность, кодирующую фрагмент CD47 человека, содержащий трансмембранный домен и С-конец.

[00150] В некоторых вариантах осуществления фрагмент CD47 человека, содержащий домен IgV, содержит аминокислотные остатки 1-127 белка CD47 человека. В

некоторых вариантах осуществления фрагмент CD47 человека, содержащий трансмембранный домен и С-конец, содержит аминокислотные остатки 128-348 белка CD47 человека. В некоторых вариантах осуществления первый и второй линкеры выбраны из любых линкеров, представленных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления пептидный эпитоп, кодируемый последовательностью (4) конструкции, выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30. В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутумаба, ублитуксимаба, окаратумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томузотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RL1c и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

[00151] В некоторых вариантах осуществления элемент регуляции транскрипции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[00152] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит первое плечо гомологии и второе плечо гомологии, гомологичные целевому локусу гена, для гомологичной репарации на основе CRISPR. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00153] Предложен способ доставки конструкции в выделенную клетку, включающий трансдукцию выделенной клетки лентивирусной конструкцией, содержащей конструкцию; и отбор сконструированной клетки, экспрессирующей слитый белок CD47-внутренний пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления способ включает трансдукцию выделенной клетки любой из описанных конструкций и отбор выделенной клетки, которая экспрессирует слитый белок CD47-внутренний пептидный эпитоп,

кодируемый этой конструкцией. Также предложена выделенная клетка или ее популяция, содержащая конструкцию.

[00154] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную сконструированную человеческую клетку, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СРТА, В2М и/или NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой гипоиммуногенную и стволовую клетку. В некоторых случаях стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку и взрослую стволовую клетку.

[00155] Кроме того, в данном документе описана дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования описанной стволовой клетки в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00156] В некоторых случаях предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту описанных дифференцированных клеток или их популяции. В некоторых случаях предложен способ лечения пациента, которому ранее вводили дифференцированную клетку или ее популяцию, включающий введение пациенту антитела, которое связывает пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления антитело опосредует АЗКЦ или КЗЦ.

[00157] В одном аспекте предложена конструкция, содержащая (1) элемент регуляции транскрипции, (2) ген основного клеточного фактора, (3) посттранскрипционный или посттрансляционный регуляторный элемент и (4) последовательность полиаденилирования.

[00158] В некоторых вариантах осуществления основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы и белка субъединицы сплайсосомы.

[00159] В некоторых вариантах осуществления элемент регуляции транскрипции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC. В некоторых вариантах осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент представляет собой систему регуляции РНК, выбранную из группы, состоящей из индуцируемой кшРНК, индуцируемой киРНК, интерференции CRISPR (CRISPRi) и РНК-нацеленной нуклеазной

системы. В некоторых вариантах осуществления посттрансляционная регуляторный элемент представляет собой систему индуцируемой деградации белка, выбранную из группы, состоящей из системы отключения с помощью малых молекул (SMASH), индуцируемого Shield-1 дегрона, индуцируемого ауксином дегрона, индуцируемого IMid дегрона, пептидного дегрона, протеолиз-таргетированной химеры, и антитела для направленной деградации.

[00160] Также предложена выделенная клетка, содержащая рекомбинантный основной клеточный фактор, находящийся под контролем посттранскрипционного или посттрансляционного регуляторного элемента, где ген эндогенного основного клеточного фактора инактивирован, а экспрессия рекомбинантного основного клеточного фактора контролируется экзогенным фактором. В некоторых вариантах осуществления основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы и белка субъединицы сплайсосомы. В некоторых вариантах осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент представляет собой систему регуляции РНК, выбранную из группы, состоящей из индуцируемой кшРНК, индуцируемой киРНК, интерференции CRISPR (CRISPRi) и РНК-нацеленной нуклеазной системы. В некоторых вариантах осуществления посттрансляционная регуляторный элемент представляет собой систему индуцируемой деградации белка, выбранную из группы, состоящей из системы отключения с помощью малых молекул (SMASH), индуцируемого Shield-1 дегрона, индуцируемого ауксином дегрона, индуцируемого IMid дегрона, пептидного дегрона, протеолиз-таргетированной химеры, и антитела для направленной деградации. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой аутологичную человеческую клетку или аллогенную человеческую клетку.

[00161] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную сконструированную человеческую клетку, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СПТА, B2M и/или NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка является гипоиммуногенной и выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки и дифференцированной клетки.

[00162] В еще одном аспекте в данном документе предложена бицистронная конструкция, содержащая от 5'- к 3'-концу: (1) элемент регуляции транскрипции; (2) последовательность, кодирующую экспонированный на поверхности пептидный эпитоп; (3) последовательность проскока рибосом; и (4) последовательность, кодирующую фактор гипоиммунитета. В некоторых вариантах осуществления фактор гипоиммунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи

HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, Mfge8 и их мембраносвязанных форм. В некоторых вариантах осуществления экспонированный на поверхности пептидный эпитоп, кодируемый последовательностью (2) конструкции, выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30. В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутумаба, ублитуксимаба, окаратумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томузотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RL1c и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

[00163] В некоторых вариантах осуществления последовательность пропуска рибосом включает последовательность, кодирующую последовательность IRES, или последовательность, кодирующую 2A-кодирующую последовательность.

[00164] В некоторых вариантах осуществления элемент регуляции транскрипции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[00165] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит первое плечо гомологии и второе плечо гомологии, гомологичные целевому локусу гена, для гомологичной репарации на основе CRISPR. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00166] В некоторых вариантах осуществления описан способ доставки конструкции в выделенную клетку, включающий трансдукцию выделенной клетки лентивирусной конструкцией, содержащей описанную конструкцию; и отбор сконструированной клетки, экспрессирующей фактор гиподимунитета и пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления способ включает трансдукцию

выделенной клетки описанной конструкцией; и отбор выделенной клетки, экспрессирующей фактор гипоиммунитета и пептидный эпитоп, кодируемые этой конструкцией. Также предложена выделенная клетка или ее популяция, содержащая описанную конструкцию.

[00167] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную сконструированную человеческую клетку, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА, В2М и/или NLRC5.

[00168] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка является гипоиммуногенной и стволовой клеткой. В некоторых случаях стволовая клетка выбрана из группы, состоящей из эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки. В некоторых вариантах осуществления предложена дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования описанной стволовой клетки в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток. В некоторых случаях предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции. В некоторых случаях предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции. В некоторых случаях антитело опосредует АЗКЦ или КЗЦ.

[00169] В одном аспекте предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, (ii) трансген защитного переключателя и (iii) ген гипоиммунитета, при этом экспрессия трансгена защитного переключателя модулирует экспрессию гена гипоиммунитета.

[00170] В другом аспекте предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию В2М и СИТА, (ii) сверхэкспрессию CD47, (iii) трансген защитного переключателя и (iv) ген гипоиммунитета, где экспрессия трансгена защитного переключателя модулирует экспрессию гена гипоиммунитета.

[00171] В еще одном аспекте предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, (ii) защитный переключатель и (iii) фактор гипоиммунитета, при этом экспрессия защитного переключателя модулирует экспрессию фактора гипоиммунитета.

[00172] В еще одном аспекте предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, (ii) сверхэкспрессию CD47, (iii) защитный переключатель и (iv) фактор гипоиимунитета, при этом экспрессия защитного переключателя модулирует экспрессию фактора гипоиимунитета.

[00173] В одном аспекте предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II и (ii) фактор гипоиимунитета, связанный с экспонированным на поверхности пептидным эпитопом; при этом пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30, а фактор гипоиимунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, Mfge8 и их мембраносвязанных форм.

[00174] В одном аспекте предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) фактор гипоиимунитета, связанный с экспонированным на поверхности пептидным эпитопом; при этом пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30, а фактор гипоиимунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, Mfge8 и их мембраносвязанных форм.

[00175] В одном аспекте предложена конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) трансген защитного переключателя; (2) последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; и (3) ген основного клеточного фактора. В некоторых аспектах предложена конструкция, содержащая от 5'- к 3'-концу: (1) ген основного клеточного фактора; (2) последовательность проскока рибосом или линкер; и (3) трансген защитного переключателя.

[00176] В некоторых вариантах осуществления трансген защитного переключателя выбран из группы, состоящей из гена HSVtk, гена цитозиндезаминазы, гена нитроредуктазы, гена пуриннуклеозидфосфорилазы, гена пероксидазы хрена, гена iCaspase9, трансгена HER1, трансгена RQR8, трансгена CD20, трансгена CCR4, трансгена HER2, трансгена CD19, трансгена MUC1, трансгена EGFR, трансгена GD2, трансгена PSMA, трансгена CD16 и трансгена CD30.

[00177] В некоторых вариантах осуществления последовательность пропуска рибосом включает последовательность, кодирующую последовательность IRES, или последовательность, кодирующую 2A-кодирующую последовательность.

[00178] В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

[00179] В некоторых вариантах осуществления ген гипоиимунитета выбран из

группы, состоящей из: CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, и Mfge8.

[00180] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит элемент регуляции транскрипции, функционально связанный с трансгеном защитного переключателя, и последовательность полиаденилирования на 3'-конце гена гипоииммунитета, или элемент регуляции транскрипции, функционально связанный с геном гипоииммунитета, и последовательностью полиаденилирования на 3'-конце трансгена защитного переключателя.

[00181] В некоторых вариантах осуществления элемент регуляции транскрипции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[00182] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00183] Описан способ доставки конструкции в выделенную клетку, включающий трансдукцию выделенной клетки лентивирусной конструкцией, содержащей описанную конструкцию; и выбор сконструированной клетки, несущей трансген защитного переключателя и ген гипоииммунитета. В некоторых вариантах осуществления предложен способ, включающий трансдукцию выделенной клетки описанной конструкцией (например, лентивирусной конструкцией); и отбор выделенной клетки, несущей трансген защитного переключателя и ген гипоииммунитета конструкции. Также предложена выделенная клетка или ее популяция, содержащая любую из описанных конструкций.

[00184] В некоторых вариантах осуществления конструкция была введена в целевой локус гена. В некоторых вариантах осуществления целевой локус гена выбран из группы, состоящей из локуса «безопасная гавань», выбранного из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5, и локуса гена иммунного сигналинга, выбранного из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, RFXANK, CITA, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1/ULBP1, RAET1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3 и других лигандов NKG2D.

[00185] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой сконструированную человеческую клетку, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию CITA, B2M и/или NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой гипоииммуногенную и стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка выбрана из эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной

плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[00186] В другом аспекте описана дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования любой стволовой клетки в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00187] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту описанных дифференцированных клеток или их популяции. В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения пациента, которому ранее вводили описанные дифференцированные клетки или их популяцию, включающий активацию защитного переключателя у пациента.

[00188] В еще одном аспекте предложен слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа, содержащий: (1) основной клеточный фактор; и (2) экспонированный на поверхности пептидный эпитоп, гетерологичный основному клеточному фактору.

[00189] В некоторых вариантах осуществления основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы, белка субъединицы сплайсосомы и их мембраносвязанных форм.

[00190] В некоторых вариантах осуществления пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

[00191] В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутумаба, ублитуксимаба, окаратумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томизотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RLic и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его

биоаналогов, или эпитоп CD20 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

[00192] В некоторых вариантах осуществления основной клеточный фактор находится на N-конце слитого белка. В некоторых вариантах осуществления пептидный эпитоп находится на N-конце слитого белка. В некоторых вариантах осуществления белок дополнительно содержит линкер, соединяющий основной клеточный фактор и пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления белок дополнительно содержит линкер, расположенный на N-конце пептидного эпитопа. В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

[00193] В еще одном аспекте предложена конструкция, кодирующая слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа, содержащая: (1) последовательность, кодирующую основной клеточный фактор; и (2) последовательность, кодирующую экспонированный на поверхности пептидный эпитоп, гетерологичный основному клеточному фактору.

[00194] В некоторых вариантах осуществления основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы, белка субъединицы сплайсосомы и их мембраносвязанных форм. В некоторых вариантах осуществления пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30. В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутузумаба, ублитуксимаба, окаратузумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотузумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томизотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RL1c и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

[00195] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая основной клеточный фактор, расположена на 5'-конце последовательности, кодирующей

пептидный эпитоп.

[00196] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая пептидный эпитоп, находится в 5'-конце последовательности, кодирующей основной клеточный фактор.

[00197] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкер, соединяющий последовательность, кодирующую основной клеточный фактор, и последовательность, кодирующую пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкер, расположенный на N-конце или C-конце слитого белка. В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит элемент регуляции транскрипции, выбранный из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[00198] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит первое плечо гомологии и второе плечо гомологии, гомологичные целевому локусу гена, для гомологичной репарации на основе CRISPR. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00199] В некоторых вариантах осуществления описан способ доставки конструкции в выделенную клетку, включающий трансдукцию выделенной клетки лентивирусной конструкцией, содержащей описанную конструкцию; и отбор сконструированной клетки, экспрессирующей слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа. В других вариантах осуществления способ включает трансдукцию выделенной клетки описанной лентивирусной конструкцией; и отбор выделенной клетки, экспрессирующей слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа в конструкции. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка или ее популяция содержат упомянутую в данном документе конструкцию.

[00200] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную сконструированную человеческую клетку, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СПТА, B2M и/или NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой гипоиммуногенную и стволовую клетку. В некоторых случаях стволовая клетка выбрана из группы, состоящей из эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[00201] В некоторых вариантах осуществления предложена дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования описанной стволовой клетки в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток. В некоторых случаях предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции. В некоторых случаях предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции. В некоторых случаях антитело опосредует АЗКЦ или КЗЦ.

[00202] Предложена конструкция для гомологичной репарации в локусе «безопасная гавань», содержащая от 5'- к 3'- концу: (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань»; (2) элемент регуляции транскрипции; (3) трансген защитного переключателя HSVtk; (4) последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; (5) ген гипои́ммунитета CD47; (6) последовательность полиаденилирования; и (7) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань». Предложена конструкция для гомологичной репарации в локусе «безопасная гавань», содержащая от 5'- к 3'-концу: (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга; (2) элемент регуляции транскрипции; (3) трансген защитного переключателя HSVtk; (4) последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; (5) ген гипои́ммунитета CD47; (6) последовательность полиаденилирования; и (7) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга.

[00203] В некоторых вариантах осуществления элемент регуляции транскрипции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00204] Предложена выделенная клетка или ее популяция, содержащая трансген защитного переключателя и ген гипои́ммунитета, интегрированный в локус «безопасная гавань» или локус гена иммунного сигналинга, где конструкция, описанная в данном документе, рекомбинировала в эндогенный локус «безопасная гавань» выделенной клетки или в эндогенный целевой локус гена выделенной клетки.

[00205] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных

антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СПТА, В2М и/или NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой гипоиммуногенную и стволовую клетку. В некоторых случаях стволовая клетка выбрана из группы, состоящей из эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[00206] В данном документе предложена дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования описанной стволовой клетки в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки любой из стволовых клеток в клетки поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления клетки поджелудочной железы представляют собой бета-инсулоциты.

[00207] Описан способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту описанных дифференцированных клеток или их популяции и активацию защитного переключателя у пациента, которому ранее вводили дифференцированные клетки или их популяцию, как описано.

[00208] Подробные описания гипоиммуногенных клеток, способов их получения и способов их применения можно найти в WO 2016183041, поданной 9 мая 2015 г., и WO 2018132783, поданной 14 января 2018 г., описания которых, включая перечни последовательностей и графические материалы, полностью включены в данный документ посредством ссылки.

[00209] Другие объекты, преимущества и варианты воплощения настоящей технологии будут очевидны из нижеследующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00210] На Фиг. 1 представлены данные для линии клеток НЕК293, сконструированной для экспрессии мышиного CD47, демонстрирующие различную эффективность нокдауна различных конструкций кшПНК. Снижение экспрессии экзогенного CD47 происходило посредством индуцируемой кшПНК, контролируемой системой Teto

[00211] На Фиг. 2 представлена схематическая диаграмма системы отключения с помощью малых молекул (SMASH) (см. Hannah et al., Nature Chemical Biology 11637-638 (2015)) для индуцирования деградации CD47. SMASH представляет собой систему, в которой используется протеаза неструктурного белка 3 (NS3) вируса гепатита С (HCV) и элементы белка NS4A для эффективного отключения экспрессии белка CD47, слитого со SMASH-меткой, с помощью клинически протестированных ингибиторов протеазы HCV. В отсутствие ингибитора протеазы (асунапревир) вырезается скрытая последовательность дегрона, что приводит к немодифицированному генному продукту. При добавлении асунапревира протеаза NS3 ингибируется, что приводит к деградации вновь синтезированных белков CD47, слитых с последовательностью дегрона.

[00212] На Фиг. 3А-3В представлены схематические диаграммы донорной матрицы

для гомологичной репарации (HDR) в геномном локусе «безопасная гавань» AAVS1. На Фиг. 2А показана кассета, содержащая основной промотор EF1a (EFS) и метку SMASH, слитую с геном CD47 человека и вставленную между двумя плечами гомологии длиной 1000 п.н. в геномный локус «безопасная гавань» AAVS1, далее называемую донорной матрицей AAVS1-EFS-SMASH-CD47-AAVS1. На Фиг. 2В показано, что сверхэкспрессия CD47 достигается путем нокина кассеты AAVS1-EFS-SMASH-CD47-AAVS1 в геномном локусе «безопасная гавань» AAVS1.

[00213] На Фиг. 4 представлено краткое изложение результатов исследования по оценке способности системы SMASH стимулировать деградацию CD47. (Вверху) схематическая диаграмма экспрессионной конструкции, включающей экспрессионную кассету EFS-SMASH-CD47. Эта экспрессионная конструкция включает основной промотор EF1a (EFS), функционально связанный с геном CD47 человека, слитым с нуклеиновой кислотой, кодирующей метку SMASH. (Внизу) иПСК, трансдуцированные экспрессионной кассетой EFS-SMASH-CD47 или контрольной экспрессионной кассетой EFS-CD47, оценивали на экспрессию CD47 в присутствии различных концентраций асунапревира в течение 48 часов.

[00214] На Фиг. 5 представлена схематическая диаграмма системы индуцируемой лигандом деградации (LID) для индукции деградации CD47 (см. Bonger et al., Nat Chem Biol. 7(8):531-537 (2012)). В системе LID представляющий интерес белок (POI, например, CD47) сливают с доменом LID. Домен LID включает белок, связывающий FK506 и рапамицин, (FKBP) и пептид дегрон, слитый с С-концом FKBP. FKBP представляет собой фермент, обладающий цис/транс-пролизомеразной активностью и способный воздействовать на широкий спектр полипептидов-субстратов. Пептид дегрон способен связываться с активным центром FKBP и не обнаруживается белками клеточной деградации, когда он секвестрирован в активном сайте, что делает его скрытым дегроном. В отсутствие малой молекулы Shield-1 слитый белок POI-LID стабилен. Однако в присутствии Shield-1, Shield-1 прочно связывается с FKBP, тем самым замещая пептид дегрон и вызывая быструю деградацию LID и любого слитого белка-партнера (например, CD47).

[00215] На Фиг. 6 представлено краткое изложение результатов исследования по оценке способности системы LID стимулировать деградацию CD47. (Вверху) схематическая диаграмма экспрессионной конструкции, включающей экспрессионную кассету EFS-CD47-LID, используемую в исследовании. Эта экспрессионная конструкция включает основной промотор EF1a (EFS), функционально связанный с геном CD47 человека, слитым с нуклеиновой кислотой, кодирующей домен LID. (Внизу) краткое изложение эксперимента, в котором иПСК трансдуцировали либо экспрессионной кассетой EFS-CD47-LID, либо контрольной экспрессионной кассетой EFS-CD47 оценивали на экспрессию CD47 в присутствии различных концентраций Shield-1 в течение 24 часов.

[00216] На Фиг. 7 представлена схема гипоиммунной клетки с активированным

защитным переключателем, так что полученная клетка, которая больше не экспрессирует фактор гипои́мунитета, распознается иммунными клетками и уничтожается иммунной системой

[00217] На Фиг. 8А-Фиг. 8D схематично показано, что гипои́мунные клетки могут быть сконструированы так, чтобы они были гипои́мунными при модификации путем нацеливания на клетки (Фиг. 8А), регуляции белков (Фиг. 8В), регуляции РНК (Фиг. 8С) и регуляции ДНК (Фиг. 8D). Регуляция белков, регуляция РНК и регуляция ДНК могут быть индуцируемыми, что приводит к образованию индуцируемых гипои́мунных клеток.

[00218] На Фиг. 9 схематично показано, что экспрессия иммуносупрессивных факторов контролируется регулируемой деградацией или нокдауном. См., например, Liang, Qin, et al. «Linking a cell-division gene and a suicide gene to define and improve cell therapy safety.» *Nature* 563.7733 (2018): 701.

[00219] На Фиг. 10 показано, что клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, содержащим индуцируемую кшРНК, нацеленную на экзогенный CD47, и при MOI выше 0,3 демонстрировали эффективный нокдаун CD47.

[00220] На Фиг. 11 показана архитектура взаимозависимых конструкций «защитный переключатель-гипои́мунная молекула». Коэкспрессия защитного переключателя и гипои́мунной молекулы достигается посредством экспрессии полицистронного транскрипта, при этом гипои́мунная молекула и защитный переключатель разделены последовательностью проскока рибосом, такой как IRES, или саморасщепляющимся пептидом 2А. Экспрессия кассеты регулируется промотором для регуляции транскрипции, независимой от расположения в геноме, или акцептором сплайсинга, позволяющим регулировать полезную нагрузку эндогенным промотором после направленной интеграции.

[00221] На Фиг. 12 схематически показана направленная геномная интеграция слитой конструкции CD47-HSVtk в локус В2М для одновременного нарушения В2М и экспрессии кассеты защитного переключателя. HSVtk и CD47 генетически связаны внутри полицистронной кассеты через саморасщепляющийся пептид Р2А. Кассета будет окружена плечами гомологии, комплементарными локусу В2М, что позволит интегрировать кассету посредством Cas9-индуцированной HDR.

[00222] На Фиг. 13 схематически показана замена основного гена гибридом синтетического основного гена и защитного переключателя. Связывание экспрессии переключателя безопасности с экспрессией основного гена обеспечивает экспрессию переключателя в жизнеспособных клетках. Чтобы напрямую связать экспрессию основного гена с защитным переключателем, не завися от генных продуктов основного эндогенного локуса, кДНК основного гена («Синтетический_основной_ген») помещают в кассету и сливают с защитным переключателем. Чтобы обеспечить присутствия кассеты и поставить ее под надлежащую регуляцию транскрипции, кассета содержит последовательность акцептора сплайсинга 2А для использования эндогенного промотора и содержит плечи гомологии с локусом основного гена, облегчающим интеграцию в

локус. Благодаря Cas9-онРНК, нацеленной на локус основного гена, Cas9-индуцированная HDR позволяет одновременно нарушать генный продукт локуса и интегрировать кассету, эффективно заменяя нативный ген.

[00223] На Фиг. 14 схематически показана архитектура защитного переключателя, зависящего от аминоконца CD47-АЗКЦ/КЗЦ. АЗКЦ и КЗЦ функционируют посредством распознавания эффекторными клетками иммунной системы антитела, связанного с внеклеточной поверхностью клетки. Экспрессия эпитопа, с которым связывается антитело, достаточна для активации АЗКЦ/КЗЦ и может служить защитным переключателем. Генетическое слияние эпитопа с гипоиммунной молекулой, такой как CD47, обеспечивает надежность в отношении элиминации сконструированных гипоиммунных клеток. Пептидные эпитопы, такие как фрагмент CD20, распознаваемый ритуксимабом, могут быть связаны с внеклеточными гипоиммунными молекулами, такими как CD47. В частности, N-концевое слияние эпитопа CD20 с CD47 стерически позволяет эпитопу связываться с ритуксимабом без нарушения функции CD47. Этот же дизайн может быть применен к другим гипоиммунным молекулам.

[00224] На Фиг. 15 схематически показана архитектура варианта CD47, содержащего внутренний эпитоп CD20. Эпитоп CD20 может быть вставлен непосредственно в CD47 ниже домена IgV, чтобы поместить эпитоп между доменом IgV и трансмембранным доменом. Размещение эпитопа CD20 ниже домена IgV делает интактной четвертичную структуру IgV.

[00225] На Фиг. 16 представлено краткое изложение исследования по оценке способности переключателя цитозиндезаминазы индуцировать гибель клеток зависимым от иммунной системы образом. (Вверху) схематическая диаграмма бицистронной кассеты EFS-цитозиндезаминазы (CD)-CD47, используемой в исследовании. В этой кассете нуклеиновая кислота, кодирующая CD, расположена перед нуклеиновой кислотой, кодирующей CD47. Последовательность A2A вставляется между нуклеиновыми кислотами CD и CD47, чтобы обеспечить разделение двух белков после трансляции. Промотор EFS дополнительно включен в кассету для экспрессии двух белков. (Средняя диаграмма) Диаграмма, демонстрирующая жизнеспособность трансдуцированных EFS-CD-CD47 клеток и трансдуцированных EFS-CD клеток («CD»; только «суицидальный» ген, контроль для трансдуцированных EFS-CD-CD47 клеток) в присутствии различных концентраций 5-фторцитозина (5-FC). На (нижней диаграмме) сравнивается экспрессия CD47 в трансдуцированных EFS-CD-CD47 клетках и клетках CD с помощью проточной цитометрии.

[00226] На Фиг. 17 представлена схематическая диаграмма, изображающая компоненты и архитектуру кассет ДНК, кодирующих защитные переключатели или молекулы основных клеточных факторов соответственно или в виде комбинированной полезной нагрузки. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка относится к защитному переключателю, связанному с основным клеточным фактором. Гетерологичные гены, несущие кДНК для защитных переключателей и основных

клеточных факторов, содержат несколько компонентов: последовательность регуляции транскрипции, такую как универсальный промотор или акцептор сплайсинга, открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую защитный переключатель или основной клеточный фактор, последовательность полиаденилирования и посттранскрипционные или посттрансляционные регуляторные элементы на amino- или карбокси-конце основного гена или полезной нагрузки. Примечательно, что примерами регуляторных элементов могут быть рибопереклюкатели для контроля трансляции или химически дестабилизируемые мотивы дедрона, которые существуют в виде слитого белка с полезной нагрузкой.

[00227] На Фиг. 18 представлена схематическая диаграмма, иллюстрирующая архитектуру взаимозависимых конструкций основной клеточный фактор - защитный переключатель. Совместная экспрессия молекулы защитного переключателя и основного клеточного фактора достигается посредством экспрессии полицистронного транскрипта, посредством чего важный клеточный фактор и защитный переключатель разделены последовательностью проскока рибосом, такой как IRES, или саморасщепляющимся пептидом 2A. Экспрессия кассеты регулируется промотором для регуляции транскрипции, независимой от расположения в геноме, или акцептором сплайсинга, позволяющим регулировать полезную нагрузку эндогенным промотором после направленной интеграции.

[00228] На Фиг. 19 представлена схематическая диаграмма, иллюстрирующая интеграцию защитного переключателя в эндогенный основной локус для обеспечения экспрессии защитного переключателя - организацию локуса после нацеливания. Защитный переключатель встроен в С-конец основного гена, такого как рибосомный или протеасомный ген, для обеспечения экспрессии защитного переключателя. Выше переключателя находится линкерная последовательность, которая кодирует iRES или 2A, чтобы обеспечить надлежащее разделение защитного переключателя и основных белковых продуктов гена. Стоп-кодон перемещается ниже защитного выключателя.

[00229] На Фиг. 20 представлена схематическая диаграмма, иллюстрирующая направленную интеграцию полезной нагрузки (например, защитного переключателя и основного гена) для совместной экспрессии защитного переключателя и необходимого гена в локусах «безопасная гавань». Донорные ДНК, кодирующие полезные нагрузки безопасного переключателя, как описано выше, интегрируются в локус «безопасная гавань», такой как AAVS1, посредством направленной нуклеазной активности, такой как комплекс Cas9 *S. pyogenes* -онРНК. Интеграция происходит посредством гомологичной репарации (HDR). В некоторых вариантах осуществления основной ген нокаутирован в его эндогенном локусе.

[00230] На Фиг. 21 представлена схематическая диаграмма, иллюстрирующая одновременное нарушение иммунорелевантного локуса и введение основного клеточного фактора или защитного переключателя. Нарушение иммунно-релевантного локуса, такого как B2M, происходит посредством индуцированной Cas9 HDR, который включает

кассету, кодирующую защитный переключатель или кассету основного клеточного фактора. Включение кассеты выводит продукт эндогенного гена за пределы рамки и приводит к экспрессии кассеты. Экспрессия кассеты обеспечивается промотором внутри кассеты или эндогенным промотором за счет использования последовательности акцептор сплайсинга 2А.

[00231] На Фиг. 22 представлена схематическая диаграмма, иллюстрирующая интеграцию защитного переключателя или кассеты основного клеточного фактора в карбокси-конец основного гена. Как показано на Фиг. 3, кассеты, кодирующие защитные переключатели, связанные с основными клеточными факторами, сконструированы таким образом, чтобы содержать два плеча гомологии, нацеленных на экзогенную ДНК для вставки на карбокси-конец основного гена. Интеграция происходит посредством HDR, опосредованной Cas9-индуцированной репарацией ДНК.

[00232] На Фиг. 23 представлена схематическая диаграмма, иллюстрирующая целенаправленную, независимую от гомологии интеграцию защитных переключателей или основных клеточных факторов. Донорные ДНК, кодирующие полезные нагрузки защитный переключатель и основной клеточный фактор, не имеющие плеч гомологии, упакованы в виде лентивирусных геномов или транспозонов, что облегчает интеграцию посредством независимых от гомологии процессов репарации ДНК. Лигирование экзогенной ДНК происходит в целевых последовательностях РНК-направляемой нуклеазы или транспозазы, а экспрессия кассеты регулируется эндогенным промотором с использованием последовательностей акцептора сплайсинга 2А.

[00233] На Фиг. 24 представлена схематическая диаграмма, иллюстрирующая направленное генетическое нарушение основного локуса гена посредством нуклеазной активности. РНК-направляемые нуклеазы, такие как Cas9, нацелены на локус PSMA3 или другие представляющие интерес локусы, чтобы облегчить введение мутации со сдвигом рамки считывания, которая нарушает правильную транскрипцию или трансляцию белкового продукта. В некоторых вариантах осуществления (таких как доставка конструкции защитного переключателя безопасности и коэкспрессии в локус «безопасная гавань», локус гена иммунного сигналинга или использование лентивирусной интеграции) функция этого переключателя требует инактивации всех копий основного гена в эндогенном локусе, так что выживаемость сконструированной клетки зависит от экспрессии основного гена из локуса «безопасная гавань». На нижней панели показана стратегия инактивации эндогенного локуса с использованием CRISPR для внесения двухцепочечных разрывов. Репарация этих разрывов с помощью NHEJ или MMEJ приводит к инсерциям или делециям, которые инактивируют основной ген в эндогенном локусе.

[00234] На Фиг. 25 представлена схематическая диаграмма, иллюстрирующая интеграцию посттранскрипционного или посттрансляционного регуляторного элемента на амино- или карбокси-конец основного гена. Эта конструкция действует как защитный выключатель, обеспечивая экзогенный контроль над экспрессией основного гена.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. ВВЕДЕНИЕ

[00235] Гипоиммунные плюрипотентные стволовые клетки (также называемые в данном документе «клетками НР») и их дифференцированные клетки, которые были сконструированы таким образом, чтобы экспрессировать иммунорегуляторные белки и избегать отторжения иммунной системой хозяина, имеют большие перспективы для аллогенной клеточной терапии. Введение защитных переключателей для модуляции активности таких клеток при введении субъекту-реципиенту является важной технологией для повышения безопасности этих видов клеточной терапии. В данном документе описаны варианты осуществления защитного переключателя, основанного на регулировании экспрессии иммуносупрессивного фактора (например, фактора гипоиммунитета) в сконструированных клетках. В данном документе предложены способы регулирования экспрессии иммуносупрессивных факторов на уровне белка, РНК или ДНК и, таким образом, функционирования их в качестве защитного переключателя (например, системы условной или индуцируемой экспрессии) для клеток. Также предложены плюрипотентные стволовые клетки и их производные, содержащие модификацию для условной экспрессии иммуносупрессивного фактора, который реагирует на экзогенный сигнал, такой как низкомолекулярный или биологический агент.

[00236] Ключевой особенностью клеток НР является экспрессия иммуносупрессивных факторов, которые подавляют иммунный ответ клеток хозяина на трансплантированную клеточную популяцию. В одном варианте осуществления этот защитный переключатель основан на контролируемой экспрессии CD47. CD47 является компонентом врожденной иммунной системы, который действует как сигнал «не ешь меня» во врожденной иммунной системе для блокирования фагоцитоза макрофагами. В других вариантах осуществления этот защитный переключатель

[00237] В данном документе предложены условные или индуцируемые гипоиммуногенные клетки (например, условные гипоиммуногенные плюрипотентные клетки), которые представляют собой жизнеспособный источник для любого типа трансплантируемых клеток. Такие клетки защищены от адаптивного и врожденного иммунного отторжения при введении субъекту-реципиенту посредством условной экспрессии одного или более факторов иммуногенности. Экспрессия таких факторов иммуногенности контролируется активностью системы условной экспрессии. Неограничивающие примеры системы условной экспрессии включают систему индуцируемой деградации белка, систему индуцируемой регуляции РНК и систему индуцируемой регуляции ДНК.

[00238] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки, описанные в данном документе, не подвергаются отторжению клетками врожденного иммунитета до индукции системы условной экспрессии. В некоторых случаях гипоиммуногенные клетки не восприимчивы к лизису, опосредованному НК-клетками, до индукции системы условной экспрессии. В некоторых случаях гипоиммуногенные клетки

не восприимчивы к поглощению макрофагами до индукции системы условной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки, описанные в данном документе, подвергаются отторжению клетками врожденного иммунитета при индукции системы условной экспрессии. В некоторых случаях гипоиммуногенные клетки восприимчивы к лизису, опосредованному NK-клетками, при индукции системы условной экспрессии. В некоторых случаях гипоиммуногенные клетки не восприимчивы к поглощению макрофагами при индукции системы условной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки можно использовать в качестве источника универсально совместимых клеток или тканей (например, универсальных донорских клеток или тканей), которые трансплантируют субъекту-реципиенту практически без потребности в иммунодепрессанте. Такие гипоиммуногенные клетки сохраняют клеточно-специфические характеристики и признаки при трансплантации.

[00239] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены стволовые клетки и/или их дифференцированные производные, которые условно избегают иммунного отторжения у несовместимого по МНС аллогенного реципиента. В некоторых случаях дифференцированные клетки, полученные из описанных в данном документе стволовых клеток, условно избегают иммунного отторжения при введении (например, при трансплантации или пересадке) несовместимому по МНС аллогенному реципиенту. Другими словами, стволовые клетки и/или дифференцированные клетки, полученные из таких стволовых клеток, являются гипоиммуногенными в отсутствие экзогенного фактора, который контролирует активность системы условной экспрессии, нацеленной на экзогенный фактор иммуногенности, экспрессируемый клетками. В присутствии экзогенного фактора экзогенный фактор иммуногенности подавляется или деградирует в соответствии с системой условной экспрессии. Таким образом, стволовые клетки и/или дифференцированные клетки, полученные из таких стволовых клеток, больше не являются гипоиммуногенными. В некоторых случаях клетки не обладают пониженной иммуногенностью (например, иммуногенность по меньшей мере на 2,5%-99% ниже) по сравнению с клетками дикого типа или несконструированными клетками. В некоторых случаях клетки обладают иммуногенностью. Другими словами, такие клетки становятся иммуногенными для субъекта-реципиента и, таким образом, очищаются и/или становятся мишенью для уничтожения клеток иммунной системой субъекта-реципиента

[00240] В некоторых вариантах осуществления стволовые клетки, описанные в данном документе, сохраняют потенциал плюрипотентных стволовых клеток и способность к дифференцировке.

II. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[00241] Используемый в данном документе термин «защитный переключатель» относится к системе контроля экспрессии представляющего интерес гена или белка, которая при подавлении или повышении экспрессии приводит к клиренсу или гибели клетки, например, посредством распознавания иммунной системой хозяина. Защитный переключатель может быть сконструирован таким образом, чтобы он активировался

экзогенной молекулой в случае нежелательного клинического явления. Защитный переключатель можно сконструировать, регулируя экспрессию на уровне ДНК, РНК и белка. Защитный переключатель включает белок или молекулу, которая позволяет контролировать клеточную активность в ответ на нежелательное явление. В одном варианте осуществления защитный переключатель представляет собой «аварийный переключатель», который экспрессируется в неактивном состоянии и является летальным для клетки, экспрессирующей защитный переключатель, при активации переключателя селективным агентом извне. В одном варианте осуществления ген защитного переключателя является цис-действующим по отношению к представляющему интерес гену в конструкции. Активация защитного переключателя приводит к тому, что клетка убивает только себя или себя и соседние клетки посредством апоптоза или некроза.

[00242] Используемый в данном документе для характеристики клетки термин «гипоиммуногенная», как правило, означает, что такая клетка менее склонна к иммунному отторжению субъектом, которому трансплантируют такие клетки. Например, по отношению к неизменной или немодифицированной клетке дикого типа такая гипоиммуногенная клетка может составлять около 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или более или менее подвержены иммунному отторжению субъектом, которому трансплантируют такие клетки. В некоторых аспектах технологии редактирования генома используются для модулирования экспрессии генов МНС I и МНС II и, таким образом, для создания гипоиммуногенной клетки. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка избегает иммунного отторжения у несовместимого по МНС аллогенного реципиента. В некоторых случаях дифференцированные клетки, полученные из описанных в данном документе гипоиммуногенных стволовых клеток, избегают иммунного отторжения при введении (например, при трансплантации или пересадке) несовместимому по МНС аллогенному реципиенту. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка защищена от опосредованного Т-клетками адаптивного иммунного отторжения и/или отторжения клетками врожденного иммунитета.

[00243] Гипоиммуногенность клетки можно определить путем оценки иммуногенности клетки, такой как способность клетки вызывать адаптивный и врожденный иммунный ответ. Такой иммунный ответ можно измерить с помощью анализов, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления в анализе иммунного ответа измеряется влияние гипоиммуногенной клетки на пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток, уничтожение Т-клеток, пролиферацию NK-клеток, активацию NK-клеток и активность макрофагов. В некоторых случаях гипоиммуногенные клетки и их производные в меньшей степени уничтожаются Т-клетками и/или NK-клетками при введении субъекту. В некоторых случаях клетки и их производные демонстрируют сниженное поглощение макрофагами по сравнению с немодифицированными клетками или клетками дикого типа. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка вызывает сниженный или ослабленный

иммунный ответ у субъекта-реципиента по сравнению с соответствующей немодифицированной клеткой дикого типа. В некоторых вариантах осуществления гипои иммуногенная клетка является неиммуногенной или не вызывает иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00244] Используемый в данном документе термин «основной клеточный фактор» относится к белку или молекуле, которые необходимы для выживания клеток и/или пролиферации клеток. Дополнительные описания основных клеточных факторов или основных генов можно найти, например, в Kabir et al., PloS One, 2017, 12, 5 e0178273; Hart et al., G3, 2017, 7, 2719-2727, Mair et al., Cell Reports, 2019, 27, 599-615; Wang et al., Science, 2015, 350(6264), 1096-1101; Yilmaz et al., Nat Cell Biol, 2018, 20, 610-619; Liu et al., Aging, 2019, 11(12):4011-4031; Ihry et al., Cell Reports, 2019, 27, 616-630; Bertomeu et al., Mol Cell Biol, 2018, 38(1):e00302-17; и Hart et al., Cell, 2015, 163, 1515-1526.

[00245] «Иммуносупрессивный фактор» или «иммунорегуляторный фактор», используемые в данном документе, включают факторы гипои иммунитета и, в некоторых случаях, также ингибиторы комплемента. Используемые в данном документе термины «иммуносупрессивный фактор» и «фактор гипои иммунитета» используются взаимозаменяемо.

[00246] «Иммунный сигнальный фактор», используемый в данном документе, в некоторых случаях относится к молекуле, белку, пептиду и т.п., которые активируют иммунные сигнальные пути.

[00247] «Индукцируемая экспрессионная система» в данном контексте относится к экспрессии гена, которая может контролироваться или индуцироваться лигандом, малой молекулой, пептидом, фактором, агентом и т.п. В некоторых случаях система условной генной экспрессии может включать или выключать транскрипцию в присутствии лиганда, малой молекулы, пептида, фактора, агента и т.п. В некоторых случаях система условной генной экспрессии может активировать путь деградации белка в ответ на присутствие лиганда, малой молекулы, пептида, фактора, агента и т.п.

[00248] «элемент дегрон», используемый в данном документе, относится к субъединице белка, которая регулирует деградацию белка. В некоторых случаях дегрон содержит последовательность аминокислот, которая обеспечивает сигнал деградации, направляющий полипептид на клеточную деградацию. Дегрон может способствовать деградации присоединенного полипептида через протеасомный или аутофаггизомный пути. В слитом белке дегрон должен быть функционально связан с представляющим интерес полипептидом, но не обязательно должен быть смежным с ним, пока дегрон все еще функционирует, направляя деградацию представляющего интерес полипептида. Предпочтительно дегрон индуцирует быструю деградацию представляющего интерес полипептида. Обсуждение дегронов и их функции в деградации белков см., например, Kanemaki et al. (2013) Pflugers Arch. 465(3):419-425, Eroles et al. (2014) Biochim Biophys Acta 1843(1):216-221, Schrader et al. (2009) Nat. Chem. Biol. 5(11):815-822, Ravid et al. (2008) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9(9):679-690, Tasaki et al. (2007)

Trends Biochem Sci. 32(11):520-528, Meinnel et al. (2006) Biol. Chem. 387(7):839-851, Kim et al. (2013) Autophagy 9(7):1100-1103, Varshaysky (2012) Methods Mol. Biol. 832:1-11, и Fayadat et al. (2003) Mol Biol Cell. 14(3):1268-1278; содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00249] «Локус «безопасная гавань», используемый в данном документе, относится к локусу гена, который обеспечивает безопасную экспрессию трансгена или экзогенного гена. Примеры локусов «безопасная гавань» включают ген CCR5, ген CXCR4, ген PPP1R12C (также известный как AAVS1), ген альбумина и ген Rosa.

[00250] «Экзогенная» молекула представляет собой молекулу, конструкцию, фактор и т.п., которые, как правило, не присутствуют в клетке, но могут быть введены в клетку одним или более генетическими, биохимическими или другими способами. «Нормальное присутствие в клетке» определяется с учетом конкретного этапа развития и условий окружающей среды клетки. Так, например, молекула, присутствующая только при эмбриональном развитии нейронов, является экзогенной молекулой по отношению к взрослой нейронной клетке. Экзогенная молекула может включать, например, функционирующую версию неправильно действующей эндогенной молекулы или неправильно действующую версию нормально функционирующей эндогенной молекулы.

[00251] Экзогенная молекула может быть, среди прочего, малой молекулой, такой как полученная в результате комбинаторного химического процесса, или макромолекулой, такой как белок, нуклеиновая кислота, углевод, липид, гликопротеин, липопротеин, полисахарид, любым модифицированным производным вышеуказанной молекулы или любым комплексом, содержащим одну или большее количество из вышеуказанных молекул. Нуклеиновые кислоты включают ДНК и РНК, могут быть одноцепочечными или двухцепочечными; могут быть линейными, разветвленными или кольцевыми; и могут быть любой длины. Нуклеиновые кислоты включают те, которые способны образовывать дуплексы, а также нуклеиновые кислоты, образующие триплекс. См., например, патенты США №№ 5176996 и 5422251. Белки включают, помимо прочего, ДНК-связывающие белки, факторы транскрипции, факторы ремоделирования хроматина, метилированные ДНК-связывающие белки, полимеразы, метилазы, деметилазы, ацетилазы, деацетилазы, киназы, фосфатазы, интегразы, рекомбиназы, лигазы, топоизомеразы, гиразы и геликазы.

[00252] Экзогенная молекула или конструкция может быть молекулой того же типа, что и эндогенная молекула, например, экзогенный белок или нуклеиновая кислота. В таких случаях экзогенная молекула вводится в клетку в более высоких концентрациях, чем концентрация эндогенной молекулы в клетке. В некоторых случаях экзогенная нуклеиновая кислота может содержать геном инфекционного вируса, плазмиду или эписому, введенную в клетку, или хромосому, которая в норме не присутствует в клетке. Способы введения экзогенных молекул в клетки известны специалистам в данной области и включают, помимо прочего, липид-опосредованный перенос (то есть липосомы, включая нейтральные и катионные липиды), электропорацию, прямую инъекцию, слияние

клеток, бомбардировку частицами, соосаждение фосфатом кальция, перенос, опосредованный DEAE-декстраном, и перенос, опосредованный вирусным вектором.

[00253] «Ген» для целей настоящего изобретения включает область ДНК, кодирующую продукт гена, а также все области ДНК, которые регулируют продуцирование продукта гена, независимо от того, являются ли такие регуляторные последовательности смежными с кодирующими и/или транскрибируемыми последовательностями. Соответственно, ген включает, но не обязательно ограничивается этим, промоторные последовательности, терминаторы, регуляторные последовательности трансляции, такие как сайты связывания рибосом и внутренние сайты посадки рибосомы, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы, граничные элементы, источники репликации, сайты прикрепления матрикса и области контроля локуса.

[00254] «Экспрессия гена» относится к преобразованию информации, содержащейся в гене, в продукт гена. Генный продукт может быть продуктом прямой транскрипции гена (*например*, мРНК, тРНК, рРНК, антисмысловая РНК, рибозим, структурная РНК или любой другой тип РНК) или белком, полученным путем трансляции мРНК. Генные продукты также включают РНК, которые модифицируются такими процессами, как кэппирование, полиаденилирование, метилирование и редактирование, а также белки, модифицированные, например, метилированием, ацетилированием, фосфорилированием, убиквитинированием, ADP-рибозилизацией, миристилизацией и гликозилацией.

[00255] «Модуляция» экспрессии гена относится к изменению уровня экспрессии гена. Модуляция экспрессии может включать, помимо прочего, активацию генов и репрессию генов. Модуляция также может быть полной, т.е. при которой экспрессия гена полностью инактивирована или активирована до уровней дикого типа или выше; или она может быть частичной, при которой экспрессия гена частично снижена или частично активирована до некоторой доли уровней дикого типа.

[00256] Термин «функционально связанный» или «функционально связан» используется взаимозаменяемо в отношении сопоставления двух или более компонентов (таких как элементы последовательности), при котором компоненты расположены так, что оба компонента функционируют нормально и допускают возможность того, что по меньшей мере один из компонентов может выполнять функцию, выполняемую по меньшей мере одним из других компонентов. В качестве иллюстрации, регуляторная последовательность транскрипции, такая как промотор, функционально связана с кодирующей последовательностью, если регуляторная последовательность транскрипции контролирует уровень транскрипции кодирующей последовательности в ответ на присутствие или отсутствие одного или большего количества факторов регуляции транскрипции. Регуляторная последовательность транскрипции обычно функционально связана в цис-положении с кодирующей последовательностью, но не обязательно должна быть непосредственно примыкающей к ней. Например, энхансер представляет собой регуляторную последовательность транскрипции, которая функционально связана с

кодирующей последовательностью, даже если они не являются смежными.

[00257] «Вектор» или «конструкция» способны переносить последовательности генов в целевые клетки. Как правило, «векторная конструкция», «вектор экспрессии» и «вектор для переноса гена» означают любую конструкцию нуклеиновой кислоты, способную направлять экспрессию представляющего интерес гена и которая может переносить последовательности генов в целевые клетки. Таким образом, этот термин включает клонирующие и экспрессионные носители, а также интегрирующиеся векторы. Способы введения векторов или конструкций в клетки известны специалистам в данной области и включают, помимо прочего, липид-опосредованный перенос (то есть липосомы, включая нейтральные и катионные липиды), электропорацию, прямую инъекцию, слияние клеток, бомбардировку частицами, соосаждение фосфатом кальция, перенос, опосредованный DEAE-декстраном, и перенос, опосредованный вирусным вектором.

[00258] «Плюрипотентные стволовые клетки», используемые в данном документе, обладают потенциалом дифференцироваться в любой из трех зародышевых слоев: энтодерму (например, слизистую оболочку желудка, желудочно-кишечный тракт, легкие и т. д.), мезодерму (например, мышцы, кости, кровь, ткани мочеполовой системы и т. д.) или эктодерму (например, эпидермальные ткани и ткани нервной системы). Термин «плюрипотентные стволовые клетки», используемый в данном документе, также включает «индуцированные плюрипотентные стволовые клетки» или «иПСК», тип плюрипотентных стволовых клеток, полученных из неплюрипотентных клеток. Примеры исходных клеток включают соматические клетки, которые были перепрограммированы для индукции плюрипотентного недифференцированного фенотипа различными способами. Такие «иПС» или «иПСК» клетки могут быть созданы путем индукции экспрессии определенных регуляторных генов или путем экзогенного применения определенных белков. Способы индукции иПС клетки известны в данной области техники и дополнительно описаны ниже. (См., например, Zhou et al., Stem Cells 27 (11): 2667-74 (2009); Huangfu et al, Nature Biotechnol. 26 (7): 795 (2008); Woltjen et al., Nature 458 (7239): 766-770 (2009); и Zhou et al., Cell Stem Cell 8:381-384 (2009); каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Генерация индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) описана ниже. Используемый в данном документе термин «чиПСК» представляет собой человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

[00259] Под «HLA» или «человеческим лейкоцитарным антигеном» понимается генный комплекс, кодирующий белки главного комплекса гистосовместимости (МНС) у человека. Эти белки клеточной поверхности, составляющие комплекс HLA, отвечают за регуляцию иммунного ответа на антигены. У людей есть два МНС, класс I и класс II, «HLA-I» и «HLA-II». HLA-I включает три белка, HLA-A, HLA-B и HLA-C, которые представляют пептиды изнутри клетки, а антигены, презентируемые комплексом HLA-I, привлекают киллерные Т-клетки (также известные как CD8⁺ Т-клетки или цитотоксические Т-клетки). Белки HLA-I связаны с микроглобулином β -2 (B2M). HLA-II

включает пять белков, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOB, HLA-DQ и HLA-DR, которые представляют антигены извне клетки Т-лимфоцитам. Это стимулирует CD4+ Т-клетки (также известные как Т-хелперы). Следует понимать, что использование либо «МНС», либо «HLA» не предназначено для ограничения, поскольку это зависит от того, получены ли гены от человека (HLA) или мыши (МНС). Таким образом, применительно к клеткам млекопитающих эти термины могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

[00260] Термины «лечить», «процесс лечения», «лечение» и т.д., применяемые к выделенной клетке, включают воздействие на клетку любого вида процесса или условия или выполнение любого вида манипуляции или процедуры с клеткой. Применительно к субъекту термины относятся к введению индивиду клетки или популяции клеток, в которых целевая полинуклеотидная последовательность (например, B2M) изменена *ex vivo* в соответствии со способами, описанными в данном документе. Индивид, как правило, болен или травмирован, или подвергается повышенному риску заболеть по сравнению со средним членом популяции и нуждается в таком уходе, лечении или терапии.

[00261] Используемые в данном документе термины «процесс лечения» и «лечение» относятся к введению субъекту эффективного количества клеток с целевыми полинуклеотидными последовательностями, измененными *ex vivo* в соответствии с описанными в данном документе способами, так что у субъекта наблюдается уменьшение проявления по меньшей мере одного симптома заболевания или регресс заболевания, например, благоприятные или желаемые клинические результаты. Для целей данной технологии полезные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, облегчение одного или более симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. не ухудшение) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение. состояния болезни и ремиссии (частичной или полной), обнаруживаемой или необнаружимой. Лечение может относиться к увеличению выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если не получать лечение. Таким образом, специалист в данной области понимает, что лечение может улучшить состояние заболевания, но не может полностью излечить от заболевания. Используемый в данном документе термин «лечение» включает профилактику. В качестве альтернативы лечение является «эффективным», если прогрессирование заболевания снижено или остановлено. «Лечение» также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, у кого уже диагностировано нарушение, связанное с экспрессией полинуклеотидной последовательности, а также тех, у кого может развиться такое нарушение из-за генетической предрасположенности или других факторов.

[00262] Под «лечением» или «предотвращением» заболевания или нарушения понимают задержку или предотвращение дебюта такого заболевания или нарушения,

обращение вспять, облегчение, ослабление, ингибирование, замедление или остановку прогрессирования, обострения или ухудшения течения или тяжести состояния, связанного с таким заболеванием или нарушением. В одном варианте осуществления симптомы заболевания или нарушения облегчаются на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или на по меньшей мере 50%.

[00263] Используемые в данном документе термины «введение», «внесение» и «трансплантация» используются взаимозаменяемо в контексте помещения клеток, например, клеток, описанных в данном документе, содержащих целевую полинуклеотидную последовательность, измененную в соответствии со способами настоящей технологии, субъекту, способом или путем, который приводит к по меньшей мере частичной локализации введенных клеток в желаемом месте. Клетки можно имплантировать непосредственно в желаемое место или, альтернативно, вводить любым подходящим путем, который приводит к доставке в желаемое место субъекта, где по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остается жизнеспособной. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может составлять от нескольких часов, например, от двадцати четырех часов до нескольких дней и даже до нескольких лет. В некоторых случаях клетки также можно вводить в место, отличное от желаемого, например, в печень или подкожно, например, в капсуле, чтобы сохранить имплантированные клетки в месте имплантации и избежать миграции имплантированных клеток.

[00264] В дополнительных или альтернативных аспектах настоящая технология предусматривает изменение целевых последовательностей полинуклеотидов любым способом, доступным специалисту в данной области техники, например, с использованием системы TALEN. Следует понимать, что хотя в данном документе подробно описаны примеры методов с использованием CRISPR/Cas (например, Cas9 и Cas12a) и TALEN, настоящая технология не ограничивается использованием этих методов/систем. Другие способы нацеливания, например, B2M, для снижения или устранения экспрессии в целевых клетках, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы в данном документе.

[00265] Описанные в данном документе способы можно использовать для изменения целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. Настоящая технология предусматривает изменение целевых полинуклеотидных последовательностей в клетке для любых целей. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность в клетке изменена с получением мутантной клетки. Используемый в данном документе термин «мутантная клетка» относится к клетке с результирующим генотипом, который отличается от исходного генотипа. В некоторых случаях «мутантная клетка» проявляет мутантный фенотип, например, когда нормально функционирующий ген изменен с использованием систем CRISPR/Cas по настоящей технологии. В других случаях «мутантная клетка» проявляет фенотип дикого типа,

например, когда система CRISPR/Cas по настоящей технологии используется для коррекции мутантного генотипа. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность в клетке изменяется для коррекции или исправления генетической мутации (*например*, для восстановления нормального фенотипа клетки). В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность в клетке изменяется, чтобы вызвать генетическую мутацию (*например*, чтобы нарушить функцию гена или геномного элемента).

[00266] В некоторых вариантах осуществления изменение представляет собой индел. Как применяется в данном документе, «индел» относится к мутации, возникшей в результате вставки, делеции или их комбинации. Как будет понятно специалистам в данной области техники, индел в кодирующем участке геномной последовательности приведет к мутации сдвига рамки считывания, если длина инделя не кратна трем. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изменение представляет собой точечную мутацию. Как применяется в данном документе, «точечная мутация» относится к замене, которая заменяет один из нуклеотидов. Систему CRISPR/Cas можно применять для индукции инделя любой длины или точечной мутации в целевой полинуклеотидной последовательности.

[00267] Как применяется в данном документе, «нокаут» включает делецию всей или части целевой полинуклеотидной последовательности способом, который препятствует функции целевой полинуклеотидной последовательности. Например, нокаут может быть достигнут путем изменения целевой последовательности полинуклеотида путем индуцирования вставки в целевой полинуклеотидной последовательности в функциональном домене целевой последовательности полинуклеотида (например, ДНК-связывающем домене). Специалисты в данной области техники легко поймут, как использовать системы CRISPR/Cas для нокаута целевой полинуклеотидной последовательности или ее части, основываясь на подробностях, описанных в данном документе.

[00268] В некоторых вариантах осуществления изменение приводит к нокауту целевой полинуклеотидной последовательности или ее части. Нокин целевой полинуклеотидной последовательности или ее части с помощью системы CRISPR/Cas, описанной в данном документе, может быть полезно для различных применений. Например, нокин целевой полинуклеотидной последовательности в клетке можно проводить *in vitro* в исследовательских целях. Для целей *ex vivo* нокин целевой полинуклеотидной последовательности в клетке может быть пригоден для лечения или предотвращения нарушения, связанного с экспрессией целевой полинуклеотидной последовательности (например, нокин мутантного аллеля в клетке *ex vivo* и введение субъекту клеток, содержащих нокаутированный мутантный аллель).

[00269] Под «нокином» в данном документе подразумевается процесс, который добавляет генетическую функцию к клетке-хозяину. В некоторых вариантах осуществления это вызывает повышенный или пониженный уровень генного продукта с

нокаутом, например, РНК или кодируемого белка. Как должно быть понятно специалистам в данной области техники, это может быть достигнуто несколькими способами, включая добавление одной или более дополнительных копий гена в клетку-хозяин или изменение регуляторного компонента эндогенного гена, увеличивающего экспрессию белка. Это может быть достигнуто путем модификации промотора, добавления другого промотора, добавления энхансера или модификации других последовательностей экспрессии генов.

[00270] В некоторых вариантах осуществления изменение приводит к снижению экспрессии целевой полинуклеотидной последовательности. Термины «снижение», «пониженный», «понижение» и «снижение» используются в данном документе, как правило, для обозначения снижения на статистически значимую величину. Однако, во избежание сомнений, «снижение», «пониженный», «понижение», «снижение» означает уменьшение, по меньшей мере, на 10% по сравнению с эталонным уровнем, например, снижение на по меньшей мере около 20%, или на по меньшей мере около 30%, или на по меньшей мере около 40%, или на по меньшей мере около 50%, или на по меньшей мере около 60%, или на по меньшей мере около 70%, или на по меньшей мере около 80%, или на по меньшей мере около 90%, или до и включая снижение на 100% (т.е. уровень отсутствия по сравнению с эталонным образцом) или любое снижение на между 10-100% по сравнению с эталонным уровнем.

[00271] Термины «увеличенный», «увеличение», «усиление» или «активирование» все применяются в данном документе, чтобы в общем означать увеличение на статически значимую величину; во избежание каких-либо сомнений, термины «увеличенный», «увеличение», «усиление» или «активирование» означают увеличение по меньшей мере на 10% по сравнению с эталонным уровнем, например, увеличение на по меньшей мере около 20%, или на по меньшей мере около 30%, или на по меньшей мере около 40%, или на по меньшей мере около 50%, или на по меньшей мере около 60%, или на по меньшей мере около 70%, или на по меньшей мере около 80%, или на по меньшей мере около 90% или до и включая увеличение на 100% или любое увеличение на между 10-100% по сравнению с эталонным уровнем, или на по меньшей мере около в 2 раза, или на по меньшей мере около в 3 раза, или на по меньшей мере около в 4 раза, или на по меньшей мере около в 5 раз или на по меньшей мере около в 10 раз, или любое увеличение между 2 до 10 раз или более по сравнению с эталонным уровнем.

[00272] Используемый в данном документе термин «экзогенный» предназначен для обозначения того, что указанная молекула или указанный полипептид вводится в представляющую интерес клетку. Полипептид может быть введен, например, путем введения кодирующей нуклеиновой кислоты в генетический материал клеток, например, путем интеграции в хромосому, или в виде нехромосомного генетического материала, такого как плазида или вектор экспрессии. Следовательно, термин, используемый в отношении экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты, относится к введению кодирующей нуклеиновой кислоты в экспрессируемой форме в клетку.

[00273] Термин «эндогенный» относится к упомянутой молекуле или полипептиду, который присутствует в клетке. Аналогично, термин, используемый в отношении экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты, относится к экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты, содержащейся внутри клетки и не введенной экзогенно.

[00274] Термин «процент идентичности» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновой кислоты или полипептида относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые имеют определенный процент одинаковых нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, как измерено с использованием одного из алгоритмов сравнения последовательностей, описанных ниже (*например*, BLASTP и BLASTN или другие алгоритмы, доступные специалистам в данной области техники) или при визуальном осмотре. В зависимости от применения процент «идентичности» может наблюдаться в области сравниваемой последовательности, *например*, в функциональном домене, или, альтернативно, существовать по всей длине двух сравниваемых последовательностей. Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность служит эталонной последовательностью с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости, обозначают координаты последовательности и указывают программные параметры алгоритма для работы с последовательностями. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для исследуемой последовательности(-ей) по сравнению с эталонной последовательностью на основании программных параметров.

[00275] Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, *например*, с помощью алгоритма локальной гомологии согласно Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), алгоритма гомологичного выравнивания согласно Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), поиск по методу сходства согласно Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), путем компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA, и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин, США), или путем визуального осмотра (см. в целом Ausubel et al., ниже).

[00276] Одним из примеров алгоритма, который подходит для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, является алгоритм BLAST, который описан в Altschul et al, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). Программное обеспечение для проведения анализа BLAST находится в открытом доступе в Национальном центре биотехнологической информации.

[00277] Термины «субъект» и «индивид» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к животному, *например*, человеку, от которого могут быть получены клетки и/или которому предоставляется лечение, включая профилактическое

лечение клетками, описанными в данном документе. Для лечения тех инфекций, патологических состояний или болезненных состояний, которые специфичны для конкретного животного, такого как человек, термин «субъект» относится к этому конкретному животному. «Отличные от человека животные» и «отличные от человека млекопитающие», используемые в данном документе взаимозаменяемо, включают млекопитающих, таких как крысы, мыши, кролики, овцы, кошки, собаки, коровы, свиньи и отличные от человека приматы. Термин «субъект» также охватывает любое позвоночное животное, включая, но не ограничиваясь этим, млекопитающих, рептилий, земноводных и рыб. Однако преимущественно субъект представляет собой млекопитающее, такое как человек, или другие млекопитающие, такие как домашнее млекопитающее, т.е. собака, кошка, лошадь и т.п., или производственное млекопитающее, например, корова, овца, свинья и тому подобное.

[00278] Следует отметить, что формула изобретения может быть составлена так, чтобы исключить любой необязательный элемент. Следовательно, данное утверждение должно служить в качестве предварительного основания для использования такой исчерпывающей терминологии, как «исключительно», «только», и т. п. в связи с указанием элементов формулы изобретения, или использования «отрицательного» признака. Как будет очевидно специалистам в данной области техники после прочтения настоящего раскрытия, каждый из отдельных вариантов осуществления, описанных и проиллюстрированных в данном документе, имеет отдельные компоненты и признаки, которые легко отделить или объединить с признаками любого из других нескольких вариантов осуществления, не выходя за рамки объема или сущности настоящей технологии. Любой изложенный способ может выполняться в порядке перечисления событий или в любом другом логически возможном порядке. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в данном документе, также могут быть использованы на практике или при тестировании технологии, теперь описаны репрезентативные иллюстративные способы и материалы.

[00279] Как описано в настоящей технологии, будут использоваться следующие термины, и они определены, как указано ниже.

[00280] Перед тем как продолжить описание настоящего изобретения, необходимо принять во внимание, что это изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, поскольку они, конечно, могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящей технологии будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

[00281] Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в данной области техники, к которой имеет отношение настоящая технология. Когда приводится диапазон значений, следует понимать, что данная технология охватывает

каждое промежуточное значение с точностью до десятого знака нижнего предела, если в контексте явно не указано иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона, а также любое другое указанное или промежуточное значение в таком указанном диапазоне. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также включены в данную технологию с учетом любого специальным образом исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба этих включенных предела, также включены в данную технологию. Определенные диапазоны представлены в данном документе с числовыми значениями, которым предшествует термин «около». Термин «около» используется в данном документе для обеспечения буквальной поддержки точного числа, которому оно предшествует, а также числа, которое близко или приблизительно соответствует числу, которому предшествует термин. При определении того, является ли число близким или приблизительно близким к конкретно указанному числу, близким или приблизительно близким не указанным числом может быть число, которое в представленном контексте обеспечивает по существу эквивалент конкретно указанного числа.

[00282] Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в этом описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки. Кроме того, каждая цитируемая публикация, патент или патентная заявка включены в настоящий документ посредством ссылки для раскрытия и описания объекта изобретения, в связи с которым цитируются публикации. Ссылка на любую публикацию предназначена для ее раскрытия до даты подачи заявки и не должна рассматриваться как признание того, что настоящая технология, описанная в данном документе, не предоставляет права датировать такое описание более ранним числом в силу более ранней технологии. Более того, даты представленных публикаций могут отличаться от фактических дат публикаций, что требует независимого подтверждения.

III. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

A. Условные клетки НР и способы условного снижения экспрессии иммуносупрессивных факторов

[00283] Внесение защитных переключателей повышает безопасность клеточной терапии, разработанной с использованием гипоиммуногенных клеток (клеток НР). Особенностью клеток НР, описанных в данном документе, является индуцируемая экспрессия одного или более иммунорегуляторных (иммуносупрессивных) факторов. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор (также называемый в данном документе «фактором гипоиммунитета») включает, но не ограничивается ими, CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелую цепь HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, ингибитор C1, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8. В определенных

вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор представляет собой CD47. Регулируемая или индуцируемая экспрессия иммуносупрессивного фактора функционирует для контроля иммунного ответа реципиента, подвергнутого трансплантации гипоиммуногенной клетки.

[00284] В данном документе описаны способы экспрессии иммуносупрессивного фактора, для которых требуется механизм контролируемого отключения экспрессии иммунорегуляторного белка. Также описаны клетки НР, обладающие контролируемой экспрессией одного или более иммуносупрессивных факторов. В некоторых случаях клетки сверхэкспрессируют один или более иммуносупрессивных факторов, и их можно индуцировать для подавления экспрессии одного или более иммуносупрессивных факторов. Таким образом, клетки больше не являются гипоиммуногенными и распознаются иммунными клетками реципиента для индукции клеточной гибели.

[00285] В некоторых вариантах осуществления гипоиммунность клеток, которые вводят субъекту-реципиенту, достигается за счет сверхэкспрессии иммуносупрессивной молекулы, включая факторы гипоиммунитета и ингибиторы комплемента, сопровождающейся репрессией или генетическим нарушением локусов HLA-I и HLA-II. Эти модификации скрывают клетку от эффекторных клеток иммунной системы реципиента, которые отвечают за удаление инфицированных, злокачественных или чужеродных клеток, таких как Т-клетки, В-клетки, НК-клетки и макрофаги. Маскировка клетки от иммунной системы позволяет существовать и сохраняться аллогенным клеткам в организме. Контролируемое удаление сконструированных клеток из организма имеет решающее значение для безопасности пациента и может быть достигнуто путем демаскировки клеток из иммунной системы. Демаскировка служит защитным переключателем и может быть достигнуто за счет снижения экспрессии иммуносупрессивных молекул или повышения экспрессии иммунных сигнальных молекул. Уровень экспрессии любой из описанных иммуносупрессивных молекул можно контролировать на уровне белка, мРНК или ДНК в клетках. Точно так же уровень экспрессии любой из описанных иммунных сигнальных молекул можно контролировать на уровне белка, мРНК или ДНК в клетках.

[00286] В некоторых вариантах осуществления любой из описанных способов защитного переключения (например, защитные переключатели на уровне белка, уровне РНК и уровне ДНК) используют для снижения уровня иммуносупрессивного фактора в клетках таким образом, чтобы более низкий уровень иммуносупрессивного фактора был ниже порогового уровня. В некоторых вариантах осуществления уровень иммуносупрессивного фактора в клетках снижается примерно в 10 раз, 9 раз, 8 раз, 7 раз, 6 раз, 5 раз, 4 раза, 3 раза, 2 раза, 1 раз или 0,5 раз ниже порогового уровня экспрессии. В некоторых вариантах осуществления уровень иммуносупрессивного фактора в клетках снижается примерно в 10-5 раз, 10-3 раз, 9-1 раз, 8-1 раз, 7-0,5 раз, 6-1 раз, 5-0,5 раз, 4-0,5 раз, 3-0,5 раз, 2-0,5 раз или в 1-0,5 раз ниже порогового уровня экспрессии. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень экспрессии иммуносупрессивного фактора

устанавливается на основе экспрессии такого фактора в индуцированной плюрипотентной стволовой клетке. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень экспрессии иммуносупрессивного фактора устанавливается на основе уровня экспрессии иммуносупрессивного фактора в соответствующей гипиммунной клетке, такой как нокаутная по МНС I и МНС II клетка или нокаутная по МНС I/МНС II/TCR клетка.

1. Контроль уровня белка

[00287] В некоторых вариантах осуществления регулируемая деградация иммуносупрессивного белка устанавливается путем включения дегрона в аминокислотную последовательность иммуносупрессивного фактора, что позволяет рекрутировать его в механизм эндогенного метаболизма белка. Механизмы целенаправленной деградации белка включают, но не ограничиваются ими, рекрутирование к лигазе E3 для убиквитинирования и последующей протеасомной деградации, прямое рекрутирование к протеасоме и рекрутирование к лизосоме.

[00288] Слияние индуцируемых мотивов дегрона с иммуносупрессивными молекулами обеспечивает экзогенный контроль над стабильностью молекулы посредством добавления или удаления небольших молекул, которые стабилизируют или дестабилизируют дегрон и, таким образом, иммуносупрессивную молекулу.

[00289] В некоторых вариантах осуществления способы индуцируемой деградации белка с помощью включают, но не ограничиваются ими, индуцируемую лигандом деградацию (LID) с использованием метки SMASH, индуцируемую лигандом деградацию с использованием Shield-1, индуцируемую лигандом деградацию с использованием ауксина, индуцируемую лигандом деградацию с использованием рапамицина, пептидные дегроны (например, дегроны на основе IKZF3) и протеолиз-таргетированную химеру (PROTAC). В некоторых вариантах осуществления метода деградации, индуцированной лигандом, дегронная метка, которая удерживается в неактивной конформации, но индуцируется к переходу в конформацию, способную распознаваться протеасомой при связывании специфической молекулы, такой как, но без ограничения, молекула Shield-1. См., например, Roth et al., Cellular Molecular Life Sciences, 2019, 76(14), 2761-2777, который полностью включен в данный документ посредством ссылки. Подробное описание технологии на основе дегрона SMASH можно найти в Hannah and Zhou, Nat Chem Biol, 2015, 11:637-638 and Chung et al., Nat Chem Biol, 2015, 11:713-720, которые включены в данный документ посредством ссылки в их целостности. Подробное описание технологий LID degon можно найти в Bongor et al., Nat Chem Biol, 2011, 7(8):531-7, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00290] В некоторых аспектах предложены способы контроля иммуногенности клетки млекопитающего (например, клетки человека) путем получения выделенной клетки и введения конструкции, содержащей конститутивный промотор, функционально связанный с индуцируемым элементом дегрон, который функционально связан с геном, кодирующим иммуносупрессивный фактор. В некоторых вариантах осуществления конструкция включает конститутивный промотор, функционально связанный с

индуцируемым элементом дегрон, который функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей гибкий линкер, который функционально связан с геном, кодирующим иммуносупрессивный фактор. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит конститутивный промотор, функционально связанный с геном, кодирующим иммуносупрессивный фактор, который функционально связан с индуцируемым элементом дегрон. В некоторых вариантах осуществления конструкция включает конститутивный промотор, функционально связанный с геном, кодирующим иммуносупрессивный фактор, который связан с последовательностью, кодирующей гибкий линкер, который функционально связан с индуцируемым элементом дегрон. Таким образом, дегрон направляет иммуносупрессивный фактор на деградацию при контакте клетки с лигандом или молекулой дегрона.

[00291] В некоторых вариантах осуществления индуцируемый элемент дегрон выбран из группы, состоящей из элемента дегрон, индуцируемого лигандом, такого как элемент дегрон отключения с помощью малых молекул (SMASH), чувствительный к Shield-1 элемент дегрон, чувствительный к ауксину элемент дегрон, и чувствительный к рапамицину элемент дегрон; пептидный элемент дегрон; и элемент протеолиз-таргетированная химера (PROTAC). В полезных вариантах осуществления индуцируемый лигандом элемент дегрон представляет собой элемент дегрон отключения с помощью малых молекул (SMASH), а экзогенный фактор для контроля иммуногенности представляет собой асунапревир. В некоторых вариантах осуществления ген иммуносупрессивного фактора выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8. Во многих вариантах осуществления ген иммуносупрессивного фактора представляет собой CD47. В некоторых случаях конститутивный промотор конструкции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC. В некоторых случаях необязательный гибкий линкер выбран из группы, состоящей из (GSG)_n (SEQ ID NO:3), (GGGS)_n (SEQ ID NO:1) и (GGGSGGGGS)_n (SEQ ID NO:2), где n равен 1-10. В некоторых вариантах осуществления конструкцию вводят в клетку для интеграции в локус «безопасная гавань», такой как, помимо прочего, локус AAVS1, локус CLBYL, локус CXCR4, локус Rosa26 и локус CCR5. В некоторых вариантах осуществления конструкцию вводят в локус AAVS в клетке путем гомологичной рекомбинации. Таким образом, конструкция включает 5'- и 3'-плечи гомологии, специфичные для целевого локуса «безопасная гавань». В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит от 5'-конца к 3'-концу: 5'-плечо, гомологичное локусу AAVS1, экзогенный конститутивный промотор, индуцируемый элемент дегрон, ген, кодирующий иммуносупрессивный фактор, и 3'-плечо, гомологичное локусу AAVS1. В других вариантах осуществления конструкция содержит от 5'-конца к 3'-концу: 5'-плечо, гомологичное локусу AAVS1, экзогенный конститутивный промотор, индуцируемый

элемент дегрон, последовательность, кодирующую гибкий линкер, ген, кодирующий иммуносупрессивный фактор, и 3'-плечо, гомологичное локусу AAVS1. В полезных вариантах осуществления сконструированная клетка включает экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую конститутивный промотор, функционально связанный с индуцируемым элементом дегрон, который функционально связан с необязательной последовательностью, кодирующей гибкий линкер, который функционально связан с геном, кодирующим иммуносупрессивный фактор. Сконструированная клетка экспрессирует индуцируемый элемент дегрон, слитый или связанный с иммуносупрессивным фактором. В некоторых вариантах осуществления клетку приводят в контакт с фактором или агентом, таким как, но не ограничиваясь ими, лиганд, молекула, пептид или малая молекула, которая активирует элемент дегрон для деградации иммуносупрессивного фактора.

[00292] В некоторых вариантах осуществления пептидного дегрона используется пептидная метка, которая обеспечивает опосредованное малыми молекулами рекрутирование к лигазе E3. В некоторых вариантах осуществления пептидная метка содержит лимфоид-рестриктированный фактор транскрипции IKZF3, который рекрутируется к рецептору лигазы E3 (CRBN) в зависимости от иммуномодулирующего лекарственного средства (IMiD), как описано в Koduri et al., Proc Natl Acad Sci, 2019, 116(7), 2539-2544, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления дегрон способен направляет иммуносупрессивные факторы на деградацию (например, посредством пути убиквитинирования), индуцируя деградацию белка или разрушая белки.

[00293] В некоторых аспектах предложены способы контроля иммуногенности клетки млекопитающего (например, клетки человека) путем получения выделенной клетки и введения конструкции, включающей конститутивный промотор, индуцируемый пептидный элемент дегрон и ген, кодирующий иммуносупрессивный фактор. В некоторых вариантах осуществления конструкция включает конститутивный промотор, индуцируемый пептидный элемент дегрон, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гибкий линкер, и ген, кодирующий иммуносупрессивный фактор. Любой из конститутивных промоторов, иммуносупрессивных факторов, гибких линкеров и клеток, описанных в данном документе, применим к способу.

[00294] В некоторых вариантах осуществления PROTAC бифункциональная молекула используется для рекрутирования иммуносупрессивного фактора в механизм деградации белка клетки. В некоторых вариантах осуществления бифункциональная молекула связывается с последовательностью нативного иммуносупрессивного белка или иммуносупрессивного белка дикого типа или сконструированной версией иммуносупрессивного белка, экспрессирующей домен, который связывается с бифункциональной молекулой с высокой аффинностью. В некоторых вариантах осуществления бифункциональная молекула содержит малую молекулу или биологический агент (например, антитело или его фрагмент). См., например, Burslem et

al., Cell Chemical Biology, 2018, 25, 67-77 and Roth et al., Cellular Molecular Life Sciences, 2019, 76(14), 2761-2777, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

[00295] В некоторых вариантах осуществления бифункционального антитела антитело нацелено на иммуносупрессивный фактор и второй эндогенный рецептор, что приводит к интернализации и деградации. Контролируемая экспрессия одного или более иммуносупрессивных факторов может быть обеспечена посредством бифункционального антитела (например, химически перепрограммированного бифункционального антитела), способа индуцируемой деградации белка с помощью дегрона, индуцируемой регуляции РНК, индуцируемой регуляции ДНК и способа индуцируемой экспрессии. См., например, Natsume and Kanemaki, Annu Rev Genet, 2017, 51, 82-102; Burslem and Crews, Chem Rev, 2017, 117, 11269-11301; Banik et al., ChemRxiv, 2019; которые полностью включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления клетку, экспрессирующую иммуносупрессивный фактор, приводят в контакт с антителом, которое связывает клетку для деградации.

[00296] В некоторых случаях гипоиммунные клетки используются и очищаются иммунной системой за счет добавления антитела, которое связывает эпитоп на внеклеточной поверхности клетки. Эпитоп может быть нативным для сверхэкспрессируемого иммуносупрессивного фактора или может быть другим эпитопом, расположенным внутри иммуносупрессивного фактора или отчетливо расположенным на внеклеточной поверхности. Связывание антитела с поверхностью демаскирует клетку и приводит к антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ).

[00297] В некоторых вариантах осуществления эпитоп защитного переключателя АЗКЦ/КЗЦ выбран из группы, состоящей из EGFR, CD20, CD19, CCR4, HER2, MUC1, GD2, PSMA, CD30, CD16 и их фрагментов, производных и вариантов. В некоторых случаях любые клетки, описанные в данном документе, экспрессируют эпитоп, выбранный из эпитопа EGFR, эпитопа CD20, эпитопа CD19, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа MUC1, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD30 или эпитопа CD16. В некоторых вариантах осуществления клетки связываются с антителом, специфичным к EGFR, CD20, CD19, CCR4, HER2, MUC1, GD2, PSMA, CD30 или CD16, что приводит к АЗКЦ/КЗЦ.

[00298] Способы, направленные на защитный переключатель на уровне белка, как описано в данном документе, обеспечивают способ снижения уровня иммуносупрессивного фактора (например, CD47) регулируемым образом в сконструированных клетках, описанных в данном документе, (например, в гипоиммунных клетках). Снижая уровень иммуносупрессивного фактора, такого как CD47, ниже порогового уровня в клетках с использованием любого из описанных в данном документе способов защитного переключения, иммунная система субъекта-реципиента может инициировать иммунный ответ на такие клетки. В некоторых вариантах осуществления

уровень CD47 в сконструированных клетках снижается с помощью защитного переключателя примерно в 10 раз, 9 раз, 8 раз, 7 раз, 6 раз, 5 раз, 4 раза, 3 раза, 2 раза, 1 раз или в 0,5 раза ниже порогового уровня экспрессии. В некоторых вариантах осуществления уровень CD47 в сконструированных клетках снижается примерно в 10-5 раз, 10-3 раз, 9-1 раз, 8-1 раз, 7-0,5 раза, 6-1 раз, 5-0,5 раза, 4-0,5 раза, 3-0,5 раза, 2-0,5 раза или в 1-0,5 раза ниже порогового уровня экспрессии. В некоторых случаях пороговый уровень экспрессии CD47 устанавливается на основе экзогенной экспрессии CD47 в индуцированной плюрипотентной стволовой клетке. В других случаях пороговый уровень экспрессии CD47 устанавливается на основе уровня экспрессии CD47 в соответствующей гипоиммунной клетке, такой как нокаутная по MHC I и MHC II клетка или нокаутная по MHC I/MHC II/TCR клетка. В некоторых случаях уровень CD47 снижается с помощью защитного переключателя на основе дегрона, такого как, помимо прочего, дегрон SMASH или дегрон LID. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие дегрон SMASH, связанный с экзогенным трансгеном CD47, подвергают воздействию малой молекулы асунапревира (индуктора дегрона), что тем самым вызывает снижение экспрессии экзогенного CD47 клетками.

2. Контроль уровня РНК

[00299] Иммуносупрессивные факторы могут быть нацелены на киРНК или миРНК, что приводит к деградации транскрипта, кодирующего факторы. киРНК может быть экзогенно предоставлена или генетически закодирована для обеспечения контроля над транскрипцией ингибирующей РНК. киРНК или миРНК могут отжигаться с транскриптом иммуносупрессивного фактора, что приводит к деградации комплексом RISC

[00300] В некоторых вариантах осуществления способы индуцируемой регуляции РНК для снижения экспрессии иммуносупрессивного фактора включают, но не ограничиваются ими, кшРНК, индуцируемые малой молекулой или биологическим агентом, индуцируемые киРНК, индуцируемые миРНК, индуцируемую интерференцию CRISPR (CRISPRi) и индуцируемые РНК-нацеленные нуклеазы.

[00301] В некоторых вариантах осуществления способ включает кшРНК или миРНК, нацеленную на РНК иммуносупрессивного фактора. В некоторых случаях экспрессия кшРНК или киРНК индуцируется малой молекулой или биологическим агентом.

[00302] В некоторых аспектах предложены способы контроля иммуногенности клетки млекопитающего (например, клетки человека) путем получения выделенной клетки и введения конструкции, содержащей промотор индуцируемой РНК-полимеразы, функционально связанный с последовательностью кшРНК, нацеленной на иммуносупрессивный фактор, который функционально связан с конститутивным промотором, который функционально связан с трансактивирующим элементом, который может контролировать промотор индуцируемой РНК-полимеразы. В некоторых вариантах осуществления конструкция включает промотор U6Tet, кшРНК, нацеленную на

иммуносупрессивный фактор, конститутивный промотор и репрессорный элемент Tet, реагирующий на тетрациклин или его производное (например, доксициклин). В других случаях кшРНК устраняет экспрессию иммуносупрессивного фактора. В других случаях кшРНК снижает экспрессию иммуносупрессивного фактора примерно на 99% или менее, например, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 90%, 85% или менее. В некоторых вариантах осуществления индуцируемый промотор представляет собой чувствительный к тетрациклину промотор. Любой из конститутивных промоторов, иммуносупрессивных факторов и клеток, описанных в данном документе, применим к способу.

[00303] Во многих вариантах осуществления сконструированная клетка экспрессирует индуцируемую кшРНК, нацеленную на иммуносупрессивный фактор. В некоторых вариантах осуществления клетка также экспрессирует экзогенный иммуносупрессивный фактор, который опосредует гипоиmuногенность клетки. В некоторых вариантах осуществления клетку приводят в контакт с фактором, таким как, но не ограничиваясь этим, лиганд, молекула, пептид или малая молекула, которая активирует экспрессию кшРНК для деградации иммуносупрессивного фактора.

[00304] В некоторых вариантах осуществления способ включает систему CRISPR-интерференции (CRISPRi) для нацеливания на промотор иммуносупрессивного фактора с целью подавления его транскрипции. В некоторых случаях экспрессия CRISPRi и/или нРНК, направленной на иммуносупрессивный фактор, индуцируется малой молекулой или биологическим агентом. Подробное описание способов CRISPRi можно найти, например, в публикации Engreitz et al., Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019, 11:a035386, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления в системе CRISPRi используется слитый белок dCas9-репрессор, который контролируется конститутивным промотором, и нРНК, специфичная к иммуносупрессивному фактору, под контролем индуцируемого промотора.

[00305] В некоторых аспектах предложены способы контроля иммуногенности клетки млекопитающего (например, клетки человека) путем получения выделенной клетки и введения в клетку (i) первой конструкции, содержащей конститутивный промотор, функционально связанный с геном, кодирующим иммуносупрессивный фактор; (ii) вторую конструкцию, содержащую конститутивный промотор, функционально связанный с геном, кодирующим нуклеазу Cas9 или ее вариант, такой как слитый белок dCas9-репрессор; и (iii) третью конструкцию, содержащую промотор индуцируемой РНК-полимеразы, функционально связанный с последовательностью нРНК, нацеленной на последовательность, кодирующую иммуносупрессивный фактор, таким образом, что последовательность нРНК функционально связана с транскрипционным элементом, который соответствует индуцируемому промотору РНК-полимеразы. В некоторых случаях первая конструкция, вторая конструкция и третья конструкция находятся в одном векторе. В некоторых случаях первая конструкция, вторая конструкция и третья конструкция встречаются в двух векторах.

[00306] В некоторых вариантах осуществления способ на основе CRISPR включает

нуклеазу для нацеливания на последовательность мРНК, соответствующую иммуносупрессивному фактору, такому как, помимо прочего, Cas13, Cas7 или Csx1. В некоторых случаях экспрессия нуклеазы и/или нРНК, нацеленной на иммуносупрессивный фактор, индуцируется малой молекулой или биологическим агентом.

[00307] В некоторых аспектах предложены способы контроля иммуногенности клетки млекопитающего (например, клетки человека) путем получения выделенной клетки и введения в клетку (i) первой конструкции, содержащей конститутивный промотор, функционально связанный с геном, кодирующим иммуносупрессивную фактор; (ii) вторую конструкцию, содержащую конститутивный промотор, функционально связанный с геном, кодирующим нуклеазу Cas13a, ее вариант или ее слитый белок; и (iii) третью конструкцию, содержащую промотор индуцируемой РНК-полимеразы, функционально связанный с последовательностью нРНК, нацеленной на последовательность, кодирующую иммуносупрессивный фактор, таким образом, что последовательность нРНК функционально связана с транскрибирующим элементом, который соответствует индуцируемому промотору РНК-полимеразы.

[00308] В некоторых вариантах осуществления системы индуцируемой экспрессии, которые можно использовать для контроля уровня РНК иммуносупрессивного фактора, включают, но не ограничиваются ими, системы индуцируемых лигандом факторов транскрипции, системы контроля опосредованной рецептором экспрессии, и регулируемые лигандом рибопереклюватели. В некоторых вариантах осуществления система индуцируемой экспрессии включает управляемую тетрациклином операторную систему, синтетическую систему на основе Notch (SynNotch) (см., например, Morsut et al., *Cell*, 2016, 164:780-791 и Yang et al., *Commun Biol*, 2020, 3:116), и рибопереклюватель, который регулирует экспрессию гена иммуносупрессивного фактора путем опосредованного лигандом (например, аптамером, пептидом или малой молекулой), опосредованного альтернативным сплайсингом полученной пре-мРНК. Полезные рибопереклюватели содержат сенсорную область и эффекторную область, которые способны распознавать присутствие лиганда и изменяют сплайсинг гена целевого иммуносупрессивного фактора. Подробные описания и примеры нРНК рибопереклювателя можно найти, например, US 9228207; US 9993491; и US 10421989; и Seeliger et al., *PLoS One*, 2012, 7(1):e29266; содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00309] В некоторых вариантах осуществления уровень иммуносупрессивного фактора, такого как CD47, в сконструированных клетках снижается с помощью защитного переключателя на уровне РНК примерно в 10 раз, 9 раз, 8 раз, 7 раз, 6 раз, 5 раз, 4 раза, 3 раза, 2 раза, 1 раз или в 0,5 раза ниже порогового уровня экспрессии. В некоторых вариантах осуществления уровень CD47 в сконструированных клетках снижается примерно в 10-5 раз, 10-3 раз, 9-1 раз, 8-1 раз, 7-0,5 раза, 6-1 раз, 5-0,5 раза, 4-0,5 раза, 3-0,5 раза, 2-0,5 раза или в 1-0,5 раза ниже порогового уровня экспрессии. В некоторых

случаях пороговый уровень экспрессии CD47 устанавливается на основе экзогенной экспрессии CD47 в индуцированной плюрипотентной стволовой клетке. В других случаях пороговый уровень экспрессии CD47 устанавливается на основе уровня экспрессии CD47 в соответствующей гипоиммунной клетке, такой как нокаутная по MHC I и MHC II клетка или нокаутная по MHC I/MHC II/TCR клетка.

3. Контроль уровня ДНК

[00310] Транскрипционная регуляция иммуносупрессивных факторов посредством использования индуцируемых промоторов обеспечивает возможность включать или выключать экспрессию переключателя по желанию посредством добавления или удаления малых молекул, таких как доксициклин, но не ограничиваясь ими. Генетическое нарушение с помощью направленной нуклеазной активности может устранить экспрессию иммуносупрессивного фактора, чтобы также демаскировать клетки.

[00311] В некоторых вариантах осуществления способы индуцируемой регуляции ДНК включают, помимо прочего, использование тканеспецифичных промоторов, индуцируемых промоторов, контролируемых рибопереключателей и нокаут с использованием индуцибельной нуклеазы (например, индуцируемых CRISPR, индуцируемых TALEN, индуцируемых нуклеаз с цинковыми пальцами, индуцируемых хоминг эндонуклеаз, индуцируемые мегануклеазы и т.п.) для нацеливания на последовательность ДНК одного или более иммуносупрессивных факторов. В некоторых вариантах осуществления индуцируемая нуклеаза включает нуклеазу, экспрессия которой контролируется присутствием малой молекулы. В некоторых вариантах осуществления индуцируемая нуклеаза включает нуклеазу, так что доставка нуклеазной РНК или белка в клетки контролируется присутствием малой молекулы. В некоторых вариантах осуществления экспрессия нуклеазы индуцируется малой молекулой или биологическим агентом. В некоторых вариантах осуществления экспрессия нуклеазы Cas и/или направляющей РНК (нРНК) индуцируется малой молекулой или биологическим агентом.

[00312] В некоторых вариантах осуществления способы индуцируемой экспрессии включают, но не ограничиваются ими, системы индуцируемых лигандом факторов транскрипции (например, контролируемую тетрациклином операторную систему), рецептор-опосредованную систему контроля экспрессии (например, систему SynNotch) и регулируемую лигандом систему на основе рибопереключателя для контроля активности мРНК или нРНК. Подробное описание способов индуцируемой экспрессии можно найти, например, в Kallunki et al., Cells, 2019, 796 (doi:10.3390/cells8080796), которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00313] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивные факторы экспрессируются в клетке с использованием индуцируемого вектора экспрессии. Вектор экспрессии может быть вирусным вектором, таким как, но не ограничиваясь этим, лентивирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления индуцируемые иммуносупрессивные факторы, описанные в данном документе, вводят в клетку путем лентивирусной трансдукции.

[00314] В некоторых вариантах осуществления сайленсинг конструкции, кодирующей иммуносупрессивный фактор, приводит к уничтожению сконструированной клетки иммунной системой субъекта-реципиента. Кроме того, конструкция, содержащая иммуносупрессивный фактор и систему индуцируемой экспрессии, может быть интегрирована в эндогенный генный локус для обеспечения экспрессии кассеты, так как сайленсинг гена приведет к уничтожению сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления эндогенный генный локус, пригодный для интеграции, представляет собой основной локус основного гена или локус гена иммунного сигнального фактора. Неограничивающие примеры основного локуса основного гена для такой интеграции включают RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn11, Psm14 и PSMA3. Неограничивающие примеры локуса гена иммунного сигнального фактора для такой интеграции включают B2M, MIC-A/B, HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFXANK, CTLA4, PD1 и лиганды NKG2D (например, MICA, MICB, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1/ULBP1, RAET1L/ULBP6 и RAET1N/ULBP3).

[00315] В иллюстративном варианте осуществления условная экспрессия иммуносупрессивного фактора основана на регуляции экспрессии иммунорегуляторного фактора CD47. CD47 является компонентом врожденной иммунной системы, который действует как сигнал «не ешь меня» как часть врожденной иммунной системы для блокирования фагоцитоза макрофагами. Полезные иммуносупрессивные факторы, которые можно сконструировать для контролируемой экспрессии, включают, но не ограничиваются ими, CD47, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, CI-ингибитор, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CCL21 и Mfge8.

[00316] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения стволовой клетки (например, гипои иммуногенной плюрипотентной стволовой клетки или гипои иммуногенной индуцированной плюрипотентной стволовой клетки) или ее дифференцированной клетки, которая была модифицирована для условной экспрессии любого из иммуносупрессивных факторов, выбранных из группы, состоящей из CD47, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, CI-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CCL21 и Mfge8. В других вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор выбран из группы, состоящей из HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFX-ANK, CIITA, NFY-A, NLRC5, B2M, RFX5, RFX-AP, HLA-G, HLA-E, NFY-B, PD-L1, NFY-C, IRF1, TAP1, GITR, 4-1BB, CD28, B7-1, CD47, B7-2, OX40, CD27, HVEM, SLAM, CD226, ICOS, LAG3, TIGIT, TIM3, CD160, BTLA, CD244, LFA-1, ST2, HLA-F, CD30, B7-H3, VISTA, TLT, PD-L2, CD58, CD2, и HELIOS.

[00317] В некоторых вариантах осуществления клетки условно экспрессируют один или более иммуносупрессивных факторов, так что в отсутствие экзогенного контролирующего сигнала клетки являются гипои иммуногенными или имеют сниженную гипои иммуногенность. В присутствии экзогенного контролирующего сигнала клетки распознаются иммунными клетками и становятся мишенями для индукции гибели или

клиренса клеток. В некоторых случаях клетки НР экспрессируют иммуносупрессивный фактор, функция которого позволяет клетке НР уклоняться от иммунного ответа субъекта-реципиента. При воздействии на клетки НР экзогенного контролирующего сигнала экспрессия (например, экспрессия на уровне ДНК, экспрессия на уровне РНК или экспрессия на уровне белка) иммуносупрессивного фактора подавляется, и, таким образом, клетки НР распознаются врожденной иммунной системой субъекта-реципиента. Таким образом, клетки НР подвергаются клеточной гибели и/или клеточному клиренсу у реципиента.

[00318] В некоторых вариантах осуществления уровень иммуносупрессивного фактора, такого как CD47, в сконструированных клетках снижается с помощью защитного переключателя на уровне ДНК примерно в 10 раз, 9 раз, 8 раз, 7 раз, 6 раз, 5 раз, 4 раза, 3 раза, 2 раза, 1 раз или в 0,5 раза ниже порогового уровня экспрессии. В некоторых вариантах осуществления уровень CD47 в сконструированных клетках снижается примерно в 10-5 раз, 10-3 раз, 9-1 раз, 8-1 раз, 7-0,5 раза, 6-1 раз, 5-0,5 раза, 4-0,5 раза, 3-0,5 раза, 2-0,5 раза или в 1-0,5 раза ниже порогового уровня экспрессии. В некоторых случаях пороговый уровень экспрессии CD47 устанавливается на основе экзогенной экспрессии CD47 в индуцированной плюрипотентной стволовой клетке. В других случаях пороговый уровень экспрессии CD47 устанавливается на основе уровня экспрессии CD47 в соответствующей гипоиммунной клетке, такой как нокаутная по MHC I и MHC II клетка или нокаутная по MHC I/MHC II/TCR клетка.

В. Условные клетки НР и способы условного повышения экспрессии иммунных сигнальных факторов

[00319] В данном документе описаны способы контролируемой экспрессии иммунного сигнального фактора для увеличения экспрессии фактора для изменения гипоиμмогенности клетки. Также описаны клетки НР, имеющие контролируемую экспрессию одного или более иммунных сигнальных факторов. В некоторых аспектах иммунный сигнальный фактор выбран из группы, состоящей из B2M, MIC-A/B, HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFXANK, CTLA-4, PD-1, и лигандов NKG2D (*например*, MICA, MICB, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1I/ULBP1, RAET1L/ULBP6, и RAET1N/ULBP3).

[00320] Контролируемая экспрессия одного или более иммунных сигнальных факторов может быть обеспечена посредством системы стабилизации индуцируемого лиганда с использованием дегрона, системы индуцируемого повышения экспрессии РНК (*например*, индуцируемой активации CRISPR) и системы индуцируемой активации ДНК. В некоторых вариантах осуществления система индуцируемого повышения экспрессии ДНК включает индуцируемую активацию CRISPR (CRISPRa), тканеспецифические промоторы, индуцируемые промоторы и рибопереключателы.

[00321] Подробное описание методов CRISPRa можно найти, *например*, в публикации Engreitz et al., Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019, 11:a035386, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Подробные описания и

примеры индуцируемых рибопереклюкателей можно найти, например, в US 9228207; US 9993491; и US 10421989; и Seeliger et al., PLoS One, 2012, 7(1):e29266; содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

С. Бицистронные конструкции для экспрессии защитных переключателей и целевых факторов

[00322] В данном документе описана система для связывания экспрессии защитного переключателя с экспрессией целевого фактора (например, фактора гипои́ммунитета или основного клеточного фактора) в клетках, тем самым обеспечивая клиренс клеток с подавленной экспрессией защитного переключателя. При помещении защитного переключателя 5' к гену, кодирующему целевой фактор (например, фактор гипои́ммунитета или основной клеточный фактор), событие сайленсинга или мутация, которые нарушают экспрессию защитного переключателя, также нарушат экспрессию целевого фактора (например, фактор гипои́ммунитета или основной клеточный фактор), тем самым делая мутированные клетки нежизнеспособными и подвергая их апоптозу.

[00323] Ключевым компонентом бицистронной конструкции по настоящей технологии является защитный переключатель, который убивает клетку, содержащую конструкцию, в присутствии лекарственного средства или пролекарства. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гипои́ммуногенным клеткам (например, стволовым клеткам НР или их дифференцированным клеткам), которые содержат «суицидальный ген» (или «суицидальный переключатель»). Суицидальный ген включен, чтобы функционировать как «защитный переключатель», который может вызвать гибель гипои́ммуногенных клеток, если они будут расти и делиться нежелательным образом. Подход к удалению суицидального гена включает суицидальный ген в векторе для переноса генов, кодирующем белок, который приводит к гибели клеток только при активации определенным соединением. Суицидальный ген может кодировать фермент, избирательно превращающий нетоксичное соединение в высокотоксичные метаболиты.

[00324] В данном документе предложены бицистронные конструкции для коэкспрессии защитного переключателя (например, защитного белка) и целевого фактора, такого как фактор гипои́ммунитета или основной клеточный фактор. В некоторых вариантах осуществления совместная экспрессия защитного переключателя и гипои́ммунной молекулы достигается посредством экспрессии полицистронного транскрипта, в результате чего целевой фактор и защитный переключатель разделены последовательностью проскока рибосом. В некоторых вариантах осуществления экспрессия конструкции (например, кассеты) регулируется либо промотором в случае регуляции транскрипции, независимой от расположения в геноме, либо акцептором сплайсинга для обеспечения регуляции полезной нагрузки (например, защитного переключателя и целевого фактора) или с помощью эндогенного промотора после интеграции конструкции в выбранный целевой ген.

[00325] В некоторых вариантах осуществления трансген защитного переключателя

конструкции выбран из группы, состоящей из гена HSVtk, гена цитозиндезаминазы, гена нитроредуктазы, гена пурииннуклеозидфосфорилазы, гена пероксидазы хрена, гена iCaspase9, трансгена HER1, трансгена RQR8, трансгена CD20, трансгена CCR4, трансгена CD19, трансгена MUC1, трансгена EGFR, трансгена HER2, трансгена GD2, трансгена PSMA, трансгена CD16 и трансгена CD30. В некоторых вариантах осуществления трансген HER1, трансген RQR8, трансген CD20, трансген CCR4, трансген HER2, трансген CD19, трансген MUC1, трансген EGFR, трансген GD2, трансген PSMA, трансген CD16 или трансген CD30 содержат их эпитоп. В некоторых случаях трансген содержит ген, кодирующий эпитоп, выбранный из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа HER2, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30. В некоторых вариантах осуществления трансген содержит эпитоп, который связывается с продуктом гена CD20 и распознается терапевтическим антителом к CD20, выбранным из группы, состоящей из обинутумаба, ублитуксимаба, окаратумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RLib и их биоаналогов; терапевтическое антитело к CCR4, выбранное из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; терапевтическое антитело к HER2, выбранное из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; терапевтическое антитело к CD19, выбранное из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; терапевтическое антитело к MUC1, выбранное из группы, состоящей из гатипотумаба и его биоаналогов; терапевтическое антитело к EGFR, выбранное из группы, состоящей из томизотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; терапевтическое антитело к GD2, выбранное из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, c.60C3-RLlc и их биоаналогов; терапевтическое антитело к PSMA, выбранное из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; терапевтическое антитело к CD30 или к CD16, выбранное из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или терапевтическое антитело к CD20 или к CD16, выбранное из группы, состоящей из (CD20)2xCD16 и их биоаналогов.

[00326] Описания защитных переключателей и их применения описаны в Duszgune, N. (2019) *Origins of Suicide Gene Therapy*. In: Duszgune N. (eds) *Suicide Gene Therapy. Methods in Molecular Biology*, vol 1895. Humana Press, New York, NY (для HSVtk, цитозиндезаминазы, нитроредуктазы, пурииннуклеозидфосфорилазы и пероксидазы хрена); Zhou and Brenner, *Exp Hematol*, 2016, 44(11):1013-1019 (для iCaspase9); Wang et al., *Blood*, 2001, 18(5), 1255- 1263 (для huEGFR); US20180002397 (для HER1); и Philip et al., *Blood*, 2014, 124(8), 1277- 1287 (для RQR8).

[00327] В некоторых случаях в конструкцию включают ген тимидилатсинтазы или его мутант. Например, клетки, экспрессирующие тимидилатсинтазу, чувствительны к некоторым пролекарствам, включая ганцикловир. Экспрессия тимидилатсинтазы в клетке делает клетку чувствительной к пролекарству ганцикловир. В другом варианте осуществления включен ген CD20. Клетки, которые являются положительными по CD20, могут быть уничтожены путем обработки антителом к CD20 (например, ритуксимабом

или его биоаналогом или заменителем). В некоторых случаях трансген HSVtk контролируется экзогенным фактором ганцикловиром. В некоторых случаях трансген цитозиндезаминазы контролируется экзогенным фактором 5-фторцитозином. В некоторых случаях трансген нитроредуктазы контролируется экзогенным фактором CB1954. В некоторых случаях трансген пуриннуклеозидфосфорилазы контролируется экзогенным фактором 6-метилпуриндезоксирибозидом или флударабином. В некоторых случаях трансген пероксидазы хрена контролируется экзогенным фактором индол-3-уксусной кислотой.

[00328] В некоторых случаях трансген iCaspase9 контролируется экзогенным фактором римидуцидом (AP1903), AP20187 или рапамицином. В некоторых случаях укороченный трансген EGFR человека (например, EGFRt) контролируется экзогенным антителом цетуксимабом или его вариантом, который распознает такой же или подобный эпитоп. В некоторых случаях трансген HER1 человека контролируется экзогенным антителом цетуксимабом или его вариантом, который распознает такой же или подобный эпитоп. В некоторых случаях трансген RQR8 человека контролируется экзогенным антителом ритуксимабом или его вариантом, который распознает такой же или подобный эпитоп.

[00329] В некоторых вариантах осуществления продукт гена CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутумаба, ублитумаба, окаратумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RLib и их биоаналогов; продукт гена CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; продукт гена HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетумаба, трастуумаба, TrasGEX и их биоаналогов; продукт гена CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; продукт гена MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотумаба и его биоаналогов; продукт гена EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томузотумаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; продукт гена GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4. 18K322A, Hul4. 18-IL2, Hu3F8, динитумаба, c.60C3-RL1c и их биоаналогов; продукт гена PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; продукт гена CD30 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или продукт гена CD20 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2xCD16 и его биоаналогов.

[00330] В некоторых вариантах осуществления трансген защитного переключателя представляет собой индуцируемый белок каспазы. Индуцируемый белок каспазы включает по меньшей мере часть белка каспазы, способного индуцировать апоптоз. Во многих вариантах осуществления индуцируемый белок каспазы представляет собой

iCasp9. В некоторых случаях iCasp9 включает последовательность белка, связывающего FK506 человека, FKBP12, с мутацией F36V, связанной серией аминокислот с геном, кодирующим каспазу 9 человека. FKBP12-F36V с высокой аффинностью связывается с низкомолекулярным димеризующим агентом, римидуцидом или AP1 903. Таким образом, суицидальная функция iCasp9 запускается введением химического индуктора димеризации (CID). В некоторых вариантах осуществления CID представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство AP1903. Димеризация вызывает быструю индукцию апоптоза. См., например, WO2011146862; Stasi et al, N. Engl. J. Med 365;18 (2011); Tey et al, Biol. Blood Marrow Transplant. 13:913-924 (2007), каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

[00331] В некоторых вариантах осуществления трансген защитного переключателя представляет собой защитный переключатель, зависящий от антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC). В некоторых случаях трансген защитного переключателя содержит фрагмент или эпитоп EGFR, фрагмент или эпитоп CD20 или фрагмент или эпитоп CD19.

[00332] В некоторых случаях защитный переключатель человеческого EGFR контролируется антителом цетуксимабом, его вариантом, который распознает такой же или подобный эпитоп, или другим антителом к EGFR. В некоторых случаях защитный переключатель человеческого CD19 контролируется антителом бевацизумабом, его вариантом, который распознает тот же самый или подобный эпитоп, или другим антителом к CD19. В некоторых случаях защитный переключатель человеческого CD20 контролируется антителом ритуксимабом, его вариантом, который распознает такой же или подобный эпитоп, или другим антителом к CD20.

[00333] В некоторых вариантах осуществления защитный переключатель коэкспрессируется с фактором гипои́ммунитета, выбранным из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, и Mfge8. В некоторых вариантах осуществления фактор гипои́ммунитета представляет собой CD47.

[00334] В некоторых случаях бицистронная конструкция также включает природный или синтетический терминатор. Например, охваченные для применения в описанных в настоящее время конструкциях включают любой из терминаторов, идентифицированных и описанных в Chen et al., Nature Methods, 2013, 10, 659-664, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления терминатор расположен на 3'-конце экспрессионной конструкции. В некоторых вариантах осуществления терминатор функционально связан с целевым геном фактора (например, геном фактора гипои́ммунитета или геном основного клеточного фактора).

[00335] В некоторых случаях бицистронная конструкция включает последовательность проскока рибосом, такую как, помимо прочего, последовательность,

кодирующую последовательность IRES, или последовательность, кодирующую 2А-кодирующую последовательность. Неограничивающие примеры саморасщепляющейся 2А-кодирующей последовательности включают Т2А, Р2А, Е2А и F2А. Примеры последовательностей пептидов Т2А, Р2А, Е2А и F2А показаны в таблице 2.

[00336] В некоторых случаях бицистронная конструкция включает линкер, например, пептидный линкер, гибкий линкер и т.п., расположенный между защитным переключателем и целевым фактором. Примеры линкеров представлены в таблице 2.

[00337] В некоторых вариантах осуществления бицистронная конструкция включает элемент регуляции транскрипции. В некоторых случаях элемент регуляции транскрипции контролирует экспрессию защитного переключателя и фактора гипоиимунитета. В некоторых вариантах осуществления элемент регуляции транскрипции представляет собой промотор или акцептор сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор, выбранный из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC. Примеры последовательностей конститутивных промоторов представлены в таблице 4.

[00338] В некоторых вариантах осуществления бицистронная конструкция предназначена для лентивирусной экспрессии. В данном документе предусмотрены лентивирусные векторы, содержащие описанную бицистронную конструкцию. Пригодный остов лентивирусного вектора выбран в соответствии с типами трансдуцируемых клеток.

[00339] В данном документе предложены бицистронные конструкции, которые включают трансген защитного переключателя, функционально связанный с последовательностью проскока рибосомы, и/или последовательность, кодирующую линкер, который функционально связан с геном, кодирующим целевой фактор (например, фактор гипоиимунитета или основной клеточный фактор). Например, отмечено, что размещение защитного переключателя 5' к гену фактора гипоиимунитета в бицистронном формате способствует тому, что событие сайленсинга, такое как мутация со сдвигом рамки считывания, которая инактивирует защитный переключатель, также инактивирует ген фактора гипоиимунитета. В некоторых вариантах осуществления экспрессия бицистронных конструкций регулируется конститутивным промотором, который функционально связан с трансгеном защитного переключателя, функционально связанным с последовательностью проскока рибосомы, и/или последовательностью, кодирующей линкер, который функционально связан с геном фактора гипоиимунитета. В некоторых вариантах осуществления конструкция также включает последовательность полиаденилирования на 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления конструкция включает природный или синтетический терминатор.

[00340] Также предложены бицистронные конструкции, которые включают ген фактора гипоиимунитета (или ген основного клеточного фактора), функционально

связанный с последовательностью проскока рибосом, или линкер, который функционально связан с трансгеном защитного переключателя. В некоторых случаях мутация со сдвигом рамки считывания в защитном переключателе не инактивирует фактор гипоиимунитета (или основной клеточный фактор) в этом бицистронном формате. В некоторых вариантах осуществления экспрессия бицистронных конструкций регулируется конститутивным промотором, который функционально связан с геном целевого фактора, функционально связанным с последовательностью проскока рибосомы, или линкером, который функционально связан с трансгеном защитного переключателя. В некоторых вариантах осуществления конструкция также включает последовательность полиаденилирования на 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления конструкция включает природный или синтетический терминатор.

[00341] Для всех этих технологий используются хорошо известные рекомбинантные методы получения рекомбинантных нуклеиновых кислот, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из факторов, описанных в данном документе, могут быть функционально связаны с одной или более регуляторными нуклеотидными последовательностями в экспрессионной конструкции. Регуляторные нуклеотидные последовательности, как правило, подходят для клетки-хозяина и подлежат лечению. В данной области техники известны многочисленные типы подходящих векторов экспрессии и подходящих регуляторных последовательностей для различных клеток-хозяев. Как правило, одна или более регуляторных нуклеотидных последовательностей могут включать, но не ограничиваться ими, промоторные последовательности, лидерные или сигнальные последовательности, сайты связывания рибосом, последовательности начала и терминации транскрипции, последовательности начала и терминации трансляции и энхансерные или активаторные последовательности. Также рассматриваются конститутивные или индуцируемые промоторы, известные в данной области техники. Промоторы могут быть либо природными промоторами, либо гибридными промоторами, которые объединяют элементы более чем одного промотора. Экспрессионная конструкция может присутствовать в клетке на эписоме, такой как плаزمид, или экспрессионная конструкция может быть встроена в хромосому. В конкретном варианте осуществления вектор экспрессии включает селектируемый маркерный ген, позволяющий осуществлять отбор трансформированных клеток-хозяев. Некоторые варианты осуществления включают вектор экспрессии, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариантный полипептид, функционально связанный по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью. Регуляторные последовательности для использования в данном документе включают промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии предназначен для выбора трансформируемой клетки-хозяина, конкретного варианта полипептида, который желательно экспрессировать, количества копий вектора, способности контролировать это количество копий или экспрессии любого другого белка,

кодируемого вектором, например, антибиотических маркеров.

[00342] Примеры подходящих промоторов млекопитающих включают, например, промоторы следующих генов: промотор убиквитина/S27a хомяка (WO 97/15664), ранний промотор обезьяньего вакуолизирующего вируса 40 (SV40), главный поздний промотор аденовируса, промотор металлотионеина-I мыши, участок длинных терминальных повторов вируса саркомы Рауса (RSV), промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), участок длинных терминальных повторов вируса мышинного лейкоза Молони и ранний промотор цитомегаловируса человека (CMV). Примеры других гетерологичных промоторов млекопитающих включают промотор(-ы) актина, иммуноглобулина или теплового шока. В дополнительных вариантах осуществления промоторы для применения в клетках млекопитающих могут быть получены из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур (UK 2211504, опубликован 5 июля 1989 г.), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и обезьяний вирус 40 (SV40). Ранние и поздние промоторы SV40 удобно получать в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит точку начала репликации вируса SV40 (Fiers et al., Nature 273: 113-120 (1978)). Непосредственный ранний промотор цитомегаловируса человека удобно получать в виде фрагмента рестрикционного фермента HindIII (Greenaway et al., Gene 18: 355-360 (1982)). Вышеприведенные ссылки полностью включены посредством ссылки.

[00343] Процесс введения полинуклеотидов, описанных в данном документе, в клетки может осуществляться любым подходящим способом. Подходящие методы включают, но не ограничиваются ими, трансфекцию, опосредованную фосфатом кальция или липидом, электропорацию и трансдукцию или инфекцию с использованием вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды вводят в клетку посредством вирусной трансдукции (например, лентивирусной трансдукции). После изменения наличие экспрессии любой молекулы, описанной в данном документе, можно проанализировать с использованием известных методик, таких как вестерн-блоты, анализы на основе ИФА, анализы методом FACS и т.п.

[00344] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конструкции вводят в выделенные клетки, такие как выделенные клетки млекопитающих и выделенные клетки человека. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки, плюрипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, взрослые стволовые клетки или их дифференцированные клетки. В некоторых случаях клетки гипоиммуногенны. Гипоиммуногенные клетки и способы их получения описаны в данном документе.

D. Гомологичная репарация (HDR) защитных переключателей и целевых факторов

[00345] В некоторых аспектах конструкция, предназначенная для коэкспрессии защитного переключателя (например, дегрона и т.п.) и целевого фактора (например,

иммуносупрессивного фактора или основного клеточного фактора) в виде одного транскрипта мРНК, вводится в эндогенный локус посредством гомологичной репарации (HDR). В этой конфигурации вставленные элементы нарушают эндогенную кодирующую последовательность. В некоторых вариантах осуществления эндогенный локус представляет собой локус гена основного клеточного фактора. В таких случаях введенная тандемная конструкция, экспрессируемая под контролем эндогенного промотора, компенсирует делецию гена основного клеточного фактора и создает созависимость от экспрессии защитного переключателя. В некоторых случаях нокин защитного переключателя в основной ген позволяет избежать давления экспрессии.

[00346] В некоторых вариантах осуществления конструкцию, содержащую промотор и бицистронную экспрессионную конструкцию, вводят с помощью HDR в геномный локус, такой как локус «безопасная гавань», локус гена иммунного сигналинга или локус гена основного клеточного фактора с последующим биаллельным нокаутом эндогенного гена основного клеточного фактора (или, в некоторых случаях, гена, кодирующего иммуносупрессивный фактор) с использованием направленной нуклеазы. В этой конфигурации молчащие мутации в последовательности, кодирующей ген основного клеточного фактора, вводят в бицистронную конструкцию для придания устойчивости к расщеплению нуклеазой. Введенная конструкция тандемной экспрессии компенсирует делецию гена основного клеточного фактора и создает созависимость от экспрессии защитного переключателя.

[00347] В некоторых вариантах осуществления конструкция для HDR в локус «безопасная гавань» содержит: первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань»; трансген защитного переключателя; последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; ген иммуносупрессивного фактора (или ген основного клеточного фактора); последовательность полиаденилирования; и второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань». В некоторых вариантах осуществления конструкция для HDR в локусе гена иммунного сигналинга содержит: первое плечо гомологии, гомологичную первую эндогенную последовательности гена иммунного сигналинга; трансген защитного переключателя; последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; ген иммуносупрессивного фактора; последовательность полиаденилирования; и второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга. В некоторых вариантах осуществления конструкция для HDR в локусе гена основного клеточного фактора содержит: первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса гена основного клеточного фактора; трансген защитного переключателя; последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; ген иммуносупрессивного фактора; последовательность полиаденилирования; и второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса гена основного клеточного фактора. В

некоторых случаях элемент регуляции транскрипции расположен на 5'-конце трансгена защитного переключателя.

[00348] В некоторых вариантах осуществления элемент регуляции транскрипции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS (также известного как промотор CAG), промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[00349] В некоторых вариантах осуществления трансген защитного переключателя конструкции выбран из группы, состоящей из гена HSVtk, гена цитозиндезаминазы, гена нитроредуктазы, гена пурииннуклеозидфосфорилазы, гена пероксидазы хрена, гена iCaspase9, трансгена HER1, трансгена RQR8, трансгена CD20, трансгена CCR4, трансгена HER2, трансгена CD19, трансгена MUC1, трансгена EGFR, трансгена GD2, трансгена PSMA, трансгена CD16 и трансгена CD30.

[00350] Как описано выше, иммуносупрессивный фактор может представлять собой, но не ограничиваться ими, CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелую цепь HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, Ил-10, Ил-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8. В некоторых случаях основной клеточный фактор может представлять собой Rps2, Rps9, Rps11, Rps13, Rps18, Rpl8, Rpl11, Rpl32, Rpl36, Rpn22, Psm14, PSMA3, субъединицу рибосомы, субъединицу протеасомы и субъединицу сплайсосомы. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор, такой как CD47, вместе с трансгеном защитного переключателя вводят в ген, кодирующий основной клеточный фактор, чтобы ослабить сайленсинг гена основного клеточного фактора. В некоторых случаях ген кодирует основной клеточный фактор, выбранный из группы, состоящей из субъединицы протеасомы Psm14, субъединицы рибосомы Rps2 и субъединицы рибосомы Rpl32.

[00351] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер, гибкий линкер и т.п., расположенный между защитным переключателем и фактором гипоиимунитета. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер, гибкий линкер и т.п., расположенный между защитным переключателем и основным клеточным фактором. Примеры линкеров представлены в таблице 2.

[00352] В некоторых вариантах осуществления последовательность проскока рибосом содержит последовательность, кодирующую последовательность IRES, или последовательность, кодирующую 2А-кодирующую последовательность. Неограничивающие примеры саморасщепляющейся 2А-кодирующей последовательности включают T2A, P2A, E2A и F2A. Примеры последовательностей пептидов T2A, P2A, E2A и F2A показаны в таблице 2.

[00353] В некоторых вариантах осуществления направленной интеграции locus «безопасная гавань» выбран из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5. Во многих вариантах осуществления locus «безопасная гавань» представляет собой locus CLBYL или locus CCR5. В некоторых

вариантах осуществления локус гена иммунного сигналинга выбран из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, RFXANK, CIITA, CTLA4, PD1 и лигандов NKG2D (например, MICA, MICB, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1/ULBP1, RAET1L/ULBP6 и RAET1N/ULBP3). В некоторых вариантах осуществления локус основного клеточного фактора выбран из группы, состоящей из локуса гена RpS2, локуса гена RpS9, локуса гена RpS11, локуса гена RpS13, локуса гена RpS18, локуса гена RpL8, локуса гена RpL11, локуса гена RpL32, локуса гена RpL36, локуса гена Rpn22, локуса гена Psm14, локуса гена PSMA3, локуса гена субъединицы рибосомы, локуса гена субъединицы протеасомы и локуса гена субъединицы сплайсосомы.

[00354] Направленная интеграция защитного переключателя и иммуносупрессивного фактора в выбранный локус может быть достигнута с использованием технологии направленных нуклеаз, такой как способы на основе CRISPR и не на основе CRISPR, описанные в данном документе..

[00355] В данном документе описаны клетки, экспрессирующие защитный переключатель и иммуносупрессивный фактор в локусе «безопасная гавань». Также предложены клетки, экспрессирующие защитный переключатель и иммуносупрессивный фактор в локусе гена иммунного сигналинга. Экспрессия защитного переключателя связана с экспрессией иммуносупрессивного фактора в жизнеспособных клетках. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой клетки млекопитающих и выделенные клетки человека. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки, плюрипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, взрослые стволовые клетки или их дифференцированные клетки. В некоторых случаях клетки гипоиммуногенны. Гипоиммуногенные клетки и способы их получения описаны в данном документе.

[00356] В некоторых аспектах предложена независимая от гомологии донорная конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: 5'-длинные концевые повторы (LTR), содержащие левый элемент (LE); элемент акцептор сплайсинга-вирусный пептид 2A (SA-2A); трансген защитного переключателя; последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; ген иммуносупрессивного фактора; последовательность полиаденилирования; и 3' LTR, содержащий правый элемент (RE). В некоторых вариантах осуществления конструкцию вводят в клетку посредством Cas9-индуцированной HDR. В некоторых вариантах осуществления конструкцию вводят в клетку путем независимой от гомологии интеграции.

[00357] Также предложена независимая от гомологии донорная конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: 5'-концевые длинные повторы (LTR), содержащие левый элемент (LE); элемент акцептор сплайсинга-вирусный пептид 2A (SA-2A); ген фактора гипоиммунитета; последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; трансген защитного переключателя; последовательность

полиаденилирования; и 3' LTR, содержащий правый элемент (RE). В некоторых вариантах осуществления конструкцию вводят в клетку посредством Cas9-индуцированной HDR. В некоторых вариантах осуществления конструкцию вводят в клетку путем независимой от гомологии интеграции.

[00358] В некоторых вариантах осуществления любую из описанных конструкций вводят в выделенные клетки, такие как выделенные клетки млекопитающих и выделенные клетки человека. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки, плюрипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, взрослые стволовые клетки или их дифференцированные клетки. В некоторых случаях клетки гипоиммуногенны. Гипоиммуногенные клетки и способы их получения описаны в данном документе.

Е. Слитые белки фактор гипоиммунитета - защитный переключатель

[00359] АЗКЦ и КЗЦ реализуются при помощи иммунных эффекторных клеток путем распознавания антител, связанных с внеклеточной поверхностью клетки. АЗКЦ/КЗЦ активируется экспрессией эпитопа, распознаваемого антителами. Таким образом, эта система может действовать как эффективный защитный переключатель. В данном документе предложен слитый белок, содержащий эпитоп и гипоиммунную молекулу. Слитый белок обеспечивает надежность в отношении элиминации сконструированных гипоиммунных клеток. Пептидные эпитопы, такие как фрагмент CD20, распознаваемый ритуксимабом (называемый «мимотопом CD20»), связаны с внеклеточными или связанными с мембраной гипоиммунными молекулами, такими как, но не ограничиваясь ими, CD47.

[00360] В некоторых вариантах осуществления гибридный белок содержит фактор гипоиммунитета и пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит фактор гипоиммунитета, пептидный эпитоп и линкер.

[00361] В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к С-концу: фактор гипоиммунитета и пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к С-концу: пептидный эпитоп и фактор гипоиммунитета. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: фактор гипоиммунитета; линкер; и пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: пептидный эпитоп; линкер; и фактор гипоиммунитета.

[00362] В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: линкер; фактор гипоиммунитета; линкер; и пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: фактор гипоиммунитета; линкер; пептидный эпитоп; и линкер. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: линкер; пептидный эпитоп; линкер; и фактор гипоиммунитета, и линкер.

[00363] В одном варианте осуществления слитый белок содержит от N-конца к С-концу: экспонированный на поверхности эпитоп CD20 человека, и фактор

гипоиммунитета. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: экспонированный на поверхности эпитоп CD20 человека, линкер и фактор гипоиммунитета. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: линкер, экспонированный на поверхности эпитоп CD20, линкер и фактор гипоиммунитета. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: экспонированный на поверхности эпитоп CD20, линкер, фактор гипоиммунитета и линкер. В конкретных вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к С-концу: фактор гипоиммунитета и экспонированный на поверхности эпитоп человеческого CD20. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: фактор гипоиммунитета, линкер и экспонированный на поверхности эпитоп CD20 человека. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: линкер, фактор гипоиммунитета, линкер и экспонированный на поверхности эпитоп CD20 человека. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: фактор гипоиммунитета, линкер, экспонированный на поверхности эпитоп CD20 человека и линкер.

[00364] В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: необязательный линкер; эпитоп CD20 человека; необязательный линкер; и фактор гипоиммунитета. В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 человека распознается ритуксимабом, его вариантом или другим антителом к CD20. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: необязательный линкер; эпитоп CD19 человека; необязательный линкер; и фактор гипоиммунитета. В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD19 человека распознается бевацизумабом, его вариантом или другим антителом к CD19. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: необязательный линкер; эпитоп EGFR человека; необязательный линкер; и фактор гипоиммунитета. В некоторых вариантах осуществления эпитоп EGFR человека распознается цетуксимабом, его вариантом или другим антителом к EGFR. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: необязательный линкер; эпитоп CCR4 человека; необязательный линкер; и фактор гипоиммунитета. В некоторых вариантах осуществления эпитоп CCR4 человека распознается антителом к CCR4. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: необязательный линкер; эпитоп MUC1 человека; необязательный линкер; и фактор гипоиммунитета. В некоторых вариантах осуществления эпитоп MUC1 человека распознается антителом к MUC1. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: необязательный линкер; эпитоп CD16 человека или эпитоп CD30 человека; необязательный линкер; и фактор гипоиммунитета. В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD30 человека распознается антителом к CD30 или его биспецифическим антителом. В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD16 человека распознается антителом к CD16 или его биспецифическим антителом. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу:

необязательный линкер; эпитоп CD20 человека или эпитоп CD16 человека; необязательный линкер; и фактор гипоиммунитета. В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 человека распознается антителом к CD20 или его биспецифическим антителом. В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD16 человека распознается антителом к CD16 или его биспецифическим антителом. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: необязательный линкер; эпитоп PSMA человека; необязательный линкер; и фактор гипоиммунитета. В некоторых вариантах осуществления эпитоп PSMA человека распознается антителом к PSMA. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: необязательный линкер; эпитоп GD2 человека; необязательный линкер; и фактор гипоиммунитета. В некоторых вариантах осуществления эпитоп GD2 человека распознается антителом к GD2. В других вариантах осуществления порядок пептидного эпитопа и фактора гипоиммунитета обращен.

[00365] В других вариантах осуществления слитый белок содержит от N- к С-концу: фрагмент CD47 человека, содержащий домен IgV CD47; линкер; пептидный эпитоп; линкер; и трансмембранный домен CD47 человека.

[00366] В другом аспекте в данном документе предложена бицистронная конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: элемент регуляции транскрипции; последовательность, кодирующую пептидный эпитоп; последовательность проскока рибосом; и последовательность, кодирующую фактор гипоиммунитета. В некоторых вариантах осуществления пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа HER2, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

[00367] В некоторых вариантах осуществления фактор гипоиммунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, Mfge8 и их мембраносвязанных форм. В определенных вариантах осуществления фактор гипоиммунитета представляет собой CD47. В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из одного из приведенных в таблице 2.

[00368] В некоторых вариантах осуществления любой из пептидных эпитопов выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа HER2, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

[00369] В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутумаба, ублитуксимаба, окаратумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов. В некоторых вариантах осуществления эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов. В некоторых вариантах осуществления эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX

и их биоаналогов. В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов. В некоторых вариантах осуществления эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотузумаба и его биоаналогов. В некоторых вариантах осуществления эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томизотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов. В некоторых вариантах осуществления эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hu14.18K322A, Hu14.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, c.60C3-RLic и их биоаналогов. В некоторых вариантах осуществления эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов. В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD30 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов. В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

[00370] Любая из описанных конструкций может быть введена в выделенные клетки, такие как выделенные клетки млекопитающих и выделенные клетки человека. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки, плюрипотентные стволовые клетки, взрослые стволовые клетки или их дифференцированные клетки. В некоторых случаях клетки гипоиммуногенны. Гипоиммуногенные клетки и способы их получения описаны в данном документе.

Г. Условные клетки НР с модифицированной экспрессией комплексов МНС I, МНС II и TCR

[00371] В одном аспекте настоящая технология, описанная в данном документе, направлена на использование защитного переключателя для регулирования экспрессии целевых факторов в плюрипотентных стволовых клетках (например, плюрипотентных стволовых клетках и индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (иПСК)), дифференцированных клетках, полученных из таких плюрипотентных стволовых клеток (например, гипоиммунных Т-клеток) и первичных Т-клеток. В некоторых вариантах реализации плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки, полученные из них, и первичные Т-клетки сконструированы для снижения экспрессии или устранения экспрессии антигенов лейкоцитов человека МНС класса I и МНС класса II. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, полученные из них дифференцированные клетки и первичные Т-клетки сконструированы для снижения экспрессии или устранения экспрессии человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и МНС класса II, а также для снижения экспрессии или устранения экспрессии одной или более комплексов Т-клеточного рецептора (TCR). В некоторых случаях устранение или снижение экспрессии антигенов МНС класса I, антигенов МНС класса II

и/или одного или более комплексов TCR достигается с помощью системы индуцируемой модификации генов

[00372] В некоторых аспектах настоящее изобретение обеспечивает плюрипотентные стволовые клетки (например, плюрипотентные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК)), дифференцированные клетки, полученные из таких плюрипотентных стволовых клеток (например, гипоиммунные Т-клетки), первичные Т-клетки и популяции, включающие геном, в котором ген был отредактирован для удаления непрерывного участка геномной ДНК, тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию молекул МНС класса I в клетках или их популяции. В определенных аспектах настоящее изобретение обеспечивает плюрипотентные стволовые клетки (например, плюрипотентные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК)), дифференцированные клетки, полученные из таких плюрипотентных стволовых клеток (например, гипоиммунные Т-клетки), первичные Т-клетки и популяции, включающие геном, в котором ген был отредактирован для удаления непрерывного участка геномной ДНК, тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию молекул МНС класса II в клетках или их популяции. В конкретных аспектах настоящее изобретение обеспечивает плюрипотентные стволовые клетки (например, плюрипотентные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК)), дифференцированные клетки, полученные из таких плюрипотентных стволовых клеток (например, гипоиммунные Т-клетки), первичные Т-клетки и популяции, включающие геном, в котором один или более генов были отредактированы для удаления непрерывного участка геномной ДНК, тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию молекул МНС класса I и II в клетках или их популяции. В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает плюрипотентные стволовые клетки (например, плюрипотентные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК)), дифференцированные клетки, полученные из таких плюрипотентных стволовых клеток (например, гипоиммунные Т-клетки), первичные Т-клетки и их популяции, включающие геном, в котором один или более генов были отредактированы для удаления непрерывного участка геномной ДНК, тем самым уменьшая или устраняя поверхностную экспрессию одного или более комплексов TCR в клетках или их популяции.

[00373] В некоторых вариантах осуществления клетки включают геномную модификацию одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию МНС I и/или МНС II. В некоторых аспектах, система генетического редактирования применяется для модификации одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой одну или более последовательностей, выбранных из группы, состоящей из B2M, CITA и NLRC5. В некоторых вариантах осуществления геном клетки был изменен для уменьшения или устранения экспрессии критических компонентов HLA. В дополнительных вариантах

осуществления клетки включают геномную модификацию одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей, которая регулирует экспрессию одного или более комплексов TCR. В некоторых аспектах, система генетического редактирования применяется для модификации одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой одну или более последовательностей, выбранных из группы, состоящей из TRAC и TRB.

[00374] В некоторых вариантах осуществления клетки и способы, описанные в данном документе, включают геномное редактирование клеток человека для расщепления последовательностей гена CITA, а также редактирование генома таких клеток для изменения одной или более дополнительных целевых полинуклеотидных последовательностей, таких как, но не ограничиваясь ими, B2M, NLRC5, TRAC, и TRB. В некоторых вариантах осуществления клетки и способы, описанные в данном документе, включают геномное редактирование клеток человека для расщепления последовательностей гена B2M, а также редактирование генома таких клеток для изменения одной или более дополнительных целевых полинуклеотидных последовательностей, таких как, но не ограничиваясь ими, CITA, NLRC5, TRAC, и TRB. В некоторых вариантах осуществления клетки и способы, описанные в данном документе, включают геномное редактирование клеток человека для расщепления последовательностей гена NLRC5, а также редактирование генома таких клеток для изменения одной или более дополнительных целевых полинуклеотидных последовательностей, таких как, но не ограничиваясь ими, B2M, CITA, TRAC и TRB. В некоторых вариантах осуществления клетки и способы, описанные в данном документе, включают геномное редактирование клеток человека для расщепления последовательностей гена TRAC, а также редактирование генома таких клеток для изменения одной или более дополнительных целевых полинуклеотидных последовательностей, таких как, но не ограничиваясь ими, B2M, CITA, NLRC5 и TRB. В некоторых вариантах осуществления клетки и способы, описанные в данном документе, включают геномное редактирование клеток человека для расщепления последовательностей гена TRB, а также редактирование генома таких клеток для изменения одной или более дополнительных целевых полинуклеотидных последовательностей, таких как, но не ограничиваясь ими, B2M, CITA, NLRC5 и TRAC.

[00375] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки, полученные из них, и первичные Т-клетки включают геномную модификацию гена B2M. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки, полученные из них, и первичные Т-клетки включают геномную модификацию гена CITA. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки, полученные из них, и первичные Т-клетки включают геномную модификацию гена TRAC. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки,

дифференцированные клетки, полученные из них, и первичные Т-клетки включают геномную модификацию гена TRB. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки, полученные из них, и первичные Т-клетки включают геномные модификации B2M и СИТА. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки, полученные из них, и первичные Т-клетки включают одну или более геномных модификаций, выбранных из группы, состоящей из генов B2M, СИТА и TRAC. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки, полученные из них, и первичные Т-клетки включают одну или более геномных модификаций, выбранных из группы, состоящей из генов B2M, СИТА и TRB. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки, полученные из них, и первичные Т-клетки включают одну или более геномных модификаций, выбранных из группы, состоящей из генов B2M, СИТА, TRAC и TRB. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой $B2M^{-/-}$, $СИТА^{-/-}$ клетки. Во многих вариантах осуществления клетки представляют собой $B2M^{-/-}$, $СИТА^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$ клетки. Во многих вариантах осуществления клетки представляют собой $B2M^{-/-}$, $СИТА^{-/-}$, $TRB^{-/-}$ клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой $B2M^{idel/idel}$, $СИТА^{idel/idel}$ клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой $B2M^{idel/idel}$, $СИТА^{idel/idel}$, $TRAC^{idel/idel}$ клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой $B2M^{idel/idel}$, $СИТА^{idel/idel}$, $TRB^{idel/idel}$ клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой $B2M^{idel/idel}$, $СИТА^{idel/idel}$, $TRAC^{idel/idel}$, $TRB^{idel/idel}$ клетки. В некоторых вариантах осуществления описанные модифицированные клетки представляют собой плюрипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, клетки, дифференцированные из таких плюрипотентных стволовых клеток, и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, или первичные Т-клетки. Неограничивающие примеры первичных Т-клеток включают CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, наивные Т-клетки, регуляторные Т-клетки (Treg), нерегуляторные Т-клетки, Th1-клетки, Th2-клетки, Th9-клетки, Th17-клетки, фолликулярные Т-хелперы (Tfh), цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), эффекторные Т-клетки (Teff), центральные Т-клетки памяти (Tern), эффекторные Т-клетки памяти (Tern), эффекторные Т-клетки памяти экспрессируют CD45RA (клетки TEMRA), резидентные клетки памяти (Tgm), Т-клетки виртуальной памяти, Т-клетки врожденной памяти, стволовые клетки памяти (Tse), $\gamma\delta$ Т-клетки и любые другие подтипы Т-клеток.

[00376] В некоторых вариантах осуществления один или более генов, выбранных из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, и HLA-DR в клетках инактивированы. Гены могут быть инактивированы с использованием зависимой от гомологии репарации или сайт-сайт-специфической нуклеазы. В некоторых вариантах осуществления один или оба аллеля гена инактивированы.

1. СИТА

[00377] В определенных аспектах настоящая технология модулирует (например, снижает или устраняет) экспрессию генов МНС II путем нацеливания и модулирования (например, снижения или устранения) экспрессии трансаактиватора класса II (СИТА). В некоторых аспектах модуляция достигается с помощью системы CRISPR/Cas. СИТА является членом семейства белков LR или нуклеотидсвязывающего домена (NBD), богатых лейцином повторов (LRR), и регулирует транскрипцию МНС II путем связывания с энхансосоной МНС.

[00378] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящей технологии представляет собой вариант СИТА. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность является гомологом СИТА. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность является ортологом СИТА.

[00379] В некоторых аспектах сниженная или устраненная экспрессия СИТА снижает или устраняет экспрессию одного или более из следующих МНС класса II: HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ и HLA-DR.

[00380] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат генные модификации в локусе гена, кодирующем белок СИТА. Другими словами, клетки содержат генетическую модификацию локуса СИТА. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая белок СИТА, представлена в RefSeq № NM_000246.4 и Genbank NCBI № U18259. В некоторых случаях локус гена СИТА описан в NCBI Gene ID № 4261. В некоторых случаях аминокислотная последовательность СИТА изображается как NCBI GenBank № AAA88861. 1. Дополнительные описания белка СИТА и локуса гена можно найти в Uniprot № P33076, HGNC Ref. № 7067, и OMIM Ref. № 600005.

[00381] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипои иммуногенные клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген СИТА. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеленная на ген СИТА редкощепящей эндонуклеазой, содержит белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность направляющей рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген СИТА. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна направляющая последовательность рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген СИТА выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5184-36352 таблицы 12 WO 2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00382] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген СИТА, известны и описаны в данном документе. В одном варианте осуществления результирующая генетическая модификация гена СИТА с помощью ПЦР и снижение экспрессии HLA-II

могут быть проанализированы с помощью анализа методом FACS. В другом варианте осуществления экспрессию белка СПТА определяют с помощью вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку СПТА. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

2. B2M

[00383] В некоторых вариантах осуществления технологии, описанные в данном документе, модулируют (например, снижают или устраняют) экспрессию генов МНС-I путем нацеливания и модулирования (например, снижения или устранения) экспрессии вспомогательной цепи B2M. В некоторых аспектах модуляция достигается с помощью системы CRISPR/Cas. Путем модулирования (например, снижения или удаления) экспрессии B2M блокируется перенос молекул МНС-I на поверхность, и клетка становится гипоиммуногенной. В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00384] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящей технологии представляет собой вариант B2M. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность является гомологом B2M. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность является ортологом B2M.

[00385] В некоторых аспектах снижение или устранение экспрессии B2M снижает или устраняет экспрессию одной или более из следующих молекул МНС I: HLA-A, HLA-B и HLA-C.

[00386] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат генные модификации в локусе гена, кодирующем белок B2M. Другими словами, клетки содержат генетическую модификацию локуса B2M. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая белок B2M, представлена в RefSeq. № NM_004048.4 и NCBI Gene ID № AB021288.1. В некоторых случаях локус гена B2M описан в NCBI Gene ID № 567. В определенных случаях аминокислотная последовательность B2M изображается как NCBI GenBank № BAA35182.1. Дополнительные описания белка B2M и локуса гена можно найти в Uniprot № P61769, HGNC Ref. № 914, и OMIM Ref. № 109700.

[00387] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген B2M. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеленная на ген B2M редкощепящей эндонуклеазой, содержит белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность направляющей рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген B2M. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна направляющая последовательность рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген B2M выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81240-85644 таблицы 15 WO 2016183041, которая

включена в данный документ посредством ссылки.

[00388] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген B2M, известны и описаны в данном документе. В одном варианте осуществления результирующая генетическая модификация гена B2M с помощью ПЦР и снижение экспрессии HLA-I могут быть проанализированы с помощью анализа методом FACS. В другом варианте осуществления экспрессию белка B2M определяют с помощью вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку B2M. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

3. NLRC5

[00389] В определенных аспектах настоящие технологии модулируют (например, уменьшают или устраняют) экспрессию генов MHC-I путем нацеливания и модулирования (например, уменьшения или устранения) экспрессии семейства NLR, домена CARD, содержащего 5/NOD27/CLR16.1 (NLRC5). В некоторых аспектах модуляция достигается с помощью системы CRISPR/Cas. NLRC5 является важным регулятором иммунных ответов, опосредованных MHC-I, и, подобно СИТА, NLRC5 в высокой степени индуцируется IFN- γ и может транслоцироваться в ядро. NLRC5 активирует промоторы генов MHC-I и индуцирует транскрипцию MHC-I, а также родственных генов, участвующих в презентации антигена MHC-I.

[00390] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящей технологии представляет собой вариант NLRC5. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность является гомологом NLRC5. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность является ортологом NLRC5.

[00391] В некоторых аспектах снижение или устранение экспрессии NLRC5 снижает или устраняет экспрессию одной или более из следующих молекул MHC I: HLA-A, HLA-B и HLA-C.

[00392] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген NLRC5. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеленная на ген NLRC5 редкощепящей эндонуклеазой, содержит белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность направляющей рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген NLRC5. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна направляющая последовательность рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген NLRC5 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:36353-81239 Приложения 3 (таблица 14 WO2016183041), представленной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00393] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген NLRC5, известны и

описаны в данном документе. В одном варианте осуществления результирующая генетическая модификация гена NLRC5 с помощью ПЦР и снижение экспрессии HLA-I могут быть проанализированы с помощью анализа методом FACS. В другом варианте осуществления экспрессию белка NLRC5 определяют с помощью вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку NLRC5. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

4. TRAC

[00394] В определенных вариантах осуществления технологии, описанные в данном документе, модулируют (например, снижают или устраняют) экспрессию генов TCR, включая ген TRAC, путем нацеливания и модулирования (например, снижения или устранения) экспрессии константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора. В некоторых аспектах модуляция достигается с использованием системы CRISPR/Cas. Путем модулирования (например, снижения или удаления) экспрессии TRAC блокируется перенос молекул TCR на поверхность. В некоторых вариантах осуществления клетка также обладает сниженной способностью индуцировать иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00395] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящей технологии представляет собой вариант TRAC. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность является гомологом TRAC. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность является ортологом TRAC.

[00396] В некоторых аспектах сниженная или устраненная экспрессия TRAC снижает или устраняет поверхностную экспрессию TCR.

[00397] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат генные модификации в локусе гена, кодирующем белок TRAC. Другими словами, клетки содержат генетическую модификацию локуса TRAC. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая белок TRAC, указана в Genbank № X02592.1. В некоторых случаях локус гена TRAC описан в RefSeq. № NG_001332.3 и NCBI Gene ID № 28755. В определенных случаях аминокислотная последовательность TRAC представлена как Uniprot № P01848. Дополнительные описания белка TRAC и локуса гена можно найти в Uniprot № P01848, HGNC Ref. № 12029, и OMIM Ref. № 186880.

[00398] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген TRAC. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеленная на ген TRAC редкощепящей эндонуклеазой, содержит белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность направляющей рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген TRAC. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна направляющая последовательность

рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген TRAC выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 532-609 и 9102-9797 из US 20160348073, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[00399] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген TRAC, известны и описаны в данном документе. В одном варианте осуществления результирующая генетическая модификация гена TRAC с помощью ПЦР и снижение экспрессии TCR могут быть проанализированы с помощью анализа методом FACS. В другом варианте осуществления экспрессию белка TRAC определяют с помощью вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку TRAC. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

5. TRB

[00400] В определенных вариантах осуществления технологии, описанные в данном документе, модулируют (например, снижают или устраняют) экспрессию генов TCR, включая ген, кодирующий рецептор Т-клеточного антигена, бета-цепь (например, ген TRB или TCRB) путем нацеливания и модулирования (например, снижения или устранения) экспрессии константной области бета-цепи Т-клеточного рецептора. В некоторых аспектах модуляция достигается с использованием системы CRISPR/Cas. Путем модулирования (например, снижения или удаления) экспрессии TRB блокируется перенос молекул TCR на поверхность. В некоторых вариантах осуществления клетка также обладает сниженной способностью индуцировать иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00401] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящей технологии представляет собой вариант TRB. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность является гомологом TRB. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность является ортологом TRB.

[00402] В некоторых аспектах сниженная или устраненная экспрессия TRB снижает или устраняет поверхностную экспрессию TCR.

[00403] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, содержат генные модификации в локусе гена, кодирующем белок TRB. Другими словами, клетки содержат генетическую модификацию локуса TRB. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая белок TRB, указана в UniProt № P0DSE2. В некоторых случаях локус гена TRB описан в RefSeq. № NG_001333.2 и NCBI Gene ID № 6957. В определенных случаях аминокислотная последовательность TRB представлена как Uniprot № P01848. Дополнительные описания белка и генного локуса TRB можно найти в GenBank № L36092.2, Uniprot № P0DSE2 и HGNC Ref. № 12155.

[00404] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген

TRB. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеленная на ген TRB редкощепящей эндонуклеазой, содержит белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность направляющей рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген TRB. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна направляющая последовательность рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген TRB выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 610-765 и 9798-10532 из US 20160348073, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[00405] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген TRB, известны и описаны в данном документе. В одном варианте осуществления результирующая генетическая модификация гена TRB с помощью ПЦР и снижение экспрессии TCR могут быть проанализированы с помощью анализа методом FACS. В другом варианте осуществления экспрессию белка TRB определяют с помощью вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку TRB. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

G. Способы уменьшения или устранения экспрессии МНС класса I, МНС класса II и/или TCR

[00406] В данном документе предложены способы модификации или конструирования клеток со сниженной экспрессией антигенов МНС I, антигенов МНС II и/или одного или более комплексов TCR. Снижение экспрессии МНС I и/или МНС II может быть достигнуто, например, одним или более из следующих способов: (1) нацеливание непосредственно на полиморфные аллели HLA (HLA-A, HLA-B, HLA-C) и гены МНС-II; (2) удаление B2M, что предотвратит перенос всех молекул МНС-I на поверхность; (3) удаление СИТА, что предотвратит перенос всех молекул МНС-II на поверхность; и/или (4) удаление компонентов энхансесом МНС, таких как LRC5, RFX-5, RFXANK, RFXAP, IRF1, NF-Y (включая NFY-A, NFY-B, NFY-C) и СИТА, которые имеют решающее значение для экспрессии HLA.

[00407] В некоторых аспектах экспрессия HLA нарушается путем нацеливания на отдельные HLA (например, блокирования экспрессии HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ и/или HLA-DR), нацеливания на транскрипционные регуляторы экспрессии HLA (например, блокирования экспрессии NLRC5, СИТА, RFX5, RFXAP, RFXANK, NFY-A, NFY-B, NFY-C и/или IRF-1), блокирования переноса молекул МНС класса I на поверхность (например, блокирования экспрессии B2M и/или TAP1), и/или нацеливания с помощью «бритвы» HLA (см., например, WO2016183041).

[00408] В определенных аспектах клетки, описанные в данном документе, включая, но не ограничиваясь ими, плюрипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки, полученные из таких стволовых клеток, и первичные Т-клетки не экспрессируют один или более человеческих лейкоцитарных антигенов (например, HLA- A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ и/или

HLA-DR), соответствующих МНС-I и/или МНС-II, и поэтому характеризуются как гипои иммуногенные. Например, в некоторых аспектах описанные плюрипотентные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки были модифицированы таким образом, что стволовая клетка или полученная из них дифференцированная стволовая клетка не экспрессирует или не проявляет сниженную экспрессию одной или более из следующих молекул МНС-I: HLA-A, HLA-B и HLA-C. В некоторых аспектах один или более HLA-A, HLA-B и HLA-C могут быть «нокаутированы» в клетке. Клетка, которая имеет нокаутированный ген HLA-A, ген HLA-B и/или ген HLA-C, может демонстрировать сниженную или устраненную экспрессию каждого нокаутированного гена.

[00409] В некоторых вариантах осуществления нРНК, которые позволяют одновременно удалять все аллели МНС класса I путем нацеливания на консервативную область в генах HLA, идентифицируют как «бритвы» HLA. В некоторых аспектах нРНК являются частью системы CRISPR. В альтернативных аспектах нРНК являются частью системы TALEN. В одном аспекте «бритва» HLA, нацеленная на идентифицированную консервативную область в HLA, описана в WO2016183041. В других аспектах используют несколько «бритв» HLA, нацеленных на идентифицированные консервативные области. Общеизвестно, что любая нРНК, нацеленная на консервативную область в HLA, может действовать как «бритва» HLA.

[00410] Способы, представленные ниже, применимы для инактивации или устранения экспрессии МНС класса I, экспрессии МНС класса II и/или экспрессии TCR в клетках, таких как, но не ограничиваясь ими, плюрипотентные стволовые клетки, плюрипотентные стволовые клетки, их дифференцированные клетки и первичные Т клетки. В некоторых вариантах осуществления технологии редактирования генома с использованием редкощепящих эндонуклеаз (например, системы CRISPR/Cas, TALEN, нуклеаз с цинковыми пальцами, мегануклеаз и хоминг эндонуклеаз) также используются для снижения или устранения экспрессии критических иммунных генов (например, путем удаления геномная ДНК критических иммунных генов) в стволовых клетках человека. В определенных вариантах осуществления технологии редактирования генома или другие технологии модуляции генов используются для введения факторов, индуцирующих толерантность, в клетки человека, превращая их и полученные из них дифференцированные клетки в гипои иммуногенные клетки. Таким образом, гипои иммуногенные клетки снижают или устраняют экспрессию МНС I и МНС II. В некоторых вариантах осуществления клетки являются неиммуногенными (например, не индуцируют иммунный ответ) у субъекта-реципиента.

[00411] Методы редактирования генома позволяют делать двухцепочечные разрывы ДНК в нужных сайтах локуса. Эти контролируемые двухцепочечные разрывы способствуют гомологичной рекомбинации в специфических сайтах локуса. Этот процесс направлен на нацеливание на определенные последовательности молекул нуклеиновых кислот, таких как хромосомы, с помощью эндонуклеаз, которые распознают и

связываются с последовательностями и вызывают двухцепочечный разрыв в молекуле нуклеиновой кислоты. Двухцепочечный разрыв репарируется либо подверженным ошибкам негомологичным соединением концов (NHEJ), либо гомологичной рекомбинацией (HR).

[00412] В практике конкретных вариантов осуществления можно применять, если специально не указано иное, обычные методы химии, биохимии, органической химии, молекулярной биологии, микробиологии, методов рекомбинантной ДНК, генетики, иммунологии и клеточной биологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники, многие из которых описаны ниже с целью иллюстрации. Такие методы подробно описаны в литературе. См., например, Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, updated July 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; а также монографии в таких журналах, как *Advances in Immunology*.

[00413] В некоторых вариантах осуществления редкощепящую эндонуклеазу вводят в клетку, содержащую целевую полинуклеотидную последовательность, в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей редкощепящую эндонуклеазу. Процесс введения нуклеиновых кислот в клетки может осуществляться любым подходящим методом. Подходящие методы включают трансфекцию, опосредованную фосфатом кальция или липидами, электропорацию и трансдукцию или инфекцию с применением вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит модифицированную ДНК, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит мРНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит модифицированную мРНК, как описано в данном документе (например, синтетическая модифицированная мРНК).

[00414] Настоящее изобретение предполагает изменение целевых полинуклеотидных последовательностей любым способом, доступным специалисту в данной области техники, с использованием системы CRISPR/Cas. Можно использовать любую систему CRISPR/Cas, которая способна изменять целевую полинуклеотидную последовательность в клетке. В таких системах CRISPR-Cas могут использоваться

различные белки Cas (Haft et al. PLoS Comput Biol. 2005;1(6)e60). Молекулярный механизм таких белков Cas, который позволяет системе CRISPR/Cas изменять целевые полинуклеотидные последовательности в клетках, включает РНК-связывающие белки, эндо- и экзонуклеазы, геликазы и полимеразы. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR типа I. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR типа II. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR типа V

[00415] Описанные в данном документе системы CRISPR/Cas можно использовать для изменения любой целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. Специалистам в данной области техники будет понятно, что желательные целевые полинуклеотидные последовательности, подлежащие изменению в любой конкретной клетке, могут соответствовать любой геномной последовательности, для которой экспрессия геномной последовательности связана с нарушением или иным образом способствует проникновению патогена в клетку. Например, желательной целевой полинуклеотидной последовательностью для изменения в клетке может быть полинуклеотидная последовательность, соответствующая геномной последовательности, которая содержит связанный с заболеванием единичный полинуклеотидный полиморфизм. В таком примере системы CRISPR/Cas можно использовать для коррекции SNP, связанного с заболеванием, в клетке путем замены его аллелем дикого типа. В качестве другого примера, полинуклеотидная последовательность целевого гена, который отвечает за проникновение или пролиферацию патогена в клетку, может быть подходящей мишенью для делеции или вставки, чтобы нарушить функцию целевого гена для предотвращения проникновения патогена в клетку или размножения внутри клетки.

[00416] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой геномную последовательность. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой геномную последовательность человека. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой геномную последовательность млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой геномную последовательность позвоночных.

[00417] В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas включает белок Cas и по меньшей мере одну-две рибонуклеиновые кислоты, которые способны направлять белок Cas и гибридизоваться с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности. Используемые в данном документе термины «белок» и «полипептид» используются взаимозаменяемо для обозначения ряда аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями (т. е. полимера аминокислот), и включают модифицированные аминокислоты (например, фосфорилированные, гликированные, гликозилированные, др.) и аналоги аминокислот. Иллюстративные полипептиды или

белки включают генные продукты, встречающиеся в природе белки, гомологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги вышеперечисленных.

[00418] В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит одну или более аминокислотных замен или модификаций. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен включают консервативную аминокислотную замену. В некоторых случаях, замены и/или модификации могут предотвращать или понижать протеолитическую деградацию и/или увеличивать период полужизни полипептида в клетке. В некоторых вариантах осуществления белок Cas может содержать замену пептидной связи (например, мочевины, тиомочевины, карбамат, сульфонилмочевину и т.д.). В некоторых вариантах осуществления белок Cas может содержать встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления белок Cas может содержать альтернативную аминокислоту (например, D-аминокислоты, бета-аминокислоты, гомоцистеин, фосфосерин и т.д.). В некоторых вариантах осуществления белок Cas может содержать модификацию, чтобы включать фрагмент (например, ПЭГилирование, гликозилирование, липидирование, ацетилирование, блокирование концов и т. д.).

[00419] В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает ядерный белок Cas. Иллюстративные коровые белки Cas включают, но не ограничиваются ими, Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8 и Cas9. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа *E. coli* (также известный как CASS2). Иллюстративные белки Cas подтипа *E. Coli* включают, но не ограничиваются ими, Cse1, Cse2, Cse3, Cse4 и Cas5e. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа *Ypest* (также известный как CASS3). Иллюстративные белки Cas подтипа *Ypest* включают, но не ограничиваются ими, Csy1, Csy2, Csy3 и Csy4. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа *Nmen1* (также известный как CASS4). Иллюстративные белки Cas подтипа *Nmen1* включают, но не ограничиваются ими, Csn1 и Csn2. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа *Dvulg* (также известный как CASS1). Иллюстративные белки Cas подтипа *Dvulg* включают, но не ограничиваются ими, Csd1, Csd2 и Cas5d. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа *Tneap* (также известный как CASS7). Иллюстративные белки Cas подтипа *Tneap* включают, но не ограничиваются ими, Cst1, Cst2, Cas5t. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа *Hmar1*. Иллюстративные белки Cas подтипа *Hmar1* включают, но не ограничиваются ими, Csh1, Csh2, Cas5h. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа *Apern* (также известный как CASS5). Иллюстративные белки Cas подтипа *Apern* включают, но не ограничиваются ими, Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5 и Cas5a. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа *Mtube* (также известный как CASS6). Иллюстративные белки Cas подтипа *Mtube* включают, но не ограничиваются ими, Csm1, Csm2, Csm3, Csm4 и Csm5. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит белок Cas модуля

RAMP. Типичные белки Cas модуля RAMP включают, но не ограничиваются ими, Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5 и Cmr6.

[00420] В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит любой из белков Cas, описанных в данном документе, или его функциональную часть. Используемый в данном документе термин «функциональная часть» или «функциональный фрагмент» относится к части пептидного или белкового фактора, которая сохраняет свою способность образовывать комплекс по меньшей мере с одной рибонуклеиновой кислотой (например, направляющей РНК (нРНК)) и расщеплять целевую полинуклеотидную последовательность. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть содержит комбинацию функционально связанных функциональных доменов белка Cas9, выбранных из группы, состоящей из ДНК-связывающего домена, по меньшей мере, одного РНК-связывающего домена, геликазного домена и эндонуклеазного домена. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть содержит комбинацию функционально связанных функциональных доменов белка Cas12a, выбранных из группы, состоящей из ДНК-связывающего домена, по меньшей мере, одного РНК-связывающего домена, геликазного домена и эндонуклеазного домена. В некоторых вариантах осуществления функциональные домены образуют комплекс. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть белка Cas9 содержит функциональную часть RuvC-подобного домена. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть белка Cas9 содержит функциональную часть нуклеазного домена HNH. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть белка Cas12a содержит функциональную часть RuvC-подобного домена.

[00421] В некоторых вариантах осуществления экзогенный белок Cas может быть введен в клетку в форме полипептида. В некоторых вариантах осуществления белки Cas могут быть конъюгированы или слиты с проникающим в клетку полипептидом или проникающим в клетку пептидом. Как применяется в данном документе, «проникающий в клетку полипептид» и «проникающий в клетку пептид» относятся к полипептиду или пептиду, соответственно, которые облегчают захват молекулы клеткой. Проникающие в клетки полипептиды могут содержать обнаруживаемую метку.

[00422] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белки Cas могут быть конъюгированы или слиты с заряженным белком (например, который несет положительный, отрицательный или общий нейтральный электрический заряд). Такая связь может быть ковалентной. В некоторых вариантах осуществления белок Cas может быть слит с суперположительно заряженным GFP для значительного увеличения способности белка Cas проникать в клетку (Cronican et al. ACS Chem Biol. 2010; 5(8):747-52). В некоторых вариантах осуществления белок Cas может быть слит с доменом трансдукции белка (PTD), чтобы облегчить его проникновение в клетку. Иллюстративные PTD включают Tat, олигоаргинин и пенетратин. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с проникающим в клетки пептидом. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с

PTD. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с доменом tat. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с олигоаргининовым доменом. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с доменом пенетратина. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с суперположительно заряженным GFP. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с проникающим в клетки пептидом. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с PTD. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с доменом tat. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с олигоаргининовым доменом. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с доменом пенетратина. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с суперположительно заряженным GFP.

[00423] В некоторых вариантах осуществления белок Cas можно вводить в клетку, содержащую целевую полинуклеотидную последовательность, в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas. Процесс введения нуклеиновых кислот в клетки может осуществляться любым подходящим методом. Подходящие методы включают трансфекцию, опосредованную фосфатом кальция или липидами, электропорацию и трансдукцию или инфекцию с применением вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит модифицированную ДНК, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит мРНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит модифицированную мРНК, как описано в данном документе.

[00424] В некоторых вариантах осуществления белок Cas образует комплекс с одной-двумя рибонуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления белок Cas образует комплекс с двумя рибонуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления белок Cas образует комплекс с одной рибонуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления белок Cas кодируется модифицированной нуклеиновой кислотой, как описано в данном документе, (например, синтетической модифицированной мРНК).

[00425] Способы по данной технологии предполагают применение любой рибонуклеиновой кислоты, которая способна направлять белок Cas и гибридизоваться с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из рибонуклеиновых кислот содержит tracrRNA. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из рибонуклеиновых кислот содержит CRISPR RNA (crRNA). В некоторых вариантах осуществления одна рибонуклеиновая кислота содержит направляющую РНК, которая направляет белок Cas и гибридизуется с целевым мотивом целевой полинуклеотидной

последовательности в клетке. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота содержит направляющую РНК, которая направляет белок Cas и гибридизуется с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. В некоторых вариантах осуществления обе из одной до двух рибонуклеиновых кислот содержат направляющую РНК, которая направляет белок Cas и гибридизуется с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. Рибонуклеиновые кислоты по данной технологии могут быть выбраны для гибридизации со множеством различных целевых мотивов, в зависимости от конкретной используемой системы CRISPR/Cas и целевой последовательности полинуклеотида, что будет понятно специалистам в данной области техники. Чтобы минимизировать гибридизацию с последовательностями нуклеиновых кислот, отличными от целевой полинуклеотидной последовательности также можно выбрать от одной до двух рибонуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления от одной до двух рибонуклеиновых кислот гибридизуются с целевым мотивом, который содержит по меньшей мере два несовпадения по сравнению со всеми другими геномными нуклеотидными последовательностями в клетке. В некоторых вариантах осуществления от одной до двух рибонуклеиновых кислот гибридизуются с целевым мотивом, который содержит по меньшей мере одно несовпадение по сравнению со всеми другими геномными нуклеотидными последовательностями в клетке. В некоторых вариантах осуществления от одной до двух рибонуклеиновых кислот предназначены для гибридизации с целевым мотивом, непосредственно примыкающим к мотиву дезоксирибонуклеиновой кислоты, распознаваемому белком Cas. В некоторых вариантах осуществлении каждый из одного до двух рибонуклеиновых кислот предназначены для гибридизации с целевыми мотивами, непосредственно примыкающим к мотивам дезоксирибонуклеиновой кислоты, распознаваемым белком Cas, фланкирующим мутантный аллель, расположенный между целевыми мотивами.

[00426] В некоторых вариантах осуществления каждая из одной до двух рибонуклеиновых кислот содержит направляющие РНК, которые направляют белок Cas и гибридизуются с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности в клетке.

[00427] В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, направляющие РНК) комплементарны и/или гибридизуются с последовательностями на одной и той же цепи целевой последовательности полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, направляющие РНК) комплементарны и/или гибридизуются с последовательностями на противоположных цепях целевой последовательности полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, направляющие РНК) не комплементарны и/или не гибридизуются с последовательностями на противоположных цепях целевой последовательности полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые

кислоты (например, направляющие РНК) комплементарны и/или гибридизуются с перекрывающимися целевыми мотивами целевой полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, направляющие РНК) комплементарны и/или гибридизуются для компенсации целевых мотивов целевой полинуклеотидной последовательности.

[00428] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие белок Cas, и нуклеиновые кислоты, кодирующие по меньшей мере одну-две рибонуклеиновые кислоты, вводят в клетку посредством вирусной трансдукции (*например*, лентивирусной трансдукции). В некоторых вариантах осуществления белок Cas образует комплекс с 1-2 рибонуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления белок Cas образует комплекс с двумя рибонуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления белок Cas образует комплекс с одной рибонуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления белок Cas кодируется модифицированной нуклеиновой кислотой.

[00429] Иллюстративные последовательности нРНК, пригодные для нацеливания на гены, описанные в данном документе, на основе CRISPR/Cas, представлены в таблице 1. Последовательности можно найти в WO2016/183041, поданной 9 мая 2016 г., и US2016/0348073, поданной 28 марта 2016 г., раскрытие которых, включая таблицы, приложения и перечень последовательностей, полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Таблица 1. Примеры последовательностей нРНК, пригодных для нацеливания на гены

Название гена	SEQ ID NO:	WO2016183041
HLA-A	SEQ ID NO: 2-1418	Таблица 8, приложение 1
HLA-B	SEQ ID NO: 1419-3277	Таблица 9, приложение 2
HLA-C	SEQ ID NO:3278-5183	Таблица 10, приложение 3
RFX-ANK	SEQ ID NO: 95636-102318	Таблица 11, приложение 4
NFY-A	SEQ ID NO: 102319-121796	Таблица 13, приложение 6
RFX5	SEQ ID NO: 85645-90115	Таблица 16, приложение 9
RFX-AP	SEQ ID NO: 90116-95635	Таблица 17, приложение 10
NFY-B	SEQ ID NO: 121797-135112	Таблица 20, приложение 13
NFY-C	SEQ ID NO: 135113-176601	Таблица 22, приложение 15
IRF1	SEQ ID NO: 176602-182813	Таблица 23, приложение 16
TAP1	SEQ ID NO: 182814-188371	Таблица 24, приложение 17
CIITA	SEQ ID NO:5184-36352	Таблица 12, приложение 5
B2M	SEQ ID NO:81240-85644	Таблица 15, приложение 8
NLRC5	SEQ ID NO:36353-81239	Таблица 14, приложение 7

CD47	SEQ ID NO:200784-231885	Таблица 29, приложение 22
HLA-E	SEQ ID NO:189859-193183	Таблица 19, приложение 12
HLA-F	SEQ ID NO:688808-699754	Таблица 45, приложение 38
HLA-G	SEQ ID NO:188372-189858	Таблица 18, приложение 11

PD-L1	SEQ ID NO:193184-200783	Таблица 21, приложение 14
Название гена	SEQ ID NO:	US20160348073
TRAC	SEQ ID NO: 532-609 и 9102-9797	
TRB (также TCRB)	SEQ IDNO:610-765 и 9798-10532	

[00430] В некоторых аспектах клетки модифицируют с использованием способов, не основанных на CRISPR. В некоторых вариантах осуществления такие способы включают, но не ограничиваются ими, нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN), хоминг эндонуклеазы нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), специфичные к последовательности эндонуклеазы, мегануклеазу, РНК-сайленсинг или РНК-интерференцию, а также РНК-направляемые транспозазы.

[00431] Под «TALE-нуклеазой» (TALEN) подразумевается слитый белок, состоящий из связывающего нуклеиновую кислоту домена, как правило, полученного из эффектора, подобного активатору транскрипции (TALE), и одного нуклеазного каталитического домена для расщепления целевой последовательности нуклеиновой кислоты. Каталитический домен предпочтительно представляет собой нуклеазный домен и более предпочтительно домен, обладающий эндонуклеазной активностью, такой как, например, I-TevI, ColE7, NucA и Fok-I. В конкретном варианте осуществления домен TALE может быть слит с мегануклеазой, такой как, например, I-CreI и I-OnuI, или их функциональным вариантом. В более предпочтительном варианте осуществления указанная нуклеаза представляет собой мономерную TALE-нуклеазу. Мономерная нуклеаза TALE представляет собой TALE-нуклеазу, которая не требует димеризации для специфического узнавания и расщепления, такой как слияние сконструированных повторов TAL с каталитическим доменом I-TevI, описанным в WO2012138927. Эффектор, подобный активатору транскрипции (TALE), представляет собой белки бактериального вида *Xanthomonas*, содержащие множество повторяющихся последовательностей, причем каждый повтор содержит два остатка в положениях 12 и 13 (RVD), которые специфичны для каждого нуклеотидного основания целевой последовательности нуклеиновой кислоты. Связывающие домены с аналогичными свойствами связывания нуклеиновых кислот модульного типа «основание за основанием» (MBBBD) также могут быть получены из новых модульных белков, недавно обнаруженных заявителем у другого вида бактерий. Преимущество новых модульных белков заключается в том, что они

демонстрируют большую изменчивость последовательностей, чем повторы TAL. Предпочтительно RVD, связанные с распознаванием различных нуклеотидов, представляют собой HD для распознавания C, NG для распознавания T, NI для распознавания A, NN для распознавания G или A, NS для распознавания A, C, G или T, HG для распознавания T, IG. для распознавания T, NK для распознавания G, HA для распознавания C, ND для распознавания C, HI для распознавания C, HN для распознавания G, NA для распознавания G, SN для распознавания G или A и YG для распознавания T, TL для распознавания A, VT для распознавания A или G и SW для распознавания A. В другом варианте осуществления критические аминокислоты 12 и 13 могут быть мутированы в другие аминокислотные остатки, чтобы модулировать их специфичность в отношении нуклеотидов A, T, C и G и, в частности, для усиления этой специфичности. Наборы TALEN продаются на коммерческой основе.

[00432] В некоторых вариантах осуществления клетки подвергают манипуляциям с помощью нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN) . «Связывающий белок с цинковыми пальцами » представляет собой белок или полипептид, который связывает ДНК, РНК и/или белок, предпочтительно специфичным для последовательности образом, в результате стабилизации структуры белка посредством координации иона цинка. Термин «связывающий белок с цинковыми пальцами» часто сокращенно называют «белок с цинковыми пальцами» или ZFP. Отдельные ДНК-связывающие домены обычно называют «пальцами». ZFP имеет по меньшей мере один палец, обычно два пальца, три пальца или шесть пальцев. Каждый палец связывает от двух до четырех пар оснований ДНК, обычно три или четыре пары оснований ДНК. ZFP связывается с последовательностью нуклеиновой кислоты, называемой целевым сайтом или целевым сегментом. Каждый палец обычно содержит приблизительно 30 аминокислот, хелатирующий цинк, ДНК-связывающий субдомен. Исследования показали, что одиночный цинковый палец этого класса состоит из альфа-спирали, содержащей два инвариантных гистидиновых остатка, координационно связанных с цинком, наряду с двумя цистеиновыми остатками одного бета Turn (см., например, Berg & Shi, Science 271: 1081-1085 (1996)).

[00433] В некоторых вариантах осуществления клетки по настоящему изобретению получают с использованием хоминг эндонуклеазы. Такие хоминг эндонуклеазы хорошо известны в данной области техники (Stoddard 2005). Хоминг эндонуклеазы распознают целевую последовательность ДНК и генерируют одно- или двухцепочечный разрыв. Хоминг эндонуклеазы являются высокоспецифичными, распознающими целевые участки ДНК длиной от 12 до 45 пар оснований (п.н.), как правило, в диапазоне от 14 до 40 п.н. Хоминг эндонуклеаза согласно настоящему изобретению может, например, соответствовать хоминг эндонуклеазе LAGLIDADG, эндонуклеазе HNH или эндонуклеазе GIY-YIG. В некоторых случаях хоминг эндонуклеаза представляет собой вариант I-CreI.

[00434] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки получают с использованием мегануклеазы. Мегануклеазы по определению представляют собой специфичные к последовательности эндонуклеазы, распознающие

большие последовательности (Chevalier, B. S. and B. L. Stoddard, *Nucleic Acids Res.*, 2001, 29, 3757-3774). Они могут расщеплять уникальные сайты в живых клетках, тем самым усиливая нацеливание на гены в 1000 и более раз вблизи сайта расщепления (Puchta et al., *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21, 5034-5040; Rouet et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1994, 14, 8096-8106; Chouluka et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1995, 15, 1968-1973; Puchta et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 5055-5060; Sargent et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1997, 17, 267-77; Donoho et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 4070-4078; Elliott et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 93-101; Cohen-Tannoudji et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 1444-1448).

[00435] В некоторых вариантах осуществления описываемые клетки получают с использованием РНК-сайленсинга или РНК-интерференции (РНКи) для нокдауна (например, снижения, элиминации или ингибирования) экспрессии полипептида, такого как толерогенный фактор. Полезные методы РНКи включают те, которые используют синтетические молекулы РНКи, короткие интерферирующие РНК (киРНК), PIWI-взаимодействующие РНК (piРНК), короткие шпилечные РНК (кшРНК), микроРНК (миРНК) и другие способы осуществления транзientного нокдауна, известные специалистам в данной области техники. Реагенты для РНК-интерференции, включая специфичные к последовательности кшРНК, киРНК, микроРНК и т.п., являются коммерчески доступными. Например, СПТА можно подвергнуть нокдауну в плюрипотентной стволовой клетке путем введения киРНК СПТА или трансдукции вируса, экспрессирующего кшРНК СПТА, в клетку. В некоторых вариантах осуществления РНК-интерференция используется для снижения или ингибирования экспрессии по меньшей мере одного, выбранного из группы, состоящей из СПТА, B2M и NLRC5.

[00436] В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемые транспозазы используются для интеграции ДНК в геном клетки, описанной в данном документе. Подробные описания полезных РНК-направляемых транспозаз и способов их применения раскрыты, например, в Klompe et al., *Nature* 571, 219-225 (2019) and Strecker et al., *Science* 365, 48-53 (2019), содержание которых включены в данный документ посредством ссылки.

Н. Получение гипоиммуногенных плюрипотентных стволовых клеток

[00437] В изобретении предложены способы получения гипоиммуногенных плюрипотентных клеток. В некоторых вариантах осуществления способ включает получение плюрипотентных стволовых клеток. Получение плюрипотентных стволовых клеток мыши и человека (обычно называемых иПСК; миПСК для мышинных клеток или чиПСК для клеток человека) в целом известно в данной области техники. Как будет понятно специалистам в данной области техники, существует множество различных способов получения иПСК. Первоначальную индукцию проводили из эмбриональных или взрослых фибробластов мыши с использованием вирусного введения четырех факторов транскрипции: Oct3/4, Sox2, c-Мyc и Klf4; см. Takahashi and Yamanaka *Cell* 126:663-676 (2006), который полностью включен в данный документ посредством ссылки и конкретно в отношении описанных в нем методов. С тех пор был разработан ряд методов; см. обзор в

Seki et al, World J. Stem Cells 7(1): 116-125 (2015) для обзора, и Lakshmipathy and Vermuri, editors, *Methods in Molecular Biology: Pluripotent Stem Cells, Methods and Protocols*, Springer 2013, содержание которых явным образом включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте, в частности, в отношении методов генерации иПСК (см., например, главу 3 последней ссылки).

[00438] Как правило, иПСК получают транзientной экспрессией одного или более факторов перепрограммирования в клетке-хозяине, как правило, вводимых с использованием эписомальных векторов. В этих условиях небольшое количество клеток индуцируется для их преобразования в иПСК (в целом, эффективность этой стадии низка, поскольку не используются маркеры селекции). Как только клетки «перепрограммированы» и становятся плюрипотентными, они теряют эписомальный вектор(-ы) и продуцируют факторы, используя эндогенные гены.

[00439] Как также понятно специалистам в данной области техники, количество факторов перепрограммирования, которые могут быть использованы или используются, может варьироваться. Как правило, при использовании меньшего количества факторов перепрограммирования снижается эффективность трансформации клеток в плюрипотентное состояние, а также «плюрипотентность», например, меньшее количество факторов перепрограммирования может привести к тому, что клетки не будут полностью плюрипотентными, и могут быть способны дифференцироваться только в меньшее количество типов клеток.

[00440] В некоторых вариантах осуществления используется один фактор перепрограммирования, OCT4. В других вариантах осуществления используются два фактора перепрограммирования, OCT4 и KLF4. В других вариантах осуществления используются три фактора перепрограммирования: OCT4, KLF4 и SOX2. В других вариантах осуществления используются четыре фактора перепрограммирования: OCT4, KLF4, SOX2 и c-Мус. В других вариантах осуществления можно использовать 5, 6 или 7 факторов перепрограммирования, выбранных из SOKMNLТ; SOX2, OCT4 (POU5F1), KLF4, MYC, NANOG, LIN28 и Т-антигена SV40L. Как правило, эти гены факторов перепрограммирования представлены в эписомальных векторах, те таких как известные в данной области техники и коммерчески доступные.

[00441] В целом, как известно в данной области техники, иПСК получают из неплюрипотентных клеток, таких как, но не ограничиваясь ими, клетки крови, фибробласты и т.д., путем транзientной экспрессии факторов перепрограммирования, как описано в данном документе.

I. Анализы фенотипов гипоиммуногенности и сохранения плюрипотентности

[00442] После получения гипоиммуногенных клеток их можно проанализировать на предмет их гипоиммуногенности и/или сохранения плюрипотентности, как описано в WO 2016183041 и WO 2018132783.

[00443] В некоторых вариантах гипоиммуногенность оценивают с использованием ряда методик, как показано на Фиг. 13 и Фиг. 15 в WO2018132783. Эти методы включают

трансплантацию аллогенным хозяевам и мониторинг роста гипоиммуногенных плюрипотентных клеток (например, тератом), которые ускользают от иммунной системы хозяина. В некоторых случаях производные гипоиммуногенных плюрипотентных клеток трансдуцируют для экспрессии люциферазы, а затем их можно отслеживать с помощью биолюминесцентной визуализации. Подобным образом тестируют Т-клеточный и/или В-клеточный ответ животного-хозяина на такие клетки, чтобы подтвердить, что клетки не вызывают иммунную реакцию у животного-хозяина. Функцию Т-клеток оценивают с помощью ELISpot, ELISA, FACS, ПЦР или масс-цитометрии (CYTOF). В-клеточный ответ или образование антител оценивают с помощью FACS или Luminex. Дополнительно или альтернативно клетки могут быть проанализированы на их способность уклоняться от реакций врожденного иммунитета, например, уничтожения NK-клетками, как показано в целом на Фиг. 14 и 15 WO2018132783.

[00444] В некоторых вариантах осуществления иммуногенность клеток оценивают с использованием иммуноанализов Т-клеток, таких как анализы пролиферации Т-клеток, анализы активации Т-клеток и анализы уничтожения Т-клетками, известные специалистам в данной области техники. В некоторых случаях анализ пролиферации Т-клеток включает предварительную обработку клеток гамма-интерфероном и совместное культивирование клеток с мечеными Т-клетками и анализ присутствия популяции Т-клеток (или популяции пролиферирующих Т-клеток) через предварительно выбранный промежуток времени. В некоторых случаях анализ активации Т-клеток включает совместное культивирование Т-клеток с описанными в данном документе клетками и определение уровней экспрессии маркеров активации Т-клеток в Т-клетках.

[00445] Для оценки иммуногенности описанных в данном документе клеток можно проводить анализы *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления выживаемость и иммуногенность гипоиммуногенных клеток определяют с использованием модели аллогенных гуманизированных иммунодефицитных мышей. В некоторых случаях гипоиммуногенные плюрипотентные стволовые клетки трансплантируют аллогенным гуманизированным мышам NSG-SGM3 и анализируют на предмет отторжения клеток, выживаемости клеток и образования тератом. В некоторых случаях привитые гипоиммуногенные плюрипотентные стволовые клетки или их дифференцированные клетки проявляют долгосрочную выживаемость в мышинной модели.

[00446] Дополнительные методы определения иммуногенности, включая гипоиммуногенность клеток, описаны, например, в Deuse et al., *Nature Biotechnology*, 2019, 37, 252-258 and Han et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(21), 10441-10446, описания, включая фигуры, подписи к фигурам и описание способов, полностью включены в данный документ посредством ссылки.

[00447] Точно так же сохранение плюрипотентности проверяется несколькими способами. В одном варианте осуществления плюрипотентность оценивают по экспрессии определенных факторов, специфичных для плюрипотентности, как в целом описано в данном документе и показано на Фиг. 29 WO2018132783. Дополнительно или

альтернативно плюрипотентные клетки дифференцируют в один или более типов клеток, что свидетельствует о плюрипотентности.

[00448] Как будет понятно специалистам в данной области техники, успешное снижение функции МНС I (HLA I, когда клетки происходят из клеток человека) в плюрипотентных клетках можно измерить с использованием методов, известных в данной области техники, и как описано ниже; например, методы FACS с использованием меченых антител, которые связывают комплекс HLA; например, используя имеющиеся в продаже антитела к HLA-A, B, C, которые связываются с альфа-цепью антигенов HLA класса I главного комплекса гистосовместимости человека.

[00449] Кроме того, клетки можно протестировать, чтобы подтвердить, что комплекс HLA I не экспрессируется на клеточной поверхности. Это можно определить с помощью анализа методом FACS с использованием антител к одному или более компонентам клеточной поверхности HLA, как обсуждалось выше.

[00450] Успешное ослабление функции МНС II (HLA II, когда клетки получены из клеток человека) в плюрипотентных клетках или их производных можно измерить с использованием методов, известных в данной области техники, таких как вестерн-блоттинг с использованием антител к белку, методы FACS, методы ОТ-ПЦР и т. д.

[00451] Кроме того, клетки можно протестировать, чтобы подтвердить, что комплекс HLA II экспрессируется на клеточной поверхности. Опять же, этот анализ проводят так, как это известно в данной области техники (см., например, Фиг. 21 в WO2018132783) и обычно проводят с использованием вестерн-блоттинга или анализа методом FACS на основе коммерческих антител, которые связываются с человеческим HLA класса II, HLA-DR, DP и большинство антигенов DQ.

[00452] В дополнение к снижению уровня HLA I и II (или МНС I и II) описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки обладают пониженной восприимчивостью к фагоцитозу макрофагами и уничтожению NK-клетками. Образовавшиеся гипоиммуногенные клетки «избегают» иммунных макрофагов и путей врожденного иммунитета из-за экспрессии одного или более трансгенов CD47.

J. Поддержание гипоиммуногенных плюрипотентных стволовых клеток

[00453] После образования гипоиммуногенных плюрипотентных стволовых клеток их можно поддерживать в недифференцированном состоянии, известном для поддержания иПСК. Например, клетки можно культивировать на матригле с использованием питательной среды, предотвращающей дифференцировку и сохраняющей плюрипотентность. Кроме того, они могут находиться в культуральной среде в условиях, обеспечивающих сохранение плюрипотентности.

К. Дифференцировка гипоиммуногенных плюрипотентных стволовых клеток

[00454] Настоящая технология обеспечивает гипоиммуногенные плюрипотентные клетки, которые дифференцируются в различные типы клеток для последующей трансплантации субъектам. Как будет понятно специалистам в данной области техники, способы дифференцировки зависят от желаемого типа клеток с использованием известных

способов. Клетки можно дифференцировать в суспензии, а затем поместить в форму гелевой матрицы, такая как формы матригеля, желатина или фибрина/тромбина, для облегчения выживаемости клеток. В некоторых случаях дифференцировка анализируется, как известно в данной области техники, обычно путем оценки присутствия специфических для клеток маркеров.

[00455] В некоторых вариантах осуществления гипоиимуногенные плюрипотентные клетки дифференцируются в гепатоциты для решения проблемы потери функционирования гепатоцитов или цирроза печени. Существует ряд методов, которые можно использовать для дифференциации гипоиимуногенных плюрипотентных клеток в гепатоциты; см., например, Pettinato et al., doi:10.1038/spre32888, Snykers et al., *Methods Mol Biol* 698:305-314 (2011), Si-Tayeb et al., *Hepatology* 51:297-305 (2010) и Asgari et al., *Stem Cell Rev* (:493-504 (2013), содержание которых явным образом включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и конкретно в отношении методологий и реагентов для дифференцировки. Дифференцировку анализируют, как известно в данной области техники, обычно путем оценки присутствия ассоциированных с гепатоцитами маркеров и/или специфических маркеров, включая, но не ограничиваясь ими, альбумин, альфа-фетопроtein и фибриноген. Дифференцировку также можно измерить функционально, например, по метаболизации аммиака, хранению и поглощению ЛПНП, поглощению и высвобождению ICG и накоплению гликогена.

[00456] В некоторых вариантах осуществления гипоиимуногенные плюрипотентные клетки дифференцируют в бета-подобные клетки поджелудочной железы или островковые органоиды для трансплантации с целью лечения сахарного диабета I типа (СД I). Клеточные системы представляют собой многообещающий способ борьбы с СД I, см., например, Ellis et al., doi/10.1038/nrgastro.2017.93, включенный в данный документ посредством ссылки. Кроме того, Pagliuca et al. сообщает об успешной дифференцировке Р-клеток из иПСК человека (см. doi/10.106/j.cell.2014.09.040, включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и, в частности, в отношении описанных там методов и реагентов для крупномасштабного производства функциональных β -клеток человека из плюрипотентных стволовых клеток человека). Кроме того, Vegas et al. показано получение β -клеток человека из плюрипотентных стволовых клеток человека с последующей инкапсуляцией во избежание иммунного отторжения хозяином; (doi:10.1038/nm.4030, полностью включенный в данный документ посредством ссылки и, в частности, для описанных там способов и реагентов для крупномасштабного производства функциональных человеческих β -клеток из плюрипотентных стволовых клеток человека).

[00457] Дифференцировку можно анализировать, как это известно в данной области техники, обычно путем оценки присутствия ассоциированных с β -клетками или специфических маркеров, включая, но не ограничиваясь ими, инсулин. Дифференцировку также можно измерять функционально, например, путем измерения метаболизма глюкозы, см. в целом Muraro et al., doi:10.1016/j.cels.2016.09.002, полностью включенную

в данный документ посредством ссылки, и конкретно для описанных там биомаркеров.

[00458] В некоторых вариантах осуществления гипоиимуногенные плюрипотентные клетки дифференцируются в пигментный эпителий сетчатки (RPE) для решения проблемы угрожающих зрению заболеваний глаза. Плюрипотентные стволовые клетки человека были дифференцированы в клетки RPE с использованием методов, изложенных в Kamao et al., Stem Cell Reports 2014;2:205-18, полностью включенной в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении методов и реагентов, описанных там для методов дифференцировки и реагентов; см. также Mandai et al., doi:10.1056/NEJMoal608368, также включенной во всей полноте в отношении методик создания слоев клеток RPE и трансплантации пациентам.

[00459] Дифференцировку можно анализировать, как известно в данной области техники, обычно путем оценки присутствия ассоциированных с RPE маркеров и/или специфических маркеров или путем оценки функций. См., например, Kamao et al., doi:10.1016/j.stemcr.2013.12.007, полностью включенную в данный документ посредством ссылки и конкретно в отношении маркеров, описанных в первом абзаце раздела результатов.

[00460] В некоторых вариантах осуществления гипоиимуногенные плюрипотентные клетки дифференцируются в кардиомиоциты для борьбы с сердечно-сосудистыми заболеваниями. В данной области техники известны способы дифференцировки чИПСК в кардиомиоциты. Дифференцировку можно анализировать, как известно в данной области, обычно путем оценки присутствия ассоциированных с кардиомиоцитами маркеров или специфических маркеров или путем оценки функций; см., например, Loh et al., doi:10.1016/j.cell.2016.06.001, полностью включенную в данный документ посредством ссылки и конкретно в отношении способов дифференцировки стволовых клеток, включая кардиомиоциты.

[00461] В некоторых вариантах осуществления гипоиимуногенные плюрипотентные клетки дифференцируются в эндотелиальные колониеобразующие клетки (ECFC) с образованием новых кровеносных сосудов для лечения заболевания периферических артерий. Известны способы дифференцировки эндотелиальных клеток. См., например, Prasain et al., doi:10.1038/nbt.3048, полностью и конкретно включенную посредством ссылки, в отношении способов и реагентов для получения эндотелиальных клеток из плюрипотентных стволовых клеток человека, а также в отношении методов трансплантации. Дифференцировку можно анализировать, как это известно в данной области техники, обычно путем оценки присутствия ассоциированных с эндотелиальными клетками маркеров или специфических маркеров или путем оценки функции.

[00462] В некоторых вариантах осуществления гипоиимуногенные плюрипотентные клетки дифференцируются в клетки-предшественники щитовидной железы и фолликулярные органоты щитовидной железы, которые могут секретировать гормоны щитовидной железы для лечения аутоиммунного тиреоидита. Методы дифференцировки клеток щитовидной железы известны в данной области техники. См.,

например, Kurmann et al., doi:10.106/j.stem 2015.09.004, явным образом включенную в данный документ путем ссылки полностью и конкретно в отношении способов и реагентов для получения клеток щитовидной железы из плюрипотентных стволовых клеток человека, а также в отношении методов трансплантации. Дифференцировку можно анализировать, как это известно в данной области техники, обычно путем оценки присутствия ассоциированных с клетками щитовидной железы маркеров или специфических маркеров или путем оценки функций.

[00463] Дополнительные описания методов дифференцировки гипоиммуногенных плюрипотентных клеток можно найти, например, в Deuse et al., *Nature Biotechnology*, 2019, 37, 252-258 и Han et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(21), 10441-10446.

L. Введение дифференцированных гипоиммуногенных клеток

[00464] Как должно быть понятно специалистам в данной области техники, производные дифференцированных гипоиммуногенных плюрипотентных клеток можно трансплантировать с использованием методов, известных в данной области техники, которые зависят как от типа клеток, так и от конечного использования этих клеток. В общем, описанные клетки можно трансплантировать либо внутривенно, либо путем инъекции в определенные места у пациента. При пересадке в определенные места клетки могут быть погружены в гелевую матрицу для предотвращения рассредоточения, пока они приживаются.

[00465] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение популяции дифференцированных клеток, включающей дифференцированную клетку, полученную из стволовой клетки, условно экспрессирующей экзогенный иммунодепрессивный фактор. В полезных вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, который включает введение популяции дифференцированных клеток, включающей дифференцированную клетку, полученную из стволовой клетки, условно экспрессирующей экзогенный CD47 человека.

[00466] В некоторых вариантах осуществления способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включает введение популяции дифференцированных клеток, включающей дифференцированную клетку, полученную из стволовой клетки, условно экспрессирующей фактор гипоиммунитета. Во многих вариантах осуществления дифференцированную клетку получают из стволовой клетки, условно экспрессирующей основной фактор.

[00467] Как должно быть понятно специалистам в данной области техники, производные дифференцированных гипоиммуногенных плюрипотентных клеток можно трансплантировать с использованием методов, известных в данной области техники, которые зависят как от типа клеток, так и от конечного использования этих клеток. Как правило, описанные в данном документе клетки можно трансплантировать либо внутривенно, либо путем инъекции в определенные места у пациента. При пересадке в

определенные места клетки могут быть погружены в гелевую матрицу для предотвращения рассредоточения, пока они приживаются.

М. Иллюстративные варианты осуществления

1. Защитные переключатели для регулирования иммуносупрессивных факторов

[00468] В одном аспекте в данном документе предложен способ контроля иммуногенности клетки, включающий: (а) получение выделенной клетки; (b) введение в выделенную клетку (i) нуклеиновой кислоты, содержащей промотор индуцируемой РНК-полимеразы, функционально связанный с последовательностью кшРНК, нацеленной на иммуносупрессивный фактор; и (ii) нуклеиновую кислоту, содержащую промотор (например, конститутивный промотор), функционально связанный с трансактивирующим элементом, соответствующим индуцируемому промотору РНК-полимеразы, для получения сконструированной клетки; и (с) воздействие экзогенного фактора на сконструированную клетку для активации трансактивирующего элемента, тем самым контролируя иммуногенность клетки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение сконструированной клетки субъекту перед стадией (с).

[00469] В некоторых вариантах осуществления способ включает введение в выделенную клетку одиночной конструкции, содержащей (i) промотор индуцируемой РНК-полимеразы, функционально связанный с последовательностью кшРНК, нацеленной на иммуносупрессивный фактор, и (ii) промотор (например, конститутивный промотор), функционально связанный с трансактивирующим элементом, соответствующим индуцируемому промотору РНК-полимеразы. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит от 5'-конца к 3'-концу промотор индуцируемой РНК-полимеразы; последовательность кшРНК, нацеленную на иммуносупрессивный фактор; промотор (например, конститутивный промотор); и трансактивирующий элемент.

[00470] В некоторых вариантах осуществления первая конструкция содержит нуклеиновую кислоту, содержащую промотор индуцируемой РНК-полимеразы, функционально связанный с последовательностью кшРНК, нацеленной на иммуносупрессивный фактор, а вторая конструкция содержит нуклеиновую кислоту, содержащую промотор (например, конститутивный промотор), функционально связанный с трансактивирующим элементом.

[00471] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка сконструирована таким образом, чтобы экзогенно экспрессировать иммуносупрессивный фактор. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка сверхэкспрессирует иммуносупрессивный фактор в отсутствие экзогенного фактора, который активирует трансактивирующий элемент.

[00472] В некоторых вариантах осуществления промотор индуцируемой РНК-полимеразы конструкции представляет собой промотор U6Tet.

[00473] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, CI-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121

и Mfge8. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор представляет собой CD47.

[00474] В некоторых вариантах осуществления описанный выше промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления конститутивный промотор конструкции выбран из группы, состоящей из промотора эукариотического фактора элонгации трансляции 1 α 1 (EF1A), промотора короткой формы эукариотического фактора элонгации трансляции 1 α 1 (EFS), немедленно-раннего энхансера/промотора цитомегаловируса (промотор CMV), раннего энхансера CMV, слитого с промотором модифицированного куриного Р-актина (CAGGS) (также называемого промотора CAG), промотора обезьяньего вируса 40 (SV40), промотора транспозона Copia (COPIA), промотора актина 5C (ACT5C), тетрациклин-чувствительного промоторного элемента (промотора TRE), раннего энхансера CMV, слитого с промотором модифицированного куриного Р-актина (CBh), промотора фосфоглицераткиназы 1 (PGK) и промотора убиквитина С (UBC).

[00475] В определенных вариантах осуществления конструкция содержит от 5'-конца к 3'-концу: промотор U6Tet, последовательность кшРНК, нацеленную на CD47, промотор EF1a и репрессорный элемент Tet, где экзогенный фактор представляет собой тетрациклин или его производное.

[00476] В некоторых вариантах осуществления любая из описанных в данном документе конструкций дополнительно содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00477] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку человека.

[00478] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека, описанная выше, дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СПТА. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию B2M. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека является гипои́ммуногенной.

[00479] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, взрослой стволовой клетки и дифференцированной клетки. В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки сердца, клетки печени, клетки почки, клетки поджелудочной железы, нервной клетки, иммунной клетки, мезенхимальной клетки и эндотелиальной клетки.

[00480] В другом аспекте в данном документе предложена конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы; последовательность кшРНК, нацеленную на иммуносупрессивный фактор; конститутивный промотор; и трансактивирующий элемент, соответствующий индуцируемому промотору РНК-полимеразы. В некоторых вариантах осуществления конструкции промотор индуцируемой РНК-полимеразы представляет собой промотор U6Tet.

[00481] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, CI-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор представляет собой CD47.

[00482] В некоторых вариантах осуществления конститутивный промотор конструкции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[00483] В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит от 5'-конца к 3'-концу: промотор U6Tet, последовательность кшРНК, нацеленную на CD47, промотор EF1a и репрессорный элемент Tet.

[00484] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота или конструкция также содержат векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00485] Также в данном документе предложена композиция, содержащая выделенную клетку, содержащую любую из описанных конструкций. В некоторых вариантах осуществления композиции выделенная клетка подвергается воздействию экзогенного фактора для активации трансактивирующего элемента. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка, описанная выше, сконструирована таким образом, чтобы экзогенно экспрессировать иммуносупрессивный фактор. В определенных вариантах осуществления выделенная клетка сверхэкспрессирует иммуносупрессивный фактор в отсутствие экзогенного фактора, который активирует трансактивирующий элемент.

[00486] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[00487] Также предложена композиция, содержащая выделенные дифференцированные клетки, полученные путем культивирования любой описанной в данном документе стволовой клетки в условиях дифференцировки с получением дифференцированной клетки. В некоторых вариантах осуществления условия дифференцировки подходят для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00488] В данном документе предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий: (а) введение любой из описанных композиций пациенту; и (b) воздействие экзогенного фактора на композицию для активации промотора индуцируемой РНК-полимеразы, тем самым контролируя иммуногенность клеток композиции.

[00489] В одном из аспектов в данном документе предложен способ контроля иммуногенности клетки, включающий: (а) получение выделенной клетки; (b) введение в выделенную клетку нуклеиновой кислоты, кодирующей индуцируемый элемент дегрон, функционально связанный с иммуносупрессивным фактором, для получения сконструированной клетки, или нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуносупрессивный фактор, функционально связанный с индуцируемым элементом дегрон; и (с) воздействие экзогенного фактора на сконструированную клетку для активации индуцируемого элемента дегрон, тем самым контролируя иммуногенность клетки.

[00490] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение сконструированной клетки субъекту перед стадией (с). В некоторых вариантах осуществления индуцируемый элемент дегрон связан с иммуносупрессивным фактором гибким линкером.

[00491] В некоторых вариантах осуществления индуцируемый элемент дегрон является N-концевым по отношению к иммуносупрессивному фактору. В некоторых вариантах осуществления индуцируемый элемент дегрон является C-концевым по отношению к иммуносупрессивному фактору. В некоторых вариантах осуществления транскрипция описанной нуклеиновой кислоты регулируется промотором, таким как конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту, описанную выше.

[00492] В некоторых вариантах осуществления конститутивный промотор в конструкции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[00493] В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер выбран из группы, состоящей из (GSG)n(SEQ ID NO:3), (GGGS)n(SEQ ID NO:1) и (GGGSGGGS)n(SEQ ID NO:2), где n равен 1-10.

[00494] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор

выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, CI-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8. В некоторых вариантах осуществления ген иммуносупрессивного фактора представляет собой CD47.

[00495] В некоторых вариантах осуществления элемент дегрон выбран из группы, состоящей из индуцируемого лигандом элемента дегрон, пептидного элемента дегрон и элемента пептидной протеолиз-таргетированной химеры (PROTAC).

[00496] В некоторых вариантах осуществления индуцируемый лигандом элемент дегрон выбран из элемента дегрон отключения с помощью малых молекул (SMASH), чувствительного к Shield-1 элемента дегрон, чувствительного к ауксину элемента дегрон, и чувствительного к рапамицину элемента дегрон. В некоторых вариантах осуществления индуцируемый лигандом элемент дегрон представляет собой элемент дегрон отключения с помощью малых молекул (SMASH), а экзогенный фактор представляет собой асунапревир.

[00497] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит 5'-плечо гомологии и 3'-плечо гомологии для направленной интеграции в локус «безопасная гавань». В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» выбран из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5.

[00498] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку человека.

[00499] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СПТА. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию B2M. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека является гипоиimmunогенной.

[00500] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, взрослой стволовой клетки и дифференцированной

клетки. В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки сердца, клетки печени, клетки почки, клетки поджелудочной железы, нервной клетки, иммунной клетки, мезенхимальной клетки и эндотелиальной клетки.

[00501] В одном аспекте в данном документе предложена конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: промотор (например, конститутивный промотор); индуцируемый элемент дегрон; необязательную последовательность, кодирующую гибкий линкер; и ген иммуносупрессивного фактора. В еще одном аспекте в данном документе предложена конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: промотор (например, конститутивный промотор); ген иммуносупрессивного фактора; необязательную последовательность, кодирующую гибкий линкер; и индуцируемый элемент дегрон.

[00502] В некоторых вариантах осуществления конститутивный промотор выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[00503] В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер выбран из группы, состоящей из (GSG)n(SEQ ID NO:3), (GGGS)n(SEQ ID NO:1) и (GGSGGGGS)n(SEQ ID NO:2), где n равен 1-10.

[00504] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, CI-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8.

[00505] В некоторых вариантах осуществления элемент дегрон выбран из группы, состоящей из индуцируемого лигандом элемента дегрон, пептидного элемента дегрон и элемента пептидной протеолиз-таргетированной химеры (PROTAC). В некоторых вариантах осуществления индуцируемый лигандом элемент дегрон выбран из элемента дегрон отключения с помощью малых молекул (SMASH), чувствительного к Shield-1 элемента дегрон, чувствительного к ауксину элемента дегрон, и чувствительного к рапамицину элемента дегрон. В некоторых вариантах осуществления индуцируемый лигандом элемент дегрон представляет собой элемент дегрон отключения с помощью малых молекул (SMASH).

[00506] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит 5'-плечо гомологии и 3'-плечо гомологии для направленной интеграции в геномный локус «безопасная гавань». В некоторых вариантах осуществления геномный локус «безопасная геномной гавань» выбран из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5.

[00507] В данном документе предложена композиция, содержащая выделенную клетку, содержащую любую из описанных конструкций. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки,

эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[00508] Также предложена композиция, содержащая выделенные дифференцированные клетки, полученные путем культивирования любой описанной в данном документе стволовой клетки в условиях дифференцировки с получением дифференцированной клетки. В некоторых вариантах осуществления условия дифференцировки подходят для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00509] В данном документе предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий: (а) введение любой из описанных композиций пациенту; и (b) воздействие экзогенного фактора на композицию для активации индуцируемого промотора элемента дегрон, тем самым контролируя иммуногенность клеток композиции.

[00510] В одном аспекте в данном документе предложен способ контроля иммуногенности клетки, включающий: (а) получение выделенной клетки; (b) введение в выделенную клетку: (i) первую конструкцию, содержащую от 5'-конца к 3'-концу: первый промотор (например, конститутивный промотор) и ген иммуносупрессивного фактора; (ii) вторую конструкцию, содержащую от 5'-конца к 3'-концу: второй промотор (например, конститутивный промотор) и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Cas9 или ее вариант; и (ii) третью конструкцию, содержащую от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы, последовательность направляющей РНК (нРНК), нацеленную на иммуносупрессивный фактор, третий промотор (например, конститутивный промотор) и трансактивирующий элемент, соответствующий индуцируемому промотору РНК-полимеразы; и (с) воздействие экзогенного фактора на сконструированную клетку для активации трансактивирующего элемента, тем самым контролируя иммуногенность клетки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение сконструированной клетки субъекту перед стадией (с).

[00511] В некоторых вариантах осуществления промотор индуцируемой РНК-полимеразы третьей конструкции представляет собой промотор U6Tet, трансактивирующий элемент представляет собой репрессорный элемент Tet (также называемый трансактиватором Tet-On), а экзогенный фактор представляет собой тетрациклин или его производное.

[00512] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, CI-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор представляет собой CD47.

[00513] В некоторых вариантах осуществления первый, второй и третий

конститутивные промоторы выбраны из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[00514] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку человека.

[00515] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию B2M. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека является гипоиимуногенной.

[00516] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[00517] В еще одном аспекте в данном документе предложена композиция, содержащая выделенную клетку, содержащую ДНК-направленную нуклеазную систему, для контроля иммуногенности клетки, включающую: (а) первый элемент, содержащий от 5'-конца к 3'-концу: первый промотор (например, конститутивный промотор) и ген иммуносупрессивного фактора; (b) второй элемент, содержащий от 5'-конца к 3'-концу: второй промотор (например, конститутивный промотор) и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Cas9 или ее вариант; и (c) третий элемент, содержащий от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы, последовательность направляющей РНК (нРНК), нацеленную на иммуносупрессивный фактор, третий промотор (например, конститутивный промотор) и трансактивирующий элемент, соответствующий индуцируемому промотору. В некоторых вариантах осуществления иммуногенность клетки можно контролировать при воздействии на нее экзогенного фактора для индукции активности трансактивирующего элемента.

[00518] В некоторых вариантах осуществления промотор индуцируемой РНК-полимеразы третьего элемента представляет собой промотор U6Tet, трансактивирующий элемент представляет собой репрессорный элемент Tet (также называемый

трансактиватором Tet-On), а экзогенный фактор представляет собой тетрациклин или его производное.

[00519] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, CI-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор представляет собой CD47.

[00520] В некоторых вариантах осуществления первый, второй и третий конститутивные промоторы выбраны из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[00521] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка композиции представляет собой выделенную клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку человека.

[00522] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СПТА. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию B2M. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека является гипоиimmunогенной.

[00523] В данном документе предложена композиция, содержащая выделенные дифференцированные клетки, полученные культивированием любой из описанных в данном документе стволовых клеток в условиях дифференцировки с получением дифференцированной клетки. В некоторых вариантах осуществления условия дифференцировки подходят для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00524] Также предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий: (а) введение любой из описанных в данном документе композиций; и (b) воздействие экзогенного фактора на композицию для активации

промотора индуцируемой РНК-полимеразы, тем самым контролируя иммуногенность клеток композиции.

[00525] В одном аспекте в данном документе предложена композиция, содержащая выделенную клетку млекопитающего, содержащую модификацию, содержащую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую систему условной экспрессии одного или более иммуносупрессивных факторов. В некоторых вариантах осуществления экспрессия одного или более иммуносупрессивных факторов контролируется экзогенным фактором.

[00526] В некоторых вариантах осуществления система содержит индуцируемую (или регулируемую) систему деградации белка для снижения уровней белка одного или более иммуносупрессивных факторов. В некоторых вариантах осуществления система индуцируемой деградации белка выбрана из группы, состоящей из системы отключения с помощью малых молекул (SMASH), индуцируемого Shield-1 дегрона, индуцируемого ауксином дегрона, индуцируемого IMid дегрона, пептидного дегрона, протеолиз-таргетированной химеры и антитела для направленной деградации.

[00527] В некоторых вариантах осуществления система включает систему регуляции РНК для контролируемого снижения уровней РНК одного или более иммуносупрессивных факторов. В некоторых вариантах осуществления система регуляции РНК выбрана из группы, состоящей из индуцируемой кшРНК, индуцируемой миРНК, интерференции CRISPR (CRISPRi) и РНК-нацеленной нуклеазной системы

[00528] В некоторых вариантах осуществления система включает систему регуляции ДНК для снижения уровней экспрессии одного или более иммуносупрессивных факторов. В некоторых вариантах осуществления система регуляции ДНК выбрана из группы, состоящей из системы экспрессии на основе тканеспецифического промотора, системы экспрессии на основе индуцируемого промотора, регулируемой молекулой системы на основе рибопереключателя, и системы редактирования генома на основе индуцируемой нуклеазы. В некоторых вариантах осуществления система экспрессии на основе индуцируемого промотора содержит промотор U6Tet и репрессорный элемент Tet. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический промотор выбран из группы, состоящей из специфичного для клеток сердца промотора, специфичного для гепатоцитов промотора, специфичного для клеток почек промотора, специфичного для клеток поджелудочной железы промотора, специфичного для нервных клеток промотора, специфичного для иммунных клеток промотора, специфичного для мезенхимальных клеток промотора и специфичного для эндотелиальных клеток промотора. В некоторых вариантах осуществления регулируемая молекулой система на основе рибопереключателя содержит регулируемый теофиллином рибопереключатель, или регулируемый гуанином рибопереключатель.

[00529] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома на основе индуцируемой нуклеазы включает систему, выбранную из группы, состоящей из редактирования генома CRISPR, включающего индуцируемую направляющую РНК,

направленную на один или более иммуносупрессивных факторов, индуцируемого редактирования генома TALEN, индуцируемого редактирования генома ZFN и улучшенного малыми молекулами редактирования генома CRISPR.

[00530] В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных факторов выбраны из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, С1-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8. В некоторых вариантах осуществления один или более иммуносупрессивных факторов представляют собой CD47.

[00531] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка композиции представляет собой выделенную клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку человека.

[00532] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию В2М. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека является гипои иммуногенной. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка млекопитающего или выделенная клетка человека выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[00533] В данном документе предложена композиция, содержащая выделенную дифференцированную клетку, полученную путем культивирования любой стволовой клетки, описанной в данном документе, в условиях дифференцировки с получением дифференцированной клетки. В некоторых вариантах осуществления условия дифференцировки подходят для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00534] Также предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий: (а) введение любой композиции, описанной в данном документе; и (b) воздействие экзогенного фактора на композицию для контроля экспрессии одного или

более иммуносупрессивных факторов, тем самым контролируя иммуногенность клеток композиции.

[00535] В одном аспекте в данном документе предложена композиция, содержащая выделенную клетку млекопитающего, содержащую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую систему условной экспрессии одного или более иммунных сигнальных факторов (например, иммунных сигнальных белков). В некоторых вариантах осуществления экспрессия одного или более иммунных сигнальных факторов контролируется экзогенным фактором.

[00536] В некоторых вариантах осуществления система условной экспрессии содержит индуцируемую систему индуцируемой стабилизации для повышения уровней белка одного или более иммунных сигнальных факторов. Система индуцируемой стабилизации белка включает систему индуцируемой лигандом стабилизации белка, и систему индуцируемой малыми молекулами стабилизации белка

[00537] В некоторых вариантах осуществления система условной экспрессии содержит систему регуляции РНК для повышения уровней РНК одного или более иммунных сигнальных факторов. В некоторых вариантах осуществления система регуляции РНК включает систему активации CRISPR (CRISPRa).

[00538] В некоторых вариантах осуществления система условной экспрессии содержит систему регуляции ДНК для повышения уровней экспрессии одного или более иммунных сигнальных факторов. В некоторых вариантах осуществления система регуляции ДНК включает систему, выбранную из группы, состоящей из системы активации CRISPR (CRISPRa), тканеспецифического промотора, индуцируемого промотора и регулируемой молекулой системы на основе рибопереклювателя. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический промотор выбран из группы, состоящей из специфичного для клеток сердца промотора, специфичного для гепатоцитов промотора, специфичного для клеток почек промотора, специфичного для клеток поджелудочной железы промотора, специфичного для нервных клеток промотора, специфичного для иммунных клеток промотора, специфичного для мезенхимальных клеток промотора и специфичного для эндотелиальных клеток промотора. В некоторых вариантах осуществления индуцируемый промотор включает систему TetOn. В некоторых вариантах осуществления регулируемая молекулой система на основе рибопереклювателя включает регулируемый теофиллином рибопереклюватель или регулируемый гуанином рибопереклюватель.

[00539] В некоторых вариантах осуществления один или более иммунных сигнальных факторов выбраны из группы, состоящей из бета-2-микроглобулина (B2M), родственного цепи МНС класса I белка A (MIC-A), родственного цепи МНС класса I белка B (MIC-B), HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFXANK, CTLA4, PD1 и лигандов NKG2D. В некоторых вариантах осуществления один или более иммунных сигнальных факторов выбраны из группы, состоящей из B2M, MIC-A, MIC-B, HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFXANK, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2,

RAET1/ULBP1, RAET1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3, и других лигандов NKG2D.

[00540] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка композиции представляет собой выделенную клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку человека.

[00541] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I по сравнению с немодифицированной клеткой человека.

[00542] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию В2М. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека является гипоиммуногенной. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка млекопитающего или выделенная клетка человека выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[00543] В данном документе предложена композиция, содержащая выделенные дифференцированные клетки, полученные путем культивирования любой описанной в данном документе стволовой клетки в условиях дифференцировки с получением дифференцированной клетки. В некоторых вариантах осуществления условия дифференцировки подходят для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00544] Также предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий: (а) введение пациенту любой из описанных в данном документе композиций; и (b) воздействие экзогенного фактора на композицию для контроля экспрессии одного или более иммуносупрессивных факторов, тем самым контролируя иммуногенность клеток композиции.

[00545] В одном аспекте в данном документе предложен способ контроля иммуногенности клетки, включающий: (а) получение выделенной клетки; (b) введение в выделенную клетку конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы; ген иммунного сигнального фактора; промотор (например, конститутивный промотор); и трансактивирующий элемент,

соответствующий индуцируемому промотору РНК-полимеразы, для получения сконструированной клетки; и (с) воздействие экзогенного фактора на сконструированную клетку для активации трансктивирующего элемента, тем самым контролируя иммуногенность клетки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение сконструированной клетки субъекту перед стадией (с).

[00546] В еще одном варианте осуществления способ контроля иммуногенности клетки включает: (b) введение в выделенную клетку (i) нуклеиновой кислоты, содержащей промотор индуцируемой РНК-полимеразы, функционально связанный с геном иммунного сигнального фактора, и (ii) промотор (например, конститутивный промотор), функционально связанный с трансктивирующим элементом, соответствующим индуцируемому промотору РНК-полимеразы, для получения сконструированной клетки.

[00547] В еще одном варианте осуществления способ контроля иммуногенности клетки включает: (b) введение в выделенную клетку одиночной конструкции, содержащей (i) нуклеиновую кислоту, содержащую промотор индуцируемой РНК-полимеразы, функционально связанный с геном иммунного сигнального фактора, и (ii) промотор (например, конститутивный промотор), функционально связанный с трансктивирующим элементом, соответствующим индуцируемому промотору РНК-полимеразы, для получения сконструированной клетки.

[00548] В некоторых вариантах осуществления промотор индуцируемой РНК-полимеразы представляет собой промотор TRE, а трансктивирующий элемент представляет собой элемент Tet-On, а экзогенный фактор представляет собой тетрациклин или его производное.

[00549] В некоторых вариантах осуществления иммунный сигнальный фактор выбран из группы, состоящей из B2M, MIC-A/B, HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFXANK, CTLA4, PD1, и лигандов NKG2D (*например, MICA, MICB, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1I/ULBP1, RAET1L/ULBP6, и RAET1N/ULBP3*).

[00550] В некоторых вариантах осуществления конститутивный промотор выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[00551] В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит от 5'-конца к 3'-концу: промотор TRE, ген иммунного сигнального фактора, промотор EF1a и элемент Tet-On, а экзогенный фактор представляет собой тетрациклин или его производное. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит от 5'-конца к 3'-концу: промотор TRE, ген B2M, промотор EF1a и элемент Tet-On, а экзогенный фактор представляет собой тетрациклин или его производное.

[00552] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00553] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка композиции

представляет собой выделенную клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку человека.

[00554] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I по сравнению с немодифицированной клеткой человека.

[00555] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СРТА. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию В2М. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека является гипоиммуногенной.

[00556] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, взрослой стволовой клетки и дифференцированной клетки. В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки сердца, клетки печени, клетки почки, клетки поджелудочной железы, нервной клетки, иммунной клетки, мезенхимальной клетки и эндотелиальной клетки.

[00557] В данном документе также описана конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы; ген иммунного сигнального фактора; конститутивный промотор; и трансактивирующий элемент, соответствующий индуцируемому промотору РНК-полимеразы. В некоторых вариантах осуществления промотор индуцируемой РНК-полимеразы представляет собой промотор TRE.

[00558] В некоторых вариантах осуществления иммунный сигнальный фактор выбран из группы, состоящей из В2М, MIC-A/B, HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFXANK, CTLA-4, PD-1, и лигандов NKG2D (*например*, MICA, MICB, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1I/ULBP1, RAET1L/ULBP6, и RAET1N/ULBP3). В некоторых вариантах осуществления иммунный сигнальный фактор представляет собой В2М.

[00559] В некоторых вариантах осуществления конститутивный промотор конструкции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[00560] В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит от 5'-конца к

3'-концу: промотор TRE, последовательность кшРНК, нацеленную на CD47, промотор EF1a и репрессорный элемент Tet.

[00561] В некоторых вариантах осуществления любая из описанных конструкций содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00562] В данном документе предложена композиция, содержащая выделенную клетку, содержащую любую из описанных конструкций. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка подвергается воздействию экзогенного фактора для активации трансаактивирующего элемента. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

[00563] Также предложена композиция, содержащая выделенные дифференцированные клетки, полученные путем культивирования любой описанной в данном документе стволовой клетки в условиях дифференцировки с получением дифференцированной клетки. В некоторых вариантах осуществления условия дифференцировки подходят для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00564] В еще одном аспекте предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий: (а) введение любой из описанных композиций пациенту; и (б) воздействие экзогенного фактора на композицию для активации промотора индуцируемой РНК-полимеразы, тем самым контролируя иммуногенность клеток композиции.

[00565] В данном документе также предложены сконструированные иПСК, которые контролируемо сверхэкспрессируют иммуносупрессивные факторы (например, факторы гипоиимунитета и ингибиторы комплемента). В частности, необходим механизм контроля гипоиимунитета как средство защиты от инфекции или передачи клеток между субъектами. В одном варианте осуществления регулируемая экспрессия иммуносупрессивного фактора достигается за счет индуцируемой экспрессии кшРНК для нокдауна иммуносупрессивного фактора. В еще одном варианте осуществления регулируемая экспрессия достигается с использованием системы дегронов на основе малых молекул, которая нацелена на иммуносупрессивный фактор для протеасомной деградации.

[00566] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, сверхэкспрессию CD47 и индуцируемую кшРНК, нацеленную на CD47.

[00567] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию B2M и СПТА, сверхэкспрессию CD47 и индуцируемую кшРНК, нацеленную на CD47.

[00568] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, сверхэкспрессию CD47 и индуцируемый элемент дегрон, контролирующий CD47.

[00569] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, сверхэкспрессию CD47 и индуцируемый элемент дегрон, контролирующий CD47.

[00570] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, сверхэкспрессию CD47 и элемент дегрон SMASH, контролирующий CD47.

[00571] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, сверхэкспрессию CD47 и элемент дегрон SMASH, контролирующий CD47.

[00572] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, сверхэкспрессию CD47, Cas9 или ее вариант и индуцируемую направляющую РНК, нацеленную на CD47.

[00573] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, сверхэкспрессию CD47, Cas9 или ее вариант и индуцируемую направляющую РНК, нацеленную на CD47.

[00574] В дополнительных вариантах осуществления в данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, сверхэкспрессию CD47, систему индуцируемой деградации белка для модулирования экспрессии CD47, при этом система индуцируемой деградации белка выбрана из группы, состоящей из системы отключения с помощью малых молекул (SMASH), индуцируемого Shield-1 дегрона, индуцируемого ауксином дегрона, индуцируемого IMid дегрона, пептидного дегрона, протеолиз-таргетированной химеры, и антитела для направленной деградации.

[00575] В дополнительных вариантах осуществления в данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, сверхэкспрессию CD47, систему индуцируемой деградации белка для модулирования экспрессии CD47, причем система индуцируемой деградации белка выбрана из группы, состоящей из системы отключения с помощью малых молекул (SMASH), индуцируемого Shield-1 дегрона, индуцируемого ауксином дегрона, индуцируемого IMid дегрона, пептидного дегрона, протеолиз-таргетированной химеры, и антитела для направленной деградации.

[00576] В дополнительных вариантах осуществления в данном документе

предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию молекулы МНС класса I и/или молекулы МНС класса II, сверхэкспрессию CD47, систему регуляции РНК для модулирования экспрессии CD47, при этом система регуляции РНК выбрана из группы, состоящей из индуцируемой кшРНК, индуцируемой киРНК, интерференции CRISPR (CRISPRi) и РНК-нацеленной нуклеазной системы

[00577] В дополнительных вариантах осуществления в данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию B2M и СПТА, сверхэкспрессию CD47, систему регуляции РНК для модулирования экспрессии CD47, причем система регуляции РНК выбрана из группы, состоящей из индуцируемой кшРНК, индуцируемой киРНК, интерференции CRISPR (CRISPRi) и РНК-нацеленной нуклеазной системы

[00578] В дополнительных вариантах осуществления в данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию молекулы МНС класса I и/или молекулы МНС класса II, сверхэкспрессию CD47, систему регуляции ДНК для модулирования экспрессии CD47, при этом система регуляции ДНК выбрана из группы, состоящей из системы экспрессии на основе тканеспецифического промотора, системы экспрессии на основе индуцибельного промотора, регулируемой молекулой системы на основе рибопереклювателя, и системы редактирования генома на основе индуцибельной нуклеазы

[00579] В дополнительных вариантах осуществления в данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию B2M и СПТА, сверхэкспрессию CD47, систему регуляции ДНК для модулирования экспрессии CD47, при этом система регуляции ДНК выбрана из группы, состоящей из системы экспрессии на основе тканеспецифичного промотора, системы экспрессии на основе индуцибельного промотора, регулируемой молекулой системы на основе рибопереклювателя, и системы редактирования генома на основе индуцибельной нуклеазы

[00580] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, сверхэкспрессию CD47 и индуцируемую систему для модулирования (например, снижения) экспрессии CD47.

[00581] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию B2M и СПТА, сверхэкспрессию CD47 и индуцируемую систему для модулирования (например, снижения) экспрессии CD47.

[00582] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена дифференцированная клетка, полученная из любой из плюрипотентных стволовых клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки сердца, клетки печени, клетки почки, клетки поджелудочной железы, нервной клетки, иммунной клетки,

мезенхимальной клетки и эндотелиальной клетки.

[00583] В некоторых вариантах осуществления настоящая технология обеспечивает гипои́ммуногенные плюрипотентные клетки, которые содержат «защитный переключатель», такой как система снижения экспрессии ДНК иммуносупрессивного фактора, снижения экспрессии РНК иммуносупрессивного фактора, снижения экспрессии белка иммуносупрессивного фактора, повышения экспрессии ДНК иммуносупрессивного фактора, активации РНК иммунного сигнального фактора и активации белка иммунного сигнального фактора. Они включены для функционирования в качестве «защитного переключателя», который может вызвать гибель гипои́ммуногенных плюрипотентных клеток или гипои́ммуногенных дифференцированных клеток, если они растут и делятся нежелательным образом у субъекта-реципиента и в месте приживления. В некоторых вариантах осуществления настоящая технология также включает применение суицидального гена, выбранного из EGFRt, HSVtk, цитозиндезаминазы, iCaspase9 и NTR.

2. Взаимозависимость защитных переключателей и иммуносупрессивных факторов

[00584] В одном аспекте в данном документе предложена конструкция, содержащая от 5'-конца к 3' концу: (1) трансген защитного переключателя; (2) последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; (3) ген гипои́ммунизета. В некоторых вариантах осуществления конструкция также содержит элемент регуляции транскрипции, функционально связанный с трансгеном защитного переключателя, и последовательность полиаденилирования на 3'-конце гена гипои́ммунизета. В некоторых вариантах осуществления любая из конструкций также содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00585] В еще одном аспекте в данном документе предложена конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) ген гипои́ммунизета; (2) последовательность проскока рибосом или линкер; (3) трансген защитного переключателя. В некоторых вариантах осуществления конструкция также содержит элемент регуляции транскрипции, функционально связанный с геном гипои́ммунизета, и последовательность полиаденилирования на 3'-конце трансгена защитного переключателя. В некоторых вариантах осуществления любая из конструкций также содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00586] В некоторых вариантах осуществления трансген защитного переключателя конструкции выбран из группы, состоящей из гена HSVtk, гена цитозиндезаминазы, гена нитроредуктазы, гена пуриннуклеозидфосфорилазы, гена пероксидазы хрена, гена iCaspase9, трансгена HER1, трансгена RQR8, трансгена CD20, трансгена CCR4, трансгена HER2, трансгена CD19, трансгена MUC1, трансгена EGFR, трансгена GD2, трансгена PSMA, трансгена CD16 и трансгена CD30.

[00587] В некоторых вариантах осуществления последовательность пропуска рибосом включает последовательность, кодирующую последовательность IRES, или последовательность, кодирующую 2A-кодирующую последовательность.

[00588] В некоторых вариантах осуществления 2A-кодирующая

последовательность выбрана из группы, состоящей из T2A, P2A, E2A и F2A.

[00589] В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

[00590] В некоторых вариантах осуществления ген гипоиммунитета выбран из группы, состоящей из: CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, и Mfge8.

[00591] В некоторых вариантах осуществления конструкции элемент регуляции транскрипции выбран из группы, состоящей из промотора эукариотического фактора элонгации трансляции 1 α 1 (EF1A), промотора короткой формы эукариотического фактора элонгации трансляции 1 α 1 (EFS), немедленно-раннего энхансера/промотора цитомегаловируса (промотора CMV), раннего энхансера CMV, слитого с промотором модифицированного куриного Р-актина (CAGGS), промотора обезьяньего вируса 40 (SV40), промотора транспозона Copia (COPIA), промотора актина 5C (ACT5C), тетрациклин-чувствительного промоторного элемента (промотора TRE), раннего энхансера CMV, слитого с промотором модифицированного куриного Р-актина (CBh), промотора фосфоглицераткиназы 1 (PGK) и промотора убиквитина С (UBC).

[00592] В данном документе предложены способы доставки конструкции в выделенную клетку. Способ включает трансдукцию выделенной клетки лентивирусной конструкцией, содержащей любую из описанных выше конструкций; и отбор сконструированной клетки, несущей трансген защитного переключателя и ген гипоиммунитета.

[00593] Также предложена выделенная клетка или ее популяция, содержащая любую конструкцию, описанную выше.

[00594] В некоторых вариантах осуществления конструкция была введена в целевой локус гена.

[00595] В некоторых вариантах осуществления целевой локус гена выбран из группы, состоящей из локуса «безопасная гавань» и локуса гена иммунного сигналинга.

[00596] В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» выбран из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5.

[00597] В некоторых вариантах осуществления локус гена иммунного сигналинга выбран из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, RFXANK, СПТА, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1/ULBP1, RAET1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3, и других лигандов NKG2D.

[00598] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00599] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В определенных вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СПТА. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию В2М. В конкретных вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка является гипои иммуногенной.

[00600] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентных стволовых клеток и взрослой стволовой клетки.

[00601] В данном документе предложена дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования любой из стволовых клеток, описанных выше, в условиях дифференцировки с получением дифференцированной клетки или ее популяции.

[00602] В некоторых вариантах осуществления условия дифференцировки подходят для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00603] Кроме того, в данном документе описан способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции, как описано выше.

[00604] В данном документе предложен способ лечения пациента, включающий активацию защитного переключателя у пациента, которому ранее вводили дифференцированные клетки или их популяцию, как описано в данном документе.

[00605] В некоторых аспектах в данном документе предложена конструкция для гомологичной репарации в локусе «безопасная гавань», содержащий от 5'-конца к 3'-концу: (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань»; (2) трансген защитного переключателя; (3) последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; (4) ген гипои мунитета; (5) последовательность полиаденилирования; и (6) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань».

[00606] В некоторых аспектах в данном документе предложена конструкция для гомологичной репарации в локусе «безопасная гавань», содержащий от 5'-конца к 3'-концу: (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга; (2) трансген защитного переключателя; (3) последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; (4) ген гипои мунитета; (5) последовательность полиаденилирования; и (6) второе плечо

гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга.

[00607] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит элемент регуляции транскрипции, выбранный из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC, который расположен на 5'-конце трансгена защитного переключателя.

[00608] В некоторых вариантах осуществления трансген защитного переключателя выбран из группы, состоящей из гена HSVtk, гена цитозиндезаминазы, гена нитроредуктазы, гена пуриннуклеозидфосфорилазы, гена пероксидазы хрена, гена iCaspase9, трансгена HER1, трансгена RQR8, трансгена CD20, трансгена CCR4, трансгена HER2, трансгена CD19, трансгена MUC1, трансгена EGFR, трансгена GD2, трансгена PSMA, трансгена CD16 и трансгена CD30.

[00609] В некоторых вариантах осуществления последовательность проскока рибосом содержит последовательность, кодирующую последовательность IRES, или последовательность, кодирующую 2A-кодирующую последовательность. В определенных вариантах осуществления 2A-кодирующая последовательность выбрана из группы, состоящей из T2A, P2A, E2A и F2A, таких как те, которые приведены в таблице 2.

[00610] В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из любого линкера в таблице 3.

[00611] В некоторых вариантах осуществления ген гипоиммунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, и Mfge8.

[00612] В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» выбран из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5.

[00613] В некоторых вариантах осуществления локус гена иммунного сигналинга выбран из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, RFXANK, СПТА, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAETI/ULBP1, RAET1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3, и других лигандов NKG2D.

[00614] В некоторых вариантах осуществления конструкция позволяет нацеливающей нуклеазе расщеплять локус «безопасная гавань» или локус гена иммунного сигналинга, тем самым позволяя конструкции рекомбинировать в локус посредством гомологичной репарации.

[00615] В еще одном аспекте в данном документе предложена выделенная клетка или ее популяция, содержащая трансген защитного переключателя и ген гипоиммунитета, интегрированный в локус «безопасная гавань» или локус гена иммунного сигналинга, где конструкция по любому из пп. 29-39 рекомбинировала в эндогенный локус «безопасная гавань» клетки, или при этом конструкция по любому из пп. 30-39 рекомбинировала в эндогенный целевой локус гена клетки.

[00616] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека.

[00617] В определенных вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СПТА. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию В2М. В определенных вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка является гипоиммуногенной.

[00618] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентных стволовых клеток и взрослой стволовой клетки.

[00619] Также предложена дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования любой из стволовых клеток, описанных выше, в условиях дифференцировки с получением дифференцированной клетки или ее популяции.

[00620] В некоторых вариантах осуществления условия дифференцировки подходят для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00621] Также предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту любых описанных дифференцированных клеток или их популяции.

[00622] В данном документе также предложен способ лечения пациента, включающий активацию защитного переключателя у пациента, которому ранее вводили дифференцированные клетки или их популяцию, как описано в данном документе.

[00623] В некоторых аспектах в данном документе предложена независимая от гомологии донорная конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) 5'-концевые длинные повторы (LTR), содержащие левый элемент (LE); (2) элемент акцептор сплайсинга-вирусный пептид 2A (SA-2A); (3) трансген защитного переключателя; (4) последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (5) ген гипоиммунитета; (6) последовательность полиаденилирования; и (7) 3' LTR, содержащий правый элемент (RE).

[00624] В некоторых вариантах осуществления конструкция предназначена для интеграции в целевой локус гена выделенной клетки для нарушения экспрессии целевого

гена.

[00625] В некоторых вариантах осуществления трансген защитного переключателя выбран из группы, состоящей из гена HSVtk, гена цитозиндезаминазы, гена нитроредуктазы, гена пуриннуклеозидфосфорилазы, гена пероксидазы хрена, гена iCaspase9, трансгена HER1, трансгена RQR8, трансгена CD20, трансгена CCR4, трансгена HER2, трансгена CD19, трансгена MUC1, трансгена EGFR, трансгена GD2, трансгена PSMA, трансгена CD16 и трансгена CD30.

[00626] В некоторых вариантах осуществления фактор или ген гипоиимунитета выбран из группы, состоящей из: CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, и Mfge8.

[00627] В некоторых вариантах осуществления целевой locus гена представляет собой locus гена иммунного сигналинга, выбранного из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, RFXANK, CIITA, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1I/ULBP1, RAET1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3, и других лигандов NKG2D.

[00628] В некоторых вариантах осуществления целевой locus гена представляет собой locus «безопасная гавань», выбранный из группы, состоящей из locus AAVS1, locus CLBYL, locus CXCR4, locus Rosa26 и locus CCR5.

[00629] В данном документе предложена выделенная клетка или ее популяция, при этом любая из указанных выше конструкций интегрирована в эндогенный целевой ген для нарушения экспрессии целевого гена в клетке.

[00630] В некоторых вариантах осуществления конструкция интегрирована в целевой ген в целевом сайте нуклеазы или транспозазы. В некоторых вариантах оба аллеля целевого гена нарушены в результате воздействия нуклеазы или транспозазы.

[00631] Также предложен способ доставки конструкции в выделенную клетку, включающий трансдукцию выделенной клетки лентивирусной конструкцией, содержащей любую из описанных в данном документе конструкций; и отбор сконструированной клетки, несущей трансген защитного переключателя и ген гипоиимунитета.

[00632] В других аспектах любая из описанных конструкций интегрирована в эндогенный целевой ген для нарушения экспрессии целевого гена в клетке. В некоторых вариантах осуществления конструкция интегрирована в целевой ген в целевом сайте нуклеазы или транспозазы.

[00633] В еще одном аспекте данное изобретение относится к слитому белку рекомбинантного пептидного эпитопа, содержащему: (1) фактор гипоиимунитета; и (2) экспонированный на поверхности пептидный эпитоп, гетерологичный фактору гипоиимунитета.

[00634] В некоторых вариантах осуществления фактор гипоиимунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, Mfge8 и их мембраносвязанных форм.

[00635] В некоторых вариантах осуществления пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

[00636] В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутузумаба, ублитуксимаба, окаратузумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотузумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томузотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RLic и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или эпитоп CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или эпитоп CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

[00637] В некоторых вариантах осуществления фактор гипоиммунитета находится на N-конце слитого белка. В других вариантах осуществления пептидный эпитоп находится на N-конце слитого белка.

[00638] В некоторых вариантах осуществления слитый белок дополнительно содержит линкер, соединяющий фактор гипоиммунитета и пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления слитый белок дополнительно содержит другой линкер, расположенный на N-конце или C-конце слитого белка. В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из любого линкера в таблице 2.

[00639] В еще одном аспекте предложена конструкция, кодирующая слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа, содержащая: (1) последовательность, кодирующую фактор гипоиммунитета; и (2) последовательность, кодирующую экспонированный на поверхности пептидный эпитоп, гетерологичный фактору гипоиммунитета.

[00640] В некоторых вариантах осуществления конструкции фактор гипоиммунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, Mfge8, и их мембраносвязанных форм.

[00641] В некоторых вариантах осуществления конструкции пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа

CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

[00642] В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутузумаба, ублитуксимаба, окаратузумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотузумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томизотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, c.60C3-RLic и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или эпитоп CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или эпитоп CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

[00643] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая фактор гипои́ммунитета, расположена на 5'-конце последовательности, кодирующей пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая пептидный эпитоп, расположена на 5'-конце последовательности, кодирующей фактор гипои́ммунитета.

[00644] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкер, соединяющий последовательность, кодирующую фактор гипои́ммунитета, и последовательность, кодирующую пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность, кодирующую другой линкер, расположенный на N-конце или C-конце слитого белка. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой любой линкер из таблицы 2.

[00645] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит элемент регуляции транскрипции, выбранный из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC, таких как те, которые приведены в таблице 4.

[00646] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит первое плечо гомологии и второе плечо гомологии, гомологичные целевому локусу гена, для гомологичной репарации на основе CRISPR.

[00647] В дополнительных вариантах осуществления конструкция содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00648] В данном документе предложен способ доставки конструкции в выделенную клетку, включающий трансдукцию выделенной клетки лентивирусной конструкцией, содержащей любую конструкцию, описанную выше; и отбор сконструированной клетки, экспрессирующей слитый белок фактор гипоиимунитета-пептидный эпитоп.

[00649] Кроме того, в данном документе описана выделенная клетка или ее популяция, содержащая любую конструкцию, описанную выше.

[00650] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку человека.

[00651] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I по сравнению с немодифицированной клеткой человека.

[00652] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00653] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию В2М. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка является гипоиимуногенной.

[00654] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентных стволовых клеток и взрослой стволовой клетки.

[00655] В данном документе предложена дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования любой стволовой клетки, описанной в данном документе, в условиях дифференцировки для получения дифференцированной клетки или ее популяции.

[00656] В некоторых вариантах осуществления условия дифференцировки подходят для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00657] В некоторых аспектах предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту любых дифференцированных клеток или их популяции, как указано выше.

[00658] В одном аспекте предложен способ лечения пациента, включающий введение пациенту, которому ранее вводили дифференцированную клетку или ее популяцию, как указано выше, антитела, которое связывает пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления антитело опосредует АЗКЦ или КЗЦ.

[00659] В одном аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку рекомбинантный CD47-внутренний пептидный эпитоп, содержащий от N-конца к С-концу: (1) человеческий фрагмент CD47, содержащий домен IgV CD47; (2) первый линкер; (3) гетерологичный пептидный эпитоп (например, гетерологичный пептидный эпитоп человека); (4) второй линкер; и (5) трансмембранный домен CD47 человека.

[00660] В некоторых вариантах осуществления слитого белка фрагмент CD47 человека, содержащий домен IgV, содержит аминокислотные остатки 1-127 белка CD47 человека. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD47 человека содержит аминокислотные остатки 128-348 белка CD47 человека.

[00661] В некоторых вариантах осуществления первый и второй линкеры слитого белка выбраны из любых линкеров в таблице 2.

[00662] В некоторых вариантах осуществления пептидный эпитоп слитого белка выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

[00663] В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутумаба, ублитуксимаба, окаратузумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томузотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RLic и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или эпитоп CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или эпитоп CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

[00664] В еще одном аспекте предложена конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) элемент регуляции транскрипции; (2) последовательность, кодирующую фрагмент CD47 человека, содержащий домен IgV; (3) первый линкер; (4)

последовательность, кодирующую гетерологичный пептидный эпитоп (например, гетерологичный пептидный эпитоп человека); (5) второй линкер; и (6) последовательность, кодирующую фрагмент CD47 человека, включающий трансмембранный домен и С-конец.

[00665] В некоторых вариантах осуществления конструкции фрагмент CD47 человека, содержащий домен IgV, содержит аминокислотные остатки 1-127 белка CD47 человека. В некоторых вариантах осуществления фрагмент CD47 человека, содержащий трансмембранный домен и С-конец, содержит аминокислотные остатки 128-348 белка CD47 человека. В некоторых вариантах осуществления первый и второй линкеры выбраны из любых в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

[00666] В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутумаба, ублитуксимаба, окаратумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томизотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RL1c и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или эпитоп CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или эпитоп CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

[00667] В некоторых вариантах осуществления элемент регуляции конструкции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC, таких как те, которые приведены в таблице 4.

[00668] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит первое плечо гомологии и второе плечо гомологии, гомологичные целевому локусу гена, для гомологичной репарации на основе CRISPR.

[00669] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно

содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00670] В некоторых аспектах предложен способ доставки конструкции в выделенную клетку, включающий трансдукцию выделенной клетки лентивирусной конструкцией, содержащей любую описанную выше конструкцию; и отбор сконструированной клетки, экспрессирующей слитый белок CD47-внутренний пептидный эпитоп.

[00671] В некоторых аспектах предложена выделенная клетка или ее популяция, содержащая описанную выше конструкцию.

[00672] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку человека.

[00673] В определенных вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В определенных вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СРТА. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию В2М. В других вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию NLRC5. В некоторых вариантах осуществления клетка является гипоиμмуногенной.

[00674] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентных стволовых клеток и взрослой стволовой клетки.

[00675] В некоторых аспектах в данном документе описана дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования стволовой клетки, описанной выше, в условиях дифференцировки для получения дифференцированной клетки или ее популяции.

[00676] В некоторых вариантах осуществления условия дифференцировки подходят для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00677] В некоторых аспектах предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции, как описано в данном документе.

[00678] В одном аспекте предложен способ лечения пациента, включающий

введение пациенту, которому ранее вводили дифференцированную клетку или ее популяцию, как описано в данном документе, антитела, которое связывает пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления антитело опосредует АЗКЦ или КЗЦ.

[00679] В еще одном аспекте предложена бицистронная конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) элемент регуляции транскрипции; (2) последовательность, кодирующую пептидный эпитоп (например, экспонированный на поверхности пептидный эпитоп); (3) последовательность проскока рибосом; и (4) последовательность, кодирующую фактор гипоиммунитета.

[00680] В некоторых вариантах бицистронной конструкции фактор гипоиммунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, Mfge8 и их мембраносвязанных форм.

[00681] В некоторых вариантах осуществления пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

[00682] В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутумаба, ублитуксимаба, окаратумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томзотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RL1c и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или эпитоп CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или эпитоп CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

[00683] В некоторых вариантах осуществления бицистронной конструкции последовательность пропуска рибосом включает последовательность, кодирующую последовательность IRES, или последовательность, кодирующую 2А-кодирующую последовательность.

[00684] В некоторых вариантах осуществления 2А-кодирующая последовательность выбрана из группы, состоящей из Т2А, Р2А, Е2А и F2А, таких как те,

которые приведены в таблице 2.

[00685] В некоторых вариантах осуществления элемент регуляции транскрипции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC, таких как те, которые приведены в таблице 4.

[00686] В некоторых вариантах осуществления бицистронная конструкция дополнительно содержит первое плечо гомологии и второе плечо гомологии, гомологичные целевому локусу гена, для гомологичной репарации на основе CRISPR. В определенных вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00687] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ доставки конструкции в выделенную клетку, включающий трансдукцию выделенной клетки лентивирусной конструкцией, содержащей описанную выше конструкцию; и выбор сконструированной клетки, экспрессирующей фактор гипоиимунитета и пептидный эпитоп.

[00688] В некоторых аспектах описана выделенная клетка или ее популяция, содержащая описанную выше конструкцию.

[00689] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку человека.

[00690] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I по сравнению с немодифицированной клеткой человека.

[00691] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию B2M. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка является гипоиимуногенной.

[00692] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентных стволовых клеток и взрослой стволовой клетки.

[00693] В некоторых аспектах описана дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования стволовой клетки As, описанной выше, в условиях дифференцировки для получения дифференцированной клетки или ее популяции.

[00694] В некоторых вариантах осуществления условия дифференцировки

подходят для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00695] В некоторых аспектах описан способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции, как описано выше.

[00696] В одном аспекте описан способ лечения, включающий введение пациенту, которому ранее вводили дифференцированную клетку или ее популяцию, как указано, антитела, которое связывается с пептидным эпитопом. В некоторых вариантах осуществления антитело опосредует АЗКЦ или КЗЦ.

[00697] В данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, трансген защитного переключателя и ген гипоииммунитета, при этом экспрессия трансгена защитного переключателя модулирует экспрессию гена гипоииммунитета.

[00698] В данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию В2М и СИТА, сверхэкспрессию CD47, трансген защитного переключателя и ген гипоииммунитета, при этом экспрессия трансгена защитного переключателя модулирует экспрессию гена гипоииммунитета.

[00699] В данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, защитный переключатель и фактор гипоииммунитета, при этом экспрессия защитного переключателя модулирует экспрессию фактора гипоииммунитета.

[00700] В данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию В2М и СИТА, сверхэкспрессию CD47, защитный переключатель и фактор гипоииммунитета, причем экспрессия защитного переключателя модулирует экспрессию фактора гипоииммунитета.

[00701] В данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II и фактор гипоииммунитета, связанный с экспонированным на поверхности пептидным эпитопом; при этом пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD30 и эпитопа CD16, а фактор гипоииммунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, Mfge8 и их мембраносвязанных форм.

[00702] В данном документе предложена плюрипотентная стволовая клетка, имеющая сниженную или подавленную экспрессию В2М и СИТА, сверхэкспрессию CD47 и содержащая фактор гипоииммунитета, связанный с экспонированным на поверхности пептидным эпитопом; при этом пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из

эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30, а фактор гипои́ммунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, Mfge8 и их мембраносвязанных форм.

3. Взаимозависимость защитных выключателей и основных клеточных факторов

[00703] В одном аспекте в данном документе предложена конструкция, содержащая от 5'-конца к 3' концу: (1) трансген защитного переключателя; (2) последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; и (3) ген основного клеточного фактора. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит элемент регуляции транскрипции, функционально связанный с трансгеном защитного переключателя, и последовательность полиаденилирования на 3'-конце гена основного клеточного фактора. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит первое плечо гомологии и второе плечо гомологии, гомологичные целевому локусу гена, для гомологичной репарации на основе CRISPR. В других вариантах осуществления конструкция содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00704] В некоторых аспектах в данном документе предложена конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) ген основного клеточного фактора; (2) последовательность проскока рибосом или линкер; и (3) трансген защитного переключателя. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит элемент регуляции транскрипции, функционально связанный с геном основного клеточного фактора, и последовательность полиаденилирования на 3'-конце трансгена защитного переключателя. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит первое плечо гомологии и второе плечо гомологии, гомологичные целевому локусу гена, для гомологичной репарации на основе CRISPR. В других вариантах осуществления конструкция содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00705] В одном аспекте в данном документе предложена конструкция для гомологичной репарации в локусе «безопасная гавань», содержащую от 5'-конца к 3'-концу: (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань»; (2) трансген защитного переключателя; (3) последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (4) ген основного клеточного фактора; (5) последовательность полиаденилирования; и (6) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань».

[00706] В еще одном аспекте в данном документе предложена конструкция для гомологичной репарации в локусе «безопасная гавань», содержащий от 5'-конца к 3'-концу: (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань»; (2) ген основного клеточного фактора; (3)

последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (4) трансген защитного переключателя; (5) последовательность полиаденилирования; и (6) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань»

[00707] В одном аспекте в данном документе предложена конструкция для гомологичной репарации в ген иммунного сигналинга, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга; (2) трансген защитного переключателя; (3) последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (4) ген основного клеточного фактора; (5) последовательность полиаденилирования; и (6) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга.

[00708] В одном аспекте в данном документе предложена конструкция для гомологичной репарации в ген иммунного сигналинга, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга; (2) ген основного клеточного фактора; (3) последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (4) трансген защитного переключателя; (5) последовательность полиаденилирования; и (6) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга.

[00709] В некоторых вариантах осуществления конструкция позволяет нацеливающей нуклеазе расщеплять локус «безопасная гавань» или локус гена иммунного сигналинга, тем самым позволяя конструкции рекомбинировать в локус посредством гомологичной репарации.

[00710] В некоторых аспектах в данном документе предложена независимая от гомологии донорная конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) 5'-длинные концевые повторы (LTR), содержащие левый элемент (LE); (2) элемент акцептор сплайсинга-вирусный пептид 2A (SA-2A); (3) трансген защитного переключателя; (4) последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (5) ген основного клеточного фактора; (6) последовательность полиаденилирования; и (7) 3' LTR, содержащий правый элемент (RE).

[00711] В одном аспекте в данном документе предложена независимая от гомологии донорная конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) 5'-длинные концевые повторы (LTR), содержащие левый элемент (LE); (2) элемент акцептор сплайсинга-вирусный пептид 2A (SA-2A); (3) ген основного клеточного фактора; (4) последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (5) трансген защитного переключателя; (6) последовательность полиаденилирования; и (7) 3' LTR, содержащий правый элемент (RE).

[00712] В некоторых аспектах в данном документе предложена выделенная клетка, выживание которой зависит от экспрессии основного гена как части любой из

коэкспрессирующих конструкций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка или ее популяция содержит рекомбинантный основной клеточный фактор и защитный переключатель, при этом эндогенный ген основного клеточного фактора инактивирован (например, вырезан). В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка является гомозиготной по нокауту гена основного клеточного фактора. В одном варианте осуществления трансген основного клеточного фактора и трансген защитного переключателя вводят в выделенную клетку посредством лентивирусной доставки. В другом варианте осуществления трансген основного клеточного фактора и трансген защитного переключателя вводят в локус «безопасная гавань» или локус гена иммунного сигналинга.

[00713] В некоторых вариантах осуществления любая из описанных клеток неспособна экспрессировать основной клеточный фактор из эндогенных локусов. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена нацеливающая нуклеаза (такая как описанная в данном документе) для расщепления и инактивации локуса основного гена, тем самым делая выживание клетки зависимым от экспрессии основного гена как части коэкспрессионной конструкции.

[00714] Также в данном документе предложена выделенная клетка или ее популяция, содержащая ген основного клеточного фактора, функционально связанный с последовательностью, кодирующей линкер, который функционально связан с трансгеном защитного переключателя. В некоторых вариантах осуществления защитный переключатель напрямую связан с эндогенным локусом гена основного клеточного фактора. В таких случаях экспрессия основного клеточного фактора остается неизменной.

[00715] В некоторых вариантах осуществления любой из конструкций, клеток и способов трансген защитного переключателя выбран из группы, состоящей из гена HSVtk, гена цитозиндезаминазы, гена нитроредуктазы, гена пуриннуклеозидфосфорилазы, гена пероксидазы хрена, гена iCaspase9, трансгена HER1, трансгена RQR8, трансгена CD20, трансгена CCR4, трансгена HER2, трансгена CD19, трансгена MUC1, трансгена EGFR, трансгена GD2, трансгена PSMA, трансгена CD30 и трансгена CD16.

[00716] В других вариантах осуществления трансген защитного переключателя кодирует симпортер натрия/йодида (NIS). Специфичные для NIS радиоизотопы (например, 1-125 и 1-131) можно использовать для нацеливания и уничтожения клеток, экспрессирующих NIS.

[00717] В некоторых вариантах осуществления конструкций, клеток и способов основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы и белка субъединицы сплайсосомы.

[00718] В некоторых вариантах осуществления конструкций, клеток и способов основной клеточный фактор выбран из группы, идентифицированной как основные гены на основе скрининга функциональной геномики.

[00719] В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» выбран

из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5.

[00720] В некоторых вариантах осуществления локус гена иммунного сигналинга выбран из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D и HLA-E.

[00721] Любая из конструкций может быть введена в выделенную клетку в соответствии со способами, признанными специалистами в данной области техники.

[00722] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка, описанная в данном документе, представляет собой аутологичную или аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку человека.

[00723] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию B2M. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека является гипоиммуногенной.

[00724] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, взрослой стволовой клетки и дифференцированной клетки. В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки сердца, клетки печени, клетки почки, клетки поджелудочной железы, нервной клетки, иммунной клетки, мезенхимальной клетки и эндотелиальной клетки.

[00725] В данном документе описаны способы лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающие введение пациенту любых из указанных клеток.

[00726] В данном документе также предложен способ лечения пациента, включающий активацию защитного переключателя у пациента, которому ранее вводили дифференцированные клетки или их популяцию, как описано в данном документе.

[00727] В некоторых аспектах в данном документе предложена конструкция, содержащая (1) элемент регуляции транскрипции, (2) ген основного клеточного фактора,

(3) посттранскрипционный или посттрансляционный регуляторный элемент и (4) последовательность полиаденилирования.

[00728] В некоторых вариантах осуществления основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы и белка субъединицы сплайсосомы.

[00729] В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент конструкции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[00730] В некоторых вариантах осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент представляет собой систему регуляции РНК, выбранную из группы, состоящей из индуцируемой кшРНК, индуцируемой киРНК, интерференции CRISPR (CRISPRi) и РНК-нацеленной нуклеазной системы

[00731] В некоторых вариантах осуществления посттрансляционный регуляторный элемент представляет собой систему индуцируемой деградации белка, выбранную из группы, состоящей из системы отключения с помощью малых молекул (SMASH), индуцируемого Shield-1 дегрона, индуцируемого ауксином дегрона, индуцируемого IMid дегрона, пептидного дегрона, протеолиз-таргетированной химеры, и антитела для направленной деградации.

[00732] В еще одном аспекте в данном документе предложена выделенная клетка, содержащая рекомбинантный основной клеточный фактор, находящийся под контролем посттранскрипционного или посттрансляционного регуляторного элемента, причем ген эндогенного основного клеточного фактора инактивирован, а экспрессия рекомбинантного основного клеточного фактора регулируется с помощью экзогенного фактора.

[00733] В некоторых вариантах осуществления основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы и белка субъединицы сплайсосомы.

[00734] В некоторых вариантах осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент представляет собой систему регуляции РНК, выбранную из группы, состоящей из индуцируемой кшРНК, индуцируемой киРНК, интерференции CRISPR (CRISPRi) и РНК-нацеленной нуклеазной системы

[00735] В некоторых вариантах осуществления посттрансляционный регуляторный элемент представляет собой систему индуцируемой деградации белка, выбранную из группы, состоящей из системы отключения с помощью малых молекул (SMASH), индуцируемого Shield-1 дегрона, индуцируемого ауксином дегрона, индуцируемого IMid дегрона, пептидного дегрона, протеолиз-таргетированной химеры, и антитела для направленной деградации.

[00736] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека представляет собой аутологичную клетку или аллогенную клетку.

[00737] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СПТА. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию В2М. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка является гипои иммуногенной.

[00738] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, взрослой стволовой клетки и дифференцированной клетки. В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки сердца, клетки печени, клетки почки, клетки поджелудочной железы, нервной клетки, иммунной клетки, мезенхимальной клетки и эндотелиальной клетки.

[00739] В данном документе описаны способы лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающие введение пациенту любых из указанных клеток.

[00740] Также в данном документе предложен способ лечения пациента, включающий активацию регулятора у пациента, которому ранее вводили дифференцированные клетки или их популяцию, как описано в данном документе.

[00741] В одном аспекте в данном документе предложен слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа, содержащий: (1) основной клеточный фактор; и (2) экспонированный на поверхности пептидный эпитоп, гетерологичный основному клеточному фактору.

[00742] В некоторых вариантах осуществления основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psm14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы, белка субъединицы сплайсосомы и их мембраносвязанных форм.

[00743] В некоторых вариантах осуществления пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа

CD30.

[00744] В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутузумаба, ублитуксимаба, окаратузумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RLIb и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотузумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томузотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RLic и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

[00745] В некоторых вариантах осуществления основной клеточный фактор находится на N-конце слитого белка. В некоторых вариантах осуществления пептидный эпитоп находится на N-конце слитого белка.

[00746] В некоторых вариантах осуществления слитый белок дополнительно содержит линкер, соединяющий основной клеточный фактор и пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления слитый белок дополнительно содержит другой линкер, расположенный на N-конце или C-конце слитого белка.

[00747] В некоторых аспектах в данном документе предложена конструкция, кодирующая слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа, содержащая: (1) последовательность, кодирующую основной клеточный фактор; и (2) последовательность, кодирующую экспонированный на поверхности пептидный эпитоп, гетерологичный основному клеточному фактору.

[00748] В некоторых вариантах осуществления основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы, белка субъединицы сплайсосомы и их мембраносвязанных форм.

[00749] В некоторых вариантах осуществления пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

[00750] В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD20 распознается

терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутузумаба, ублитуксимаба, окаратузумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RLIb и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотузумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томузотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RLic и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

[00751] В некоторых вариантах конструкции последовательность, кодирующая основной клеточный фактор, расположена на 5'-конце последовательности, кодирующей пептидный эпитоп. В определенных вариантах осуществления последовательность, кодирующая пептидный эпитоп, расположена на 5'-конце последовательности, кодирующей основной клеточный фактор.

[00752] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность, кодирующую линкер, соединяющий последовательность, кодирующую основной клеточный фактор, и последовательность, кодирующую пептидный эпитоп.

[00753] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит последовательность, кодирующую другой линкер, расположенный на N-конце или C-конце слитого белка.

[00754] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит элемент регуляции транскрипции, выбранный из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

[00755] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит первое плечо гомологии и второе плечо гомологии, гомологичные целевому локусу гена, для гомологичной репарации на основе CRISPR.

[00756] В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

[00757] Также в данном документе предложен способ доставки конструкции в

выделенную клетку, включающий трансдукцию выделенной клетки лентивирусной конструкцией, содержащей конструкцию, описанную в данном документе; и отбор сконструированной клетки, экспрессирующей слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа.

[00758] Также в данном документе предложена выделенная клетка или ее популяция, содержащая конструкцию, описанную выше.

[00759] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой выделенную клетку человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка человека представляет собой аутологичную клетку или аллогенную клетку.

[00760] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СРТА. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию В2М. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию NLRC5. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка является гипоиimmunогенной.

[00761] В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентных стволовых клеток и взрослой стволовой клетки.

[00762] В одном аспекте предложена дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования описанной в данном документе стволовой клетки в условиях дифференцировки с получением дифференцированной клетки или ее популяции. В некоторых вариантах осуществления условия дифференцировки подходят для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

[00763] В некоторых аспектах предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции, указанных выше.

[00764] Также описан способ лечения пациента, включающий введение пациенту, которому ранее вводили дифференцированную клетку или ее популяцию, описанные в данном документе, антитела, которое связывает пептидный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления антитело опосредует АЗКЦ или КЗЦ.

IV. ПРИМЕРЫ

А. Пример 1. Снижение экспрессии CD47 с использованием индуцируемых кшРНК, нацеленных на CD47

[00765] В этом примере описывается создание и оценка индуцируемой кшРНК, нацеленной на CD47, введенной с помощью трансдукции лентивирусом.

[00766] Короткие шпилечные РНК (кшРНК) представляют собой последовательности РНК, которые имеют структуру шпильки. Молекулы кшРНК подвергаются процессингу внутри клетки с образованием киРНК, которые, в свою очередь, приводят к нокдауну экспрессии генов. Затем этот продукт подвергается процессингу и загружается в РНК-индуцируемый сайленсинговый комплекс (RISC). Процессированная кшРНК направляет RISC к мРНК, имеющей комплементарную последовательность. В случае идеальной комплементарности мРНК CD47 RISC расщепляет мРНК, подавляя тем самым экспрессию гена. Индуцируемая библиотека кшРНК была разработана для нацеливания на мРНК CD47 мыши и человека, так что при индукции экспрессии кшРНК небольшой молекулой экспрессия CD47 снижается.

[00767] Конструкция индуцируемой лентивирусной кшРНК. Для создания конструкции индуцируемого лентивирусного вектора в качестве остова использовали лентивирусную плазмиду третьего поколения pRSIT. Кассета, содержащая shRNA-EF1a-Tet репрессор-2A-TagGFP-2A-гигромицин, была включена ниже промотора U6Tet, Tet-индуцируемого производного промотора РНК-полимеразы U6 типа III, который обеспечивает надежную экспрессию кшРНК (см. Фиг. 1). Последовательность репрессора Tet представляет собой модифицированный трансактиватор Tet-On 3G, который был разработан для повышения более высокой чувствительности к индуктору доксициклину. Репрессор Tet был слит с пептидом T2A на TagGFP и гигромицином для селекции. Мы разработали 10 таких конструкций, нацеленных на CD47 мыши, и 10, нацеленных на CD47 человека.

[00768] Продукция вируса и трансдукция клеток. Для получения вирусных частиц клетки НЕК293LX (Takara) высевали в количестве 5×10^5 на чашки Петри диаметром 10 см. Через 24 часа после посева клетки трансфицировали с использованием полибрена со следующими плазмидами: 1,5 мкг псевдотипированного вектора VSV-G, 3,2 мкг упаковочной плазмиды, содержащей пустой остов, pol HIV-1, gag HIV-1, HIV-1 Rev, HIV-1 Tat, промотор AmpR и промотор SV40 (psPAX2), и 5,2 мкг описанного выше лентивирусного вектора для переноса, содержащего кассету U6Tet-shRNA-EF1a-репрессор Tet-2A TagGFP-2A-гигромицин. Через 48 ч после трансфекции супернатанты вируса собирали и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

[00769] Конструирование линии гипоиммунных клеток. Целевой клеткой для подавления экспрессии CD47 является стволовая клетка (например, плюрипотентная стволовая клетка или индуцированная плюрипотентная стволовая клетка (иПСК)), которая была модифицирована для экспрессии толерогенного фактора CD47 (мыши или человека). иПСК человека подвергают двум стадиям генной модификации. На первой стадии

человеческие гены B2M и СРТА нокаутируют с помощью SpCas9 и направляющих РНК, нацеленных на эти два гена. Подробные описания клеток и методов генетического нокаутирования B2M и СРТА человека можно найти, например, в WO2016183041, поданной 9 мая 2015 г., и WO2018132783, поданной 14 января 2018 г., описания, включая перечни последовательностей и графические материалы, полностью включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых случаях сверхэкспрессия CD47 мыши или человека достигается трансдукцией лентивирусом, стабильной интеграцией промотора короткой формы эукариотического фактора элонгации 1 α (EFS), гена CD47 и пуромицина при MOI 20.

[00770] Трансдукция линий клеток с помощью кшРНК и обработки доксициклином: 5×10^5 иПСК, описанные выше, помещают в 6-луночный планшет и трансдуцируют на следующий день путем центрифугирования с 2 мл среды, содержащей супернатант вируса и 10 мкг/мл сульфата протамина, в течение 30 мин при 800 об/мин. На следующий день среда меняется. Через 48 часов клетки пассивируют и обрабатывают 1 мкг/мл доксициклина. Среда, содержащую доксициклин, готовят и меняют через день. Через три дня эффективность трансдукции измеряют на основе экспрессии CD47 с помощью проточной цитометрии.

[00771] Анализ экспрессии CD47 методом проточной цитометрии. После инкубации клетки промывают и окрашивают антителом к CD47, конъюгированным с Alexa-647 (Biolegend), для обнаружения поверхностной экспрессии CD47. Более конкретно, собирают 1×10^6 клеток и ресуспендируют в 100 мкл буфера для окрашивания клеток (PBS, 0,1% BSA, 0,1% азида натрия) и инкубируют с 5 мкл меченого Alexa-Fluor 647 антитела к CD47 в течение 30 минут на льду. Клетки промывают в буфере для окрашивания клеток и затем анализируют с помощью проточной цитометрии.

[00772] На Фиг. 1 представлены данные для клеточной линии HEK293, сконструированной для экспрессии мышиного CD47, демонстрирующие 98%-ную эффективность нокаута кшРНК №5.

В. Пример 2. Деграция CD47 в ответ на добавление малых молекул

[00773] В этом примере описывается создание и оценка саморасщепляющегося дегрона SMASH, слитого с CD47, и индуцибельного домена индуцируемой лигандом деграции (LID), слитого с CD47 для направленной деграции CD47.

1. Деграция CD47 с использованием дегрона SMASH

[00774] В системе SMASH деграция индуцируется низкомолекулярным индуктором асунапревиром. В данном документе описан способ опосредованной HDR доставки CD47, модифицированного для включения метки SMASH и линкера в локус AAVS1 гипои́ммуногенных индуцированных плюрипотентных (hiP) клеток. Также описана конструкция конструкции метки SMASH и иллюстративный способ обработки малыми молекулами для индукции деграции CD47.

[00775] Отключение с помощью малых молекул, или SMASH, представляет собой систему, в которой используется протеаза неструктурного белка 3 (NS3) вируса гепатита

С (HCV) и элементы белка NS4A для эффективного отключения экспрессии белка CD47, слитого с меткой SMASH, с клинически протестированными ингибиторами протеазы HCV (Фиг. 2). В отсутствие ингибитора протеазы (асунапревир) вырезается скрытая последовательность дегрона, что приводит к немодифицированному генному продукту. При добавлении асунапревира протеаза NS3 ингибируется, что приводит к деградации вновь синтезированных белков CD47, слитых с последовательностью дегрона.

[00776] Конструкция дегрона. Для получения донорной матрицы для гомологичной репарации (HDR) в качестве остова используется плаزمид pSF. Кассета, содержащая основной промотор EF1a (EFS) и SMASH, слитый с геном CD47 человека, вставляется между двумя плечами гомологии по 1000 п.н. с локусом «безопасная гавань» генома AAVS1 (Фиг. 3А), далее именуемым донорной матрицей AAVS1-EFS-SMASH-CD47-AAVS1. EFS представляет собой конститутивный промотор, обеспечивающий сильную экспрессию конструкции SMASH-CD47. Конструкция метки SMASH (см., например, Chung et al., Nat. Chem Bio, 2015, 11:713-720) такова, что кассета протеазы NS3-NS4A слита со скрытым дегроном на N-конце CD47 и может удалить себя путем расщепления последовательности, распознаваемой протеазой.

[00777] Конструирование двойного нокаута: целевой клеткой для подавления экспрессии CD47 является стволовая клетка (например, плюрипотентная стволовая клетка или индуцированная плюрипотентная стволовая клетка), которая была модифицирована, чтобы не экспрессировать молекулы МНС класса I и II. иПСК человека подвергают двум стадиям генной модификации. На первой стадии человеческие гены B2M и CPTA нокаутируют с помощью SpCas9 и направляющих РНК, нацеленных на эти два гена. Подробные описания клеток и методов двойного нокаутирования B2M и CPTA человека можно найти, например, в WO2016183041, поданной 9 мая 2015 г., и WO2018132783, поданной 14 января 2018 г., описания которых, включая перечни последовательностей и графические материалы, полностью включены в данный документ посредством ссылки. Клетки с двойным нокаутом B2M и CPTA культивируют в соответствии со стандартными методами, признанными специалистами в данной области техники.

[00778] Нуклеофекция иПСК человека с двойным нокаутом рибонуклеопротеинами: после нокаута B2M и CPTA сверхэкспрессия CD47 достигается путем нокаута кассеты CLYBL-CAG SMASH-CD47-CLYBL в геномном локусе «безопасная гавань» CLYBL или в другом хорошо известном геномном локусе «безопасная гавань», таком как AAVS1 или CCR5 (Фиг. 3В). Плазмиду CLYBL-CAG-SMASH-CD47-CLYBL сначала линейризуют расщеплением рестрикционными ферментами с помощью BstBI. Смесь рибонуклеопротеинов (RNP) готовят следующим образом: 25 пмоль рибонуклеопротеина SpCas9 (RNP) с 75 пмоль направляющей РНК и 1-2 мкг линейризованной донорной плазмиды до конечного объема 5 мкл. Затем 1×10^6 иПСК диссоциируют с аккутазой и ресуспендируют в 20 мкл раствора для нуклеофекции РЗ (Lonza) и смеси RNP. Клетки подвергают нуклеофекции (нуклеофектор Lonza Amaxa) с использованием программ DN-100 или CA-137, извлекают в StemFlex+CloneR и высевают

на 24-луночный планшет, покрытый витронектином. Через 10 дней массово отредактированную популяцию сортируют (принтер для отдельных клеток BD FACS Aria или Nana) антителом к CD47, конъюгированным с Alexa-647, PE или FITC, по высокой экспрессии CD47.

[00779] Лечение асунапревиром и подавление CD47: Отсортированные клетки обрабатывают примерно 1-3 мкМ асунапревира. Среду, содержащую асунапревир, готовят и меняют примерно через день. Через один день и затем через три дня, в некоторых вариантах осуществления, на основе экспрессии CD47 с помощью проточной цитометрии измеряют эффективность трансдукции.

[00780] Анализ экспрессии CD47: После инкубации клетки промывают и окрашивают антителом к CD47, конъюгированным с Alexa-647 (Biolegend), для обнаружения поверхностной экспрессии CD47. Более конкретно, собирают 1×10^6 клеток и ресуспендируют в 100 мкл буфера для окрашивания клеток (PBS, 0,1% BSA, 0,1% азида натрия) и инкубируют с 5 мкл меченого Alexa-Fluor 647 антитела к CD47 в течение 30 минут на льду. Клетки промывают в буфере для окрашивания клеток и затем анализируют с помощью проточной цитометрии.

2. Оценка деградации CD47 с использованием SMASH

[00781] Для оценки способности системы SMASH стимулировать деградацию CD47 были созданы экспрессионные конструкции, содержащие следующие кассеты экспрессии: а) основной промотор EF1a (EFS), функционально связанный с геном CD47 человека, слитым с нуклеиновой кислотой, кодирующей метку SMASH (EFS-CD47-SMASH, см. Фиг. 4 вверху); и б) контроль, содержащий промотор EFS, функционально связанный только с геном CD47 человека (EFS-CD47). иПСК трансдуцировали либо экспрессионной кассетой EFS-SMASH-CD47, либо контрольной экспрессионной кассетой EFS-CD47 с помощью лентивирусной трансдукции. Клетки, трансдуцированные EFS-SMASH-CD47, клетки, трансдуцированные EFS-CD47, и контрольные клетки дикого типа инкубировали в присутствии 0-10 мкМ асунапревира в течение 48 часов, а экспрессию CD47 оценивали с помощью проточной цитометрии, как описано выше. Как показано на Фиг. 4 (внизу), клетки, трансдуцированные EFS-SMASH-CD47, демонстрировали по меньшей мере 50% снижение экспрессии CD47 при увеличении дозы асунапревира. Экспрессия CD47 в клетках EFS-CD47 («только CD47»), которые не включали SMASH, в целом не менялась при увеличении дозы асунапревира. В клетках EFS-CD47 не наблюдали значительного нокдауна CD47, что указывает на отсутствие нецелевых эффектов асунапревира на экспрессию CD47. Точно так же экспрессия CD47 в клетках дикого типа («ДТ») оставалась на исходном (например, фоновом) уровне.

3. Деградация CD47 с использованием индуцируемой лигандом деградации (LID)

[00782] В системе LID представляющий интерес белок (POI, например, CD47) сливают с доменом дегрона LID (также называемым «домен LID» или «дегрон LID»). Дегронный домен LID включает белок, связывающий FK506 и рапамицин (FKBP), и пептид дегрон (например, TRGVEEVAEGVLLRRRGN), слитый с С-концом FKBP (Фиг.

5). FKBP представляет собой фермент, обладающий цис/транс-пролизомеразной активностью и способный воздействовать на широкий спектр полипептидов-субстратов. Пептид дегрон способен связываться с активным центром FKBP и не обнаруживается белками клеточной деградации, когда он секвестрирован в активном сайте, что делает его скрытым дегроном. В отсутствие малой молекулы Shield-1 слитый белок POI-LID стабилен. При наличии Shield-1 прочно связывается с FKBP, тем самым замещая пептид дегрон и вызывая быструю деградацию LID и любого слитого белка-партнера (например, CD47).

[00783] Для оценки способности системы LID стимулировать деградацию CD47, были созданы экспрессионные конструкции, содержащие следующие экспрессионные кассеты: а) основной промотор EF1a (EFS), функционально связанный с геном CD47 человека, слитым с нуклеиновой кислотой, кодирующей домен дегрон LID (EFS-CD47-LID, см. Фиг. 6 вверху); и б) контроль, содержащий промотор EFS, функционально связанный только с геном CD47 человека (EFS-CD47). иПСК трансдуцировали либо экспрессионной кассетой EFS-CD47-LID, либо контрольной экспрессионной кассетой EFS-CD47 с помощью лентивирусной трансдукции.

[00784] Клетки, трансдуцированные EFS-CD47-LID, клетки, трансдуцированные EFS-CD47, и контрольные клетки дикого типа инкубировали в присутствии 0-1000 нМ Shield-1 в течение 24 часов, и экспрессию CD47 оценивали с помощью проточной цитометрии. Как показано на Фиг. 6 (внизу), клетки, трансдуцированные EFS-CD47-LID, демонстрировали по меньшей мере 50% снижение экспрессии CD47 при увеличении доз Shield-1. Экспрессия CD47 в клетках EFS-CD47 («только CD47»), которые не включали LID, в целом не изменялась при увеличении доз Smash-1. В клетках EFS-CD47 не наблюдалось значительного нокдауна CD47, что указывает на отсутствие нецелевых эффектов Shield-1 на экспрессию CD47. Точно так же экспрессия CD47 в клетках дикого типа («ДТ») оставалась на исходном (например, фоновом) уровне.

С. Пример 3: Демаскировка гипоиммунных клеток с помощью генетической, посттранскрипционной и посттрансляционной регуляции

[00785] Гипоиммунность достигается за счет сверхэкспрессии гипоиммунных молекул, таких как CD47, ингибиторов комплемента, сопровождающихся репрессией или генетическим нарушением локусов HLA-I и HLA-II. Эти модификации маскируют клетку от эффекторных клеток иммунной системы, которые отвечают за клиренс инфицированных, злокачественных или чужеродных клеток, таких как Т-клетки, В-клетки, NK-клетки и макрофаги. Маскировка клетки от иммунной системы позволяет существовать и сохраняться аллогенным клеткам в организме. Удаление сконструированных клеток из организма имеет решающее значение для безопасности пациента и может быть достигнуто путем демаскировки клеток для иммунной системы. Демаскировка служит защитным переключателем и может быть достигнута путем снижения экспрессии гипоиммунных молекул или повышения экспрессии иммунных сигнальных молекул (Фиг. 7). Любое из этих действий будет способствовать

превращению клетки в нативную эффекторную клетку, что приведет к клиренсу аллогенной клетки.

[00786] На Фиг. 8А-Фиг. 8D проиллюстрированы методы демаскировки гипои́ммунных клеток с помощью генетической, посттранскрипционной и посттрансляционной регуляции. В некоторых вариантах осуществления иммунная система может использовать гипои́ммунные клетки и уничтожать их посредством добавления антитела, которое связывает эпитоп на внеклеточной поверхности клетки (Фиг. 8А). Эпитоп может быть нативным для сверхэкспрессированной гипои́ммунной молекулы или может быть другим эпитопом, расположенным внутри гипои́ммунной молекулы или отчетливо расположенным на внеклеточной поверхности. Связывание антитела с поверхностью демаскирует клетку и приводит к антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ). Слияние индуцируемых дегроновых мотивов с гипои́ммунными молекулами делает возможным экзогенный контроль над стабильностью молекулы посредством добавления или удаления малых молекул, которые стабилизируют или дестабилизируют дегрон и, таким образом, гипои́ммунную молекулу (Фиг. 8В). Нацеливание на гипои́ммунные молекулы с помощью кшРНК или миРНК приводит к деградации транскрипта, кодирующего белок. кшРНК может быть экзогенно предоставлена или генетически закодирована для обеспечения контроля над транскрипцией ингибирующей РНК. кшРНК или миРНК отжигаются с транскриптом гипои́ммунной молекулы, что приводит к деградации комплексом RISC (Фиг. 8С). Транскрипционная регуляция гипои́ммунных молекул с помощью индуцируемых промоторов обеспечивает возможность включать или выключать экспрессию переключателя по желанию посредством добавления или удаления малых молекул, таких как доксициклин (Фиг. 8D). Генетическое нарушение с помощью направленной нуклеазной активности устрани́т экспрессию гипои́ммунной молекулы, чтобы также демаскировать клетки.

[00787] Сочетание экспрессии защитного переключателя с гипои́ммунной молекулой обеспечивает надежность в отношении обеспечения экспрессии защитного переключателя. Сайленсинг кассеты, кодирующей гипои́ммунную молекулу, приведет к элиминации клетки иммунной системой. Кроме того, кассета, содержащая гипои́ммунную молекулу и защитный переключатель, может быть интегрирована в эндогенный основной локус для защиты экспрессии кассеты, поскольку сайленсинг основного гена устрани́т сконструированные клетки (Фиг. 9). В некоторых случаях индуцируемое снижение экспрессии CD47 в гипои́ммунных клетках действует как защитный переключатель, тем самым позволяя иммунной системе удалить гипои́ммунные клетки

[00788] Чтобы проиллюстрировать направленную деградацию гипои́ммунной молекулы с использованием индуцируемой кшРНК, клетки НЕК293, сверхэкспрессирующие мышинный CD47, трансдуцировали 9 кандидатами кшРНК, что соответственно приводило к интеграции гетерологичных ДНК, кодирующих индуцируемый доксициклином промотор U6, контролирующей экспрессию кшРНК. В

исследовании НЕК293 ДТ служил отрицательным контролем экспрессии мышинового CD47. Индуцируемую кшРНК вводили в клетки посредством лентивирусной трансдукции. Клетки трансдуцировали при MOI 1,8 с помощью 9 различных конструкций кшРНК, нацеленных на транскрипт 1 мышинового CD47. Кроме того, использовали ненацеливающий контроль. Добавление доксициклина в дозе 1 мкг/мл в течение 72 часов приводило к снижению экспрессии белка CD47, что измерено при помощи анализа методом проточной цитометрии после инкубации клеток с антителом к CD47, конъюгированным с AlexaFluor 647). Данные демонстрируют, что 8 из 9 индуцируемых кшРНК подавляли экспрессию мышинового CD47. Исследуемый препарат кшРНК № 5 обеспечивала полный нокдаун экспрессии CD47, а исследуемые препараты кшРНК № 2, 3, 4, 7, 8 и 9 обеспечивала частичный нокдаун (см. Фиг. 1).

[00789] Вирус, имеющий наиболее эффективную кшРНК (№ 5 на Фиг. 10), использовали для трансдукции при различных MOI с последующей индукцией экспрессии кшРНК. Впоследствии был проведен анализ уровней CD47 с помощью проточной цитометрии, как описано на Фиг. 10. Данные демонстрируют, что MOI выше 0,3 обеспечивает эффективный нокдаун CD47 (Фиг. 10, внизу). Было отмечено, что индуцируемая конструкция кшРНК так же эффективна в снижении экспрессии CD47, как и конститутивно экспрессируемая версия кшРНК.

[00790] В этом примере описаны способы получения гипоиммунных клеток с контролируемой или индуцируемой экспрессией гипоиммунного фактора. Такие клетки обладают защитным переключателем, который позволяет контролировать снижение экспрессии или деградацию гипоиммунного фактора, и, таким образом, клетки могут быть удалены иммунной системой субъекта

D. Пример 4. Совместная экспрессия CD47 с защитным переключателем

[00791] В этом примере описано связывание эпитопа с CD47, что позволяет иммунным клеткам или компонентам иммунной системы индуцировать антителозависимую и комплементзависимую цитотоксичность.

[00792] Экспрессия CD47 способствует маскировке аллогенных клеток от иммунной системы. Неклеточные компоненты иммунной системы, способные лизировать целевую клетку, представляют собой процессы, опосредованные комплементом, которые распознают клетки с антителами, связанными с их поверхностью. Экспрессия эпитопа на внеклеточной поверхности плазматической мембраны помогает эпитопу связываться с антителом и может использоваться в контексте слияния эпитопа с другими белками клеточной поверхности, такими как CD47. Моноклональные антитела с известными эпитопами, такими как фрагмент CPYSNPSLCS CD20, который связывает ритуксимаб, могут быть слиты с N-концом CD47 или внутри домена IgV, расположенного между остатками 19-127 или непосредственно после остатка 127. Эпитоп может быть окружен гибкими линкерами, такими как линкеры GS (например, GGGS или GGGSGGGS), для поддержания структурной целостности CD47. Размещение эпитопа непосредственно после остатка 127 внутри CD47 приводит к образованию слитого белка, в результате чего

эпитоп примыкает к плазматической мембране и между глобулярным доменом IgV.

[00793] В еще одном варианте осуществления CD47 и эпитоп экспрессируются в виде бицистронного транскрипта, разделенного 2A или внутренним сайтом связывания рибосомы (IRES). В бицистронной конструкции CD47 представляет собой отдельную молекулу, а также эпитоп, который слит с трансмембранным доменом и сигнальной последовательностью, которая локализует эпитоп на внеклеточной поверхности плазматической мембраны и одновременно закрепляется в мембране через трансмембранный домен.

[00794] Кассета CD47-эпитоп интегрируется в геном клетки посредством лентивирусной трансдукции или опосредованной CRISPR гомологичной репарации в представляющем интерес локусе. Выделение клеток, имеющих интеграцию, осуществляют путем инкубации клеток с антителом к эпитопу или CD47 с последующей сортировкой клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Элиминация клеток с помощью аварийного переключателя происходит путем добавления моноклонального антитела, которое связывает эпитоп, например, связывания ритуксимаба с CD20, с последующим цитолизом, опосредованным АЗКЦ или КЗЦ.

[00795] Слияние эпитопов CD47-CD20 и дизайн бицистронной конструкции: ДНК производится контрактной исследовательской организацией с целью создания конструкций, содержащих несколько компонентов: промотор EFS, эпитоп CD20, содержащий аминокислотную последовательность CPYSNPLSLCS, окруженную 5'-линкером GGGS и 3'-GGGSGGGS. линкер (далее именуемый N-концевым мимотопом CD20), человеческий CD47 и P2A для бицистронной кассеты.

[00796] Слитые конструкции: Кассета слитого белка клонирована в лентивирусный остов pSF и содержит промотор EFS, за которым следует OPC мимотопа CD20, непосредственно слитая с OPC CD47 человека. Другая кассета слитого белка содержит промотор EFS, за которым следует человеческий CD47 с аминокислотами 1-127, за которым следует мимотоп CD20, за которым следует расположенная ниже OPC CD47, которая клонирована в остове pSF для лентивирусной опосредованной геномной интеграции. Другими словами, слитая кассета, клонированная в остове pSF, содержит от 5'-конца к 3'-концу: промотор EFS, человеческий CD47, аминокислоты 1-127, описанный в данном документе мимотоп CD20 и OPC CD47.

[00797] Бицистронные конструкции: Для бицистронных кассет, содержащих CD47 и мимотоп CD20, генерируют два отдельных пептида с использованием последовательности 2A или IRES. Мимотоп CD20 слит с последовательностью трансмембранного домена и сигнальной последовательностью, обеспечивающей его локализацию на внеклеточной поверхности плазматической мембраны. CD47 представляет собой человеческий кодон-оптимизированный CD47. Все кассеты клонированы в основу pSF для интеграции, опосредованной лентивирусами.

[00798] ДНК-конструкции домена гомологичной репарации: Для CRISPR-опосредованной гомологичной репарации (HDR) выше и ниже кассеты фланкированы

плечами гомологии длиной 1000 пар оснований, которые комплементарны области, фланкирующей целевую последовательность онРНК для эффекторной нуклеазы Cas. Для нацеливания на B2M, плечи гомологии длиной 1000 п.о. фланкируют направляющую РНК, нацеленную на экзон 2.

[00799] Методы интеграции генома: Лентивирусная упаковка конструкций: клетки HEK293LX трансфицировали плазмидами на основе рSF, содержащими комбинации защитный переключатель-CD47, а также упаковочные плазмиды для упаковки лентивируса. Вкратце, 160000 клеток HEK293LX высевает на лунку в 24-луночные планшеты в 0,5 мл среды DMEM (ThermoFisher №1056044), содержащей 10% FBS (Gibco №26140079). Через 22 часа после посева трансфекционный материал, содержащий 100 нг оболочечной плазмиды VSVG, 150 нг упаковочной плазмиды и 250 нг плазмиды для переноса, смешивают с 50 мкл Optimem (ThermoFisher №11058021) с последующим добавлением 1,5 мкл TransIT (Mims Bio № MIR2300). Смеси для трансфекции инкубируют в течение 15 минут, а затем добавляют по каплям в каждую лунку. Через 24 часа после трансфекции среду меняют. Через 48 часов после трансфекции среду переносят в подходящую для центрифуги пробирку и центрифугируют при 300 RCF в течение 4 минут для осаждения клеточного дебриса. После центрифугирования необработанный лентивирусный супернатант переносят в новую пробирку, которую затем концентрируют путем ультрацентрифугирования с использованием градиента сахарозы с последующим ресуспендированием лентивирусного осадка в PBS.

[00800] Для трансдукции и выделения клеток, несущих геномные интеграции, 125000 клеток иПС высевает на чашки, покрытые витронектином, за 24 часа до трансдукции. Непосредственно перед трансдукцией среду аспирируют и добавляют 450 мкл среды, а затем 50 мкл концентрированного лентивируса. Клетки инкубируют с лентивирусом в течение 36 часов перед заменой среды. Через 72 часа после трансдукции клетки диссоциируют и подвергают инкубации с антителом к CD47, конъюгированным с Alexa-647, с последующей сортировкой FACS для выявления клеток Alexa-647.

[00801] Для интеграции кассеты защитный переключатель-CD47 в B2M посредством CRISPR-опосредованной гомологичной репарации плазмиду, содержащую плечи гомологии B2M, линейаризуют путем расщепления рестрикционными ферментами с помощью BstBI. Затем готовят смесь рибонуклеопротеинов (RNP) следующим образом: 25 пмоль рибонуклеопротеина SpCas9 (RNP) с 75 пмоль направляющей РНК и 1-2 мкг линейаризованной донорной плазмиды до конечного объема 5 мкл. Затем 1×10^6 иПСК диссоциируют с помощью аккутазы и ресуспендируют в 20 мкл раствора для нуклеофекции P3 (Lonza) и смеси RNP. Клетки подвергают нуклеофекции (нуклеофектор Lonza Amaha) с использованием программ DN-100 или CA-137, извлекают в StemFlex+CloneR и высевает на 24-луночный планшет, покрытый витронектином. Через 10 дней массово отредактированную популяцию сортируют (принтер для отдельных клеток BD FACS Aria или Hana) по высокой экспрессии CD47 с антителом к CD47, конъюгированным с Alexa-647, PE или FITC.

[00802] Обработка CD20-CD47 клеток ритуксимабом и комплементом для индуцирования цитолиза: Чтобы вызвать зависимую от комплемента гибель клеток, имеющих CD20-CD47, 200000 клеток высевали в лунку 12-луночного планшета с последующим добавлением 50 мкг/мл ритуксимаба (R&D Systems, № MAB9575). Клетки инкубируют с антителом при 37°C в течение 1 часа с последующим добавлением сыворотки человека (Millipore Sigma, № H4522), разведенной 1:4 в PBS, которую добавляют в соотношении 1:1 к культурам целевых клеток для получения конечного объема 100 мкл. Каждые 15 минут в течение 120 минут образцы собирают для анализа гибели клеток посредством диссоциации, осаждения и ресуспендирования в красителе для оценки жизнеспособности клеток Draq7 (AbCam, № ab109202) методом проточной цитометрии.

Е. Пример 5. Совместная экспрессия CD47 с защитным переключателем - CD47-переключатель HSVtk

[00803] В этом примере описана бицистронная кассета CD47-HSVtk, которая связывает CD47 с защитным выключателем, который функционирует независимо от иммунной системы

[00804] CD47 может быть связан с защитным переключателем, который вызывает гибель клеток независимым от иммунной системы образом, таким как HSVtk, iCaspase9 или цитозиндеаминаза. Эти защитные переключатели могут быть расположены выше или ниже от CD47, расположенного между последовательностью 2A или IRES, чтобы обеспечить разделение двух белков после трансляции. HSVtk опосредует гибель клеток за счет превращения ганцикловира в токсичный нуклеозид, который включается во время репликации ДНК, в результате чего накопление вызывает токсическое повреждение ДНК.

[00805] Дизайн бицистронной конструкции HSVtk-CD47: OPC HSVtk и CD47 человека разделяют последовательностью 2A или IRES для создания конструкции бицистронного гена. В частности, промотор EFS помещают выше HSVtk, за которым следует P2A, за которым следует CD47, за которым следует последовательность полиаденилирования для создания конструкции. Таким образом, бицистронная конструкция содержит с 5'-конца к 3'-концу: промотор EFS, HSVtk, последовательность 2A или IRES, человеческий CD47 или его фрагмент или вариант и последовательность полиаденилирования. Кассеты, в которых отсутствует последовательность полиаденилирования, упаковываются в остов pSF для интеграции, опосредованной лентивирусами.

[00806] Для обеспечения гомологичной репарации, опосредованной Cas9, кассеты, содержащие последовательность полиаденилирования, фланкируют плечами гомологии для целевого гена. Для нацеливания на B2M используются плечи гомологии длиной 1000 п.н., фланкирующие направляющую РНК, нацеленную на экзон 2 гена B2M.

[00807] Способы интеграции генома: Лентивирусная упаковка конструкций: Клетки HEK293LX трансфицировали плазмидами на основе pSF, содержащими комбинации защитный переключатель-CD47, а также упаковочные плазмиды для

упаковки лентивируса. Вкратце, 160000 клеток HEK293LX высевали на лунку в 24-луночные планшеты в 0,5 мл DMEM (ThermoFisher №1056044), содержащей 10% FBS (Gibco №26140079). Через 22 часа после посева трансфекционный материал, содержащий 100 нг оболочечной плазмиды VSVG, 150 нг упаковочной плазмиды и 250 нг плазмиды для переноса, смешивают с 50 мкл Optimem (ThermoFisher №11058021) с последующим добавлением 1,5 мкл TransIT (Mims Bio № MIR2300). Смеси для трансфекции инкубируют в течение 15 минут, а затем добавляют по каплям в каждую лунку. Через 24 часа после трансфекции среду меняют. Через 48 часов после трансфекции среду переносят в подходящую для центрифуги пробирку и центрифугируют при 300 RCF в течение 4 минут для осаждения клеточного дебриса. После центрифугирования необработанный лентивирусный супернатант переносят в новую пробирку, которую затем концентрируют путем ультрацентрифугирования с использованием градиента сахарозы с последующим ресуспендированием лентивирусного осадка в PBS.

[00808] Для трансдукции и выделения клеток, несущих геномные интеграции, 125000 клеток иПС высевают на чашки, покрытые витронектином, за 24 часа до трансдукции. Непосредственно перед трансдукцией среду аспирируют и добавляют 450 мкл среды, а затем 50 мкл концентрированного лентивируса. Клетки инкубируют с лентивирусом в течение 36 часов перед заменой среды. Через 72 часа после трансдукции клетки диссоциируют и подвергают инкубации с антителом к CD47, конъюгированным с Alexa-647, с последующей сортировкой FACS для выявления клеток Alexa-647.

[00809] Для интеграции кассеты защитный переключатель-CD47 в B2M посредством CRISPR-опосредованной гомологичной репарации плазмиду, содержащую плечи гомологии B2M, линеаризуют путем расщепления рестрикционными ферментами с помощью BstBI. Затем готовят смесь рибонуклеопротеинов (RNP) следующим образом: 25 пмоль рибонуклеопротеина SpCas9 (RNP) с 75 пмоль направляющей РНК и 1-2 мкг линеаризованной донорной плазмиды до конечного объема 5 мкл. Затем 1×10^6 иПСК диссоциируют с помощью аккутазы и ресуспендируют в 20 мкл раствора для нуклеофекции P3 (Lonza) и смеси RNP. Клетки подвергают нуклеофекции (нуклеофектор Lonza Amaxa) с использованием программ DN-100 или CA-137, извлекают в StemFlex+CloneR и высевают на 24-луночный планшет, покрытый витронектином. Через 10 дней массово отредактированную популяцию сортируют (принтер для отдельных клеток BD FACS Aria или Hana) по высокой экспрессии CD47 с антителом к CD47, конъюгированным с Alexa-647, FITC или PE.

[00810] Обработка HSVtk-CD47 клеток ганцикловиром для индуцирования гибели клеток: Для индукции гибели клеток, содержащих HSVtk-CD47, к культурам клеткам добавляют ганцикловир (G2536) в концентрации 1 мкМ. Гибель клеток анализируют каждые 24 часа для анализа гибели клеток посредством диссоциации, осаждения и ресуспендирования в красителе для оценки жизнеспособности клеток Draq7 (AbCam, № ab109202) методом проточной цитометрии.

[00811] Все заголовки и обозначения разделов используются только для ясности и

справочных целей и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие. Например, специалисты в данной области техники оценят полезность объединения различных аспектов из разных заголовков и разделов в соответствии с сущностью и объемом изобретения, описанного в данном документе.

Е. Пример 6. Совместная экспрессия CD47 с защитным переключателем цитозиндезаминазой

[00812] Для оценки способности цитозиндезаминазы вызывать гибель клеток в зависимости от иммунной системы, бицистронную кассету EFS-цитозиндезаминаза (CD)-CD47 трансдуцировали в иПСК дикого типа с помощью лентивирусной вирусной трансдукции (см. Фиг. 16, сверху). В этой кассете нуклеиновая кислота, кодирующая CD, расположена перед нуклеиновой кислотой, кодирующей CD47. Последовательность 2A, расположенная между нуклеиновыми кислотами CD и CD47, обеспечивает разделение двух белков после трансляции. Промотор EFS контролирует экспрессию CD и CD47.

[00813] Клетки, трансдуцированные EFS-CD-CD47, и контрольные клетки, трансдуцированные EFS-CD, приводили в контакт 5-фторцитозина (5-FC) («5FC») в концентрациях 0,01-1000 мкМ. Цитозиндезаминаза дезаминирует 5-FC до токсичного 5-фторурацила (5-FU), тем самым убивая клетки. Как показано на Фиг. 16 (в центре), уничтожение клеток, трансдуцированных EFS-CD-CD47, экспрессирующих CD47, наблюдалось при увеличении концентрации 5-FC. Анализ методом проточной цитометрии продемонстрировал, что клетки, трансдуцированные EFS-CD-CD47, экспрессировали CD47 (Фиг. 16, внизу). Такая совместная экспрессия CD с CD47 существенно не влияла на функциональность CD по сравнению с контрольными клетками.

Таблица 2. Последовательности саморасщепляющихся пептидов

Название саморасщепляющегося пептида	Последовательность	SEQ ID NO
Последовательность саморасщепляющегося пептида T2A	(GSG)EGRGSLLTCDGVEENPGP	4
Последовательность саморасщепляющегося пептида P2A	(GSG)ATNFSLLKQAGDVEENPGP	5
Последовательность саморасщепляющегося пептида E2A	(GSG)QCTNY ALLKLAGDVESNPGP	6
Последовательность саморасщепляющегося пептида F2A	(GSG)VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	7

Таблица 3. Полезные линкеры

Название линкера	Линкерная последовательность	SEQ ID NO
-------------------------	-------------------------------------	------------------

RH 1	EAAAK	8
RH 2	EAAAKEAAAK	9
RH 3	EAAAKEAAAKEAAAK	10
RH 5	AEAAAKEAAAKEAAAKA	11
RH 6	AEAAAKAEAAAKAEAAAKAEAAAK	12
RH 7	AEAAAKAEAAAKAEAAAKAEAAAKAEAAAK	13
RH 8	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKE AA AKA	14
REPR 15	PAPAP	15
REPR 2	APAPAPAPAP	16
REPR 5	APAPAPAPAPAPAPAP	17
REPR 8	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP	18
REPR 11	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP	19
REPR 14	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP	20
FGSR 15	KESGSVSSEQLAQFRSLD	21
FGSR 16	EGKSSSGSGSESKST	22
FGSR 18	NSGAGGSGGSSGSDGASGSRD	23
FGSR 1	GGGGS	24
FGSR10	GGGS	25
FGSR 14	GS	26
FGSR 17	GSAGSAAGSGEF	27
FGSR 2	GGGGSGGGGS	28
FGSR 3	GGGGSGGGGS	29
FGSR 4	GGGGSGGGGS	30
FGSR 5	GGS	31
FGSR 6	GGGGGG	32

FGSR 7	GGGGGGGG	33
AP 5	SSSSG	34
AP 6	SSSSGSSSSG	35
AP 7	SSSSGSSSSGSSSSG	36
AP 8	SSSSGSSSSGSSSSGSSSSG	37
AP 9	SSSSGSSSSGSSSSGSSSSGSSSSG	38
AP 18	ALNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA SR PAAGGAVHTRGLD	39
NP 35	TVAAP	40
NP 36	ASTKGP	41
NP 37	QPKAAPSVTLFPP	42
NP 38	TVAAPSVFIFPP	43
NP 39	ASTKGPSVFPLAP	44
NP 1	AQGTLSPADKTNVKAAGWKVMT	45
NP 21	PGNPTTTVVPPASTSTSRPTSSTSSPVSTPTGQPGG	46
IEiIA	GGKFDDNSYKVSGLHGVG	47
IKQFA	GRLFAINKMAEGPFPEHYEPIETPLGTNPLHPNVVSNPVRVLYE	48
1B8TA	YGPKGKGKGMGAGTLSTDKGESLGIKYEEGQSHRPTNPNASRM A QKVGGSD	49
JP1	GKGKG	50
JP2	GKGKGMGAG	51
JP3	GKGKGMGAGTLSTDKG	52
JP4	GKGKGMGAGTLSTDKGESLG	53
2ZT5A	KPLKEPKTVNVVQFEPSKGAIGKAYKKDAKLVMELYLAICDECYI TE MEMLLNEKGFTIETEGKTFQLTKDMINVKRFQKTLYVE	54
LP1	IEGRMD	55
pVT19 7	GGGSGGGGSGGGGSAAQPA	56
pVT31 1	GGGSGGGGSGGGGSAAQPAS	57
LP1	GGGSLVPRGSGGGGS	58
LP2	GGGSLVPRGSGGGG	59
LP3	GGSGGHMGSGG	60
LP4	GGSGGSGGSGG	61

LP5	GGSGG	62
LP6	GGSGGGGG	63
LP7	GGGSEGGGSEGGGSEGGG	64
LP8	GSGGGTGGGSG	65
LP9	GT	66
LP10	GSGSGS	67
LP11	GSGSGSGS	68
LP12	GSGSGSGSGS	69
LP13	GSGSGSGSGSGS	70
LP14	GSGSGSGSGSGSGS	71
LP15	GSGSGSGSGSGSGSGS	72
LP16	SGSGSGSSHs	73
LP17	AAGAATAA	74
LP18	EPKSADKTHtAPP AP	75
JP5	EPKS _s DKTHt _s PP _s P	76
JP6	EPKSCDKTHtCPPCP	77
JP7	EPKSCDKTHtCPPCPAPELLGGP	78
JP8	EPKS _s DKTHt _s PP _s PAPELLGGP	79
JP9	EPKSCDKTHtCPPCPAPEaaGGP	80
JP10	EPKS _s DKTHt _s PP _s PAPEaaGGP	81
JP11	ERK _{ss} VE _s PP _s P	82
JP12	ERKCCVECPCP	83
JP13	ERKCCVECPCP APPVAGP	84
JP14	ERK _{ss} VE _s PP _s P APPVAGP	85
JP15	ELKTPLGDTTHtCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRC PE PKSCDTPPPCP	86
JP16	ELKTPLGDTTHt _s PR _s PEPKS _s DTPPP _s PR _s PEPKS _s DTPPP _s PR _s PEP KS _s DTPPP _s P	87
NP 8	ELKTPLGDTTHt	88
JP17	ESKYGPP _s PS _s P	89
JP18	ESKYGPPCPSCP	90
JP19	ESKYGPPCPSCP APEFLGGP	91

JP20	ESKYGPPsPSsP APEFLGGP	92
JP21	ESKYGPPCPSCP APEaaGGP	93
JP22	ESKYGPPsPSsP APEaaGGP	94
JP23	SGSETPGTSESATPEGGS GGS	95
JP24	SGSETPGTSESATPES	96
JP25	SGSETPGTSES	97

Таблица 4. Полезные конститутивные промоторы

Конститутивный промотор	Последовательность	SEQ ID NO
EF1A	GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCC CACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATT GAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTG GGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGA GGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCG TGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACAC AGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCT TTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCA CCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGG TTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAA GGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCT GGGCGCTGGGGCCGCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCT TCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCAT TTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTG GCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACA CTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGG GCCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGG CCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT CTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGTCTCGCGC CGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCC CGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCT TCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGC GGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACA AAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCAT GTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTC	98

	GATTAGTTC	
UBC	GGTGCAGCGGCCTCCGCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCG CGGGCGCCCCCTCCTCACGGCGAGCGCTGCCACGTCA GACGAAGGGCGCAGGAGCGTTCCTGATCCTTCCGCCCCG GACGCTCAGGACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGACTCGG CCTTAGAACCCCAAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGA CGGGACTTGGGTGACTCTAGGGCACTGGTTTTCTTTCCA GAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAAGTAGTCCCTTCTCGG CGATTCTGCGGAGGGATCTCCGTGGGGCGGTGAACGCC GATGATTATATAAGGACGCGCCGGGTGTGGCACAGCTA GTTCCGTCGCAGCCGGGATTTGGGTGCGGGTTCTTGTTT GTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGGTGAGTTGCGGGCTG CTGGGCTGGCCGGGGCTTTCGTGGCCGCCGGGGCCGCTC GGTGGGACGGAAGCGTGTGGAGAGACCGCCAAGGGCT GTAGTCTGGGTCCGCGAGCAAGGTTGCCCTGAACTGGG GGTTGGGGGGGAGCGCACAAAATGGCGGCTGTTCCCGAG TCTTGAATGGAAGACGCTTGTAAGGCGGGCTGTGAGGT CGTTGAAACAAGGTGGGGGGCATGGTGGGCGGCAAGA	99

	ACCCAAGGTCTTGAGGCCTTCGCTAATGCGGGAAAGCT CTTATTCGGGTGAGATGGGCTGGGGCACCATCTGGGGA CCCTGACGTGAAGTTTGTCACTGACTGGAGAACTCGGG TTTGTCTGCTGGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGCGGTGCC GTTGGGCAGTGCACCCGTACCTTTGGGAGCGCGCGCCT CGTCGTGTCGTGACGTCACCCGTTCTGTTGGCTTATAAT GCAGGGTGGGGCCACCTGCCGGTAGGTGTGCGGTAGGC TTTTCTCCGTCGCAGGACGCAGGGTTCGGGCCTAGGGT AGGCTCTCCTGAATCGACAGGCGCCGGACCTCTGGTGA GGGGAGGGATAAGTGAGGCGTCAGTTTCTTTGGTCGGT TTTATGTACCTATCTTCTTAAGTAGCTGAAGCTCCGGTT TTGAACTATGCGCTCGGGGTGGCGAGTGTGTTTTGTGA AGTTTTTTAGGCACCTTTTGAAATGTAATCATTTGGGTC AATATGTAATTTTCAGTGTTAGACTAGTAAA	
Pgk	TTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTC TGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACCTTGGC GCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACAT CCACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCC CCTTCGCGCCACCTTCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGT TCCCCCCCCGCCCCGCAGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGA CAAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGAT GGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTT GGGGCAGCGGCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCT GGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGGTCCGGGGGGCGG GCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGCCCGA AGGTCCTCCGGAGGCCCGGCATTCTGCACGCTTCAAAA GCGCACGTCTGCCGCGCTGTTCTCCTCTTCCTCATCTCC GGGCCTTTTCGACCT	100

CMV	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCA TAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGT AAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCC CATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTAT TTACGGTAAACTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTAT CATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGG TAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTT ATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT CATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACAT CAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTC CAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGT GGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAAC AACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGT ACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGA ACCGTCAGATC	101
CAGGS	ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT CATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACG GTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCG CCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGT ATTTACGGTAAACTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGT ATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGAC GGTAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGAC CTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT AGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTT CTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCC AATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCG ATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCG GGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCG GAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCC GAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGG CCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTC GCTGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGC	102

	CGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTT ACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTC CGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTT CTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGG AGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCG TGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTC CGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCG CGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGC GCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCT GCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTG GGGGGGTGAGCAGGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCT GCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCA CGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTG GCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCA GGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCC GGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGA GCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCAT TGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACT TCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGA GGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAG CGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGG GCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGTCCCCTTCTCCCTC TCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTT CGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCG TGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCA TGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCT GGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTC	
SV40	CTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCC AGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATC TCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGC TCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAA TTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCAT CCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCGCCCATTCTCCGCC CCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGA GGCCGCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAG	103

	GAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCT	
COPIA	ATCTGTTGGAATATACTATTCAACCTACAAAAATAACGT TAAACAACACTACTTTATATTTGATATGAATGGCCACAC CTTTTATGCCATAAAACATATTGTAAGAGAATACCACTC TTTTTATTCCTTCTTTCCTTCTTGTACGTTTTTTTGCTGTGA GTAGGTCGTGGTGCTGGTGTTGCAGTTGAAATAACTTA AAATATAAATCATAAAACTCAAACATAAACTTGACTAT TTATTTATTTATTAAGAAAGGAAATATAAATTATAAATT ACAACAGGTT	104
ACT5C	GGAAGTACACTCTTCATGGCGATATACAAGACACACAC AAGCACGAACACCCAGTTGCGGAGGAAATTCTCCGTAA ATGAAAACCCAATCGGCGAACAATTCATACCCATATAT GGTAAAAGTTTTGAACGCGACTTGAGAGCGGAGAGCAT TGCGGCTGATAAGGTTTTAGCGCTAAGCGGGCTTTATA AAACGGGCTGCGGGACCAGTTTTTCATATCACTACCGTTT GAGTTCTTGTGCTGTGTGGATACTCCTCCCGACACAAAG CCGCTCCATCAGCCAGCAGTCGTCTAATCCAGAGACAC C	105
TRE	GGTACCGAGCTCGACTTTCACTTTTCTCTATCACTGATA GGGAGTGGTAAACTCGACTTTCACTTTTCTCTATCACTG ATAGGGAGTGGTAAACTCGACTTTCACTTTTCTCTATCA CTGATAGGGAGTGGTAAACTCGACTTTCACTTTTCTCTA TCACTGATAGGGAGTGGTAAACTCGACTTTCACTTTTCT CTATCACTGATAGGGAGTGGTAAACTCGACTTTCACTTT TCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAAACTCGACTTTCAC TTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAAACTCGACCTA TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCT GGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGA CACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCCCGAATTG	106

справочных целей и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие. Например, специалисты в данной области техники оценят полезность объединения различных аспектов из разных заголовков и разделов в соответствии с сущностью и объемом технологии, описанной в данном документе.

[00815] Все ссылки, процитированные в данном документе, тем самым включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка была специально и индивидуально указаны для включения в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей.

[00816] Многие модификации и вариации данной заявки могут быть выполнены без отклонения от ее сущности и объема, как будет очевидно специалистам в данной области техники. Конкретные варианты осуществления и примеры, описанные в данном документе, предлагаются только в качестве примера, и приложение должно быть ограничено только условиями прилагаемой формулы изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, которые ею охвачены.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ контроля иммуногенности сконструированной клетки, включающий:

(a) получение выделенной клетки;

(b) введение в выделенную клетку (i) нуклеиновой кислоты, содержащей промотор индуцируемой РНК-полимеразы, функционально связанный с последовательностью кшРНК, нацеленной на иммуносупрессивный фактор, и (ii) нуклеиновой кислоты, содержащей промотор, функционально связанный с трансактивирующим элементом, соответствующим индуцируемому промотору РНК-полимеразы, для получения сконструированной клетки; и

(c) воздействие экзогенного фактора на сконструированную клетку для активации трансактивирующего элемента, тем самым контролируя иммуногенность сконструированной клетки.

2. Способ контроля иммуногенности сконструированной клетки, включающий:

(a) получение выделенной клетки;

(b) введение в выделенную клетку нуклеиновой кислоты, содержащей (i) последовательность, кодирующую индуцируемый элемент дегрон, функционально связанный с иммуносупрессивным фактором, или (ii) последовательность, кодирующую иммуносупрессивный фактор, функционально связанный с индуцируемым элементом дегрон, для получения сконструированной клетки; и

(c) воздействие экзогенного фактора на сконструированную клетку для активации индуцируемого элемента дегрон, тем самым контролируя иммуногенность сконструированной клетки.

3. Способ контроля иммуногенности сконструированной клетки, включающий:

(a) получение выделенной клетки;

(b) введение в выделенную клетку:

(i) первой конструкции, содержащей от 5'-конца к 3'-концу: первый промотор и ген иммуносупрессивного фактора;

(ii) второй конструкции, содержащей от 5'-конца к 3'-концу: второй промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Cas9 или ее вариант; и

(iii) третью конструкцию, содержащую от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы, последовательность направляющей РНК (нРНК), нацеленную на иммуносупрессивный фактор, третий промотор и трансактивирующий элемент, соответствующий индуцируемому промотору РНК-полимеразы; и

(c) воздействие экзогенного фактора на сконструированную клетку для активации трансактивирующего элемента, тем самым контролируя иммуногенность сконструированной клетки.

4. Способ контроля иммуногенности сконструированной клетки, включающий:

(a) получение выделенной клетки;

(b) введение в выделенную клетку (i) нуклеиновой кислоты, содержащей промотор индуцируемой РНК-полимеразы, функционально связанный с геном иммунного

сигнального фактора, и (ii) нуклеиновой кислоты, содержащей промотор, функционально связанный с трансативирующим элементом, соответствующим индуцируемому промотору РНК-полимеразы, для получения сконструированной клетки; и

(с) воздействие экзогенного фактора на сконструированную клетку для активации трансативирующего элемента, тем самым контролируя иммуногенность сконструированной клетки.

5. Способ по любому из пп. 1-4, дополнительно включающий введение сконструированной клетки субъекту перед стадией (с).

6. Способ по п. 1 или п. 5, отличающийся тем, что стадия (b) включает введение в выделенную клетку одиночной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей (i) промотор индуцируемой РНК-полимеразы, функционально связанный с последовательностью кшРНК, нацеленной на иммуносупрессивный фактор, и (ii) промотор, функционально связанный с трансативирующим элементом.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что конструкция содержит от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы; последовательность кшРНК; промотор; и трансативирующий элемент.

8. Способ по п. 4 или п. 5, отличающийся тем, что стадия (b) включает введение в выделенную клетку одиночной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей (i) промотор индуцируемой РНК-полимеразы, функционально связанный с геном иммунного сигнального фактора, и (ii) промотор, функционально связанный с трансативирующим элементом.

9. Способ по любому из пп. 4, 5 или 8, отличающийся тем, что конструкция содержит от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы, ген иммунного сигнального фактора, промотор и трансативирующий элемент.

10. Способ по любому из пп. 1 или 5-7, отличающийся тем, что выделенная клетка сконструирована так, чтобы экзогенно экспрессировать иммуносупрессивный фактор.

11. Способ по любому из пп. 1, 5-7 или 10, отличающийся тем, что выделенная клетка сверхэкспрессирует иммуносупрессивный фактор в отсутствие экзогенного фактора, который активирует трансативирующий элемент.

12. Способ по любому из пп. 1, 5-7 или 10-11, отличающийся тем, что промотор индуцируемой РНК-полимеразы представляет собой промотор U6Tet.

13. Способ по п. 3 или п. 5, отличающийся тем, что промотор индуцируемой РНК-полимеразы представляет собой промотор U6Tet, трансативирующий элемент представляет собой репрессорный элемент Tet, а экзогенный фактор представляет собой тетрациклин или его производное.

14. Способ по любому из пп. 4, 5 или 8-9, отличающийся тем, что промотор индуцируемой РНК-полимеразы представляет собой промотор TRE, и трансативирующий элемент представляет собой элемент Tet-On, а экзогенный фактор представляет собой тетрациклин или его производное.

15. Способ по п. 2 или п. 5, отличающийся тем, что гибкий линкер соединяет

индуцируемый элемент дегрон с иммуносупрессивным фактором.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что гибкий линкер выбран из группы, состоящей из $(GSG)_n$ (SEQ ID NO:3), $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:1) и $(GGSGGGGS)_n$ (SEQ ID NO:2), где n равно 1-10.

17. Способ по любому из пп. 1, 5 или 15-16, отличающийся тем, что стадия (b) включает введение в выделенную клетку одиночной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой.

18. Способ по любому из пп. 1-4 или 17, отличающийся тем, что промотор представляет собой конститутивный промотор, выбранный из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

19. Способ по любому из пп. 3, 5 или 13, отличающийся тем, что первый, второй и/или третий промоторы представляют собой конститутивные промоторы, каждый из которых независимо выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

20. Способ по любому из пп. 1-3 или 5-19, отличающийся тем, что иммуносупрессивный фактор выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, CI-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8.

21. Способ по любому из пп. 1, 5-14 или 17-20, отличающийся тем, что конструкция содержит от 5'-конца к 3'-концу: промотор U6Tet, последовательность кшРНК, нацеленную на CD47, промотор EF1a и репрессорный элемент Tet, и при этом экзогенный фактор представляет собой тетрациклин или его производное.

22. Способ по любому из пп. 1, 6-14 или 17-20, отличающийся тем, что конструкция дополнительно содержит векторный остов для лентивирусной экспрессии.

23. Способ по любому из пп. 2, 5 или 8-20, отличающийся тем, что индуцируемый элемент дегрон выбран из группы, состоящей из индуцируемого лигандом элемента дегрон, пептидного элемента дегрон и элемента пептидной протеолиз-таргетированной химеры (PROTAC).

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что индуцируемый лигандом элемент дегрон выбран из элемента отключения с помощью малых молекул (SMASH - англ.: small molecule-assisted shutoff) дегрон, чувствительного к Shield-1 элемента дегрон, чувствительного к ауксину элемента дегрон, и чувствительного к рапамицину элемента дегрон.

25. Способ по п. 23 или п. 24, отличающийся тем, что индуцируемый лигандом элемент дегрон представляет собой элемент отключения с помощью малых молекул (SMASH) дегрон, а экзогенный фактор представляет собой асунапревир.

26. Способ по любому из пп. 17-18, 20 или 23-25, отличающийся тем, что

конструкция дополнительно содержит 5'-плечо гомологии и 3'-плечо гомологии для направленной интеграции в локус «безопасная гавань», выбранный из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5.

27. Способ по любому из пп. 1-4 и 5-26, отличающийся тем, что выделенная клетка представляет собой выделенную человеческую клетку, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой.

28. Способ по любому из пп. 1-4 и 5-27, отличающийся тем, что выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА, В2М и/или NLRC5.

29. Способ по любому из пп. 1-4 и 5-28, отличающийся тем, что выделенная человеческая клетка является гипои иммуногенной и является либо стволовой клеткой, либо ее дифференцированной клеткой, причем стволовая клетка выбрана из группы, состоящей из эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки, и при этом дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки сердца, клетки печени, клетки почки, клетки поджелудочной железы, нервной клетки, иммунной клетки, мезенхимальной клетки и эндотелиальной клетки.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что дифференцированная клетка представляет собой клетку поджелудочной железы.

31. Конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы; последовательность кшРНК, нацеленную на иммуносупрессивный фактор; конститутивный промотор; и трансактивирующий элемент, соответствующий индуцируемому промотору РНК-полимеразы.

32. Конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы; ген иммунного сигнального фактора; промотор; и трансактивирующий элемент, соответствующий индуцируемому промотору РНК-полимеразы.

33. Конструкция по п. 31, отличающаяся тем, что промотор индуцируемой РНК-полимеразы представляет собой промотор U6Tet.

34. Конструкция по п. 32, отличающаяся тем, что промотор индуцируемой РНК-полимеразы представляет собой промотор TRE.

35. Конструкция по п. 31 или п. 33, отличающаяся тем, что иммуносупрессивный фактор выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, СI-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8.

36. Конструкция по п. 32 или п. 34, отличающаяся тем, что иммунный сигнальный фактор выбран из группы, состоящей из В2М, MIC-A, MIC-B, HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFXANK, CTLA- 4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAETI/ULBP1, RAET1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3 и других лигандов NKG2D.

37. Конструкция по любому из пп. 31-36, отличающаяся тем, что конститутивный промотор выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

38. Конструкция по любому из пп. 31, 33, 35 или 37 содержит от 5'-конца к 3'-концу: промотор U6Tet, последовательность кшРНК, нацеленную на CD47, промотор EF1a и репрессорный элемент Tet.

39. Конструкция по любому из пп. 32, 34, 36 или 37 содержит от 5'-конца к 3'-концу: промотор TRE, ген иммунного сигнального фактора, промотор EF1a и элемент Tet-On.

40. Конструкция по любому из пп. 31-39, дополнительно содержащая векторный остов для экспрессии лентивируса.

41. Композиция, содержащая выделенную клетку, содержащую конструкцию по любому из пп. 31-40.

42. Композиция, содержащая выделенную клетку, содержащую конструкцию по любому из пп. 31, 33 или 35-38, при этом выделенная клетка сконструирована для экзогенной экспрессии иммуносупрессивного фактора.

43. Композиция по п. 42, отличающаяся тем, что выделенная клетка сверхэкспрессирует иммуносупрессивный фактор в отсутствие экзогенного фактора, который активирует трансактивирующий элемент.

44. Композиция по любому из пп. 40-43, отличающаяся тем, что выделенная клетка подвергается воздействию экзогенного фактора для активации трансактивирующего элемента.

45. Композиция по любому из пп. 41-44, отличающаяся тем, что выделенная клетка представляет собой стволовую клетку, выбранную из группы, состоящей из эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

46. Композиция, содержащая выделенные дифференцированные клетки, полученные путем культивирования стволовой клетки по п. 45 в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

47. Способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий:

(a) введение композиции по п. 46 пациенту; и

(b) воздействие экзогенного фактора на композицию для активации промотора индуцируемой РНК-полимеразы, тем самым контролируя иммуногенность клеток композиции.

48. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, (ii) сверхэкспрессию

CD47 и (iii) фактор, выбранный из группы, состоящей из: индуцируемой кшРНК, нацеленной на CD47, индуцируемого элемента дегрон, контролирующего CD47, или элемента дегрон SMASH, контролирующего CD47.

49. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) фактор, выбранный из группы, состоящей из: индуцируемой кшРНК, нацеленной на CD47, индуцируемого элемента дегрон, контролирующего CD47, или элемента дегрон SMASH, контролирующего CD47.

50. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, (ii) сверхэкспрессию CD47, (iii) Cas9 или ее вариант, и (iv) индуцируемую направляющую РНК, нацеленную на CD47.

51. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, (ii) сверхэкспрессию CD47, (iii) Cas9 или ее вариант и (iv) индуцируемую направляющую РНК, нацеленную на CD47.

52. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) систему индуцируемой деградации белка для модулирования экспрессии CD47, выбранную из группы, состоящей из системы отключения с помощью малых молекул (SMASH), индуцируемого Shield-1 дегрона, индуцируемого ауксином дегрона, индуцируемого IMid дегрона, пептидного дегрона, протелиз-таргетированной химеры, и антитела для направленной деградации.

53. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) систему индуцируемой деградации белка для модулирования экспрессии CD47, выбранную из группы, состоящей из системы отключения с помощью малых молекул (SMASH), индуцируемого Shield-1 дегрона, индуцируемого ауксином дегрона, индуцируемого IMid дегрона, пептидного дегрона, протеолиз-таргетированной химеры и антитела для направленной деградации.

54. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) систему регуляции РНК для модулирования экспрессии CD47, выбранную из группы, состоящей из индуцируемой кшРНК, индуцируемой киРНК, интерференции CRISPR (CRISPRi) и РНК-нацеленной нуклеазной системы

55. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) систему регуляции РНК для модулирования экспрессии CD47, выбранную из группы, состоящей из индуцируемой кшРНК, индуцируемая киРНК, интерференции CRISPR (CRISPRi) и РНК-нацеленной нуклеазной системы.

56. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, (ii) сверхэкспрессию

CD47 и (iii) систему регуляции ДНК для модулирования экспрессии CD47, выбранную из группы, состоящей из системы экспрессии на основе тканеспецифического промотора, системы экспрессии на основе индуцируемого промотора, регулируемой молекулой системы на основе рибопереклювателя, и системы редактирования генома на основе индуцируемой нуклеазы.

57. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) систему регуляции ДНК для модулирования экспрессии CD47, выбранную из группы, состоящей из системы экспрессии на основе тканеспецифического промотора, системы экспрессии на основе индуцируемого промотора, регулируемой молекулой системы на основе рибопереклювателя, и системы редактирования генома на основе индуцируемой нуклеазы.

58. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) индуцируемую систему для модулирования экспрессии CD47.

59. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) индуцируемую систему для модулирования экспрессии CD47.

60. Дифференцированная клетка, полученная из плюрипотентной стволовой клетки по любому из пп. 48-59, отличающаяся тем, что дифференцированная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки сердца, клетки печени, клетки почки, клетки поджелудочной железы, нервной клетки, иммунной клетки, мезенхимальной клетки и эндотелиальной клетки.

61. Конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: промотор, индуцируемый элемент дегрон, необязательную последовательность, кодирующую гибкий линкер, и ген иммуносупрессивного фактора.

62. Конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: промотор, ген иммуносупрессивного фактора, необязательную последовательность, кодирующую гибкий линкер, и индуцируемый элемент дегрон.

63. Конструкция по п. 61 или п. 62, отличающаяся тем, что промотор представляет собой конститутивный промотор, выбранный из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

64. Конструкция по любому из пп. 61-63, отличающаяся тем, что гибкий линкер выбран из группы, состоящей из (GSG)_n(SEQ ID NO:3), (GGGS)_n(SEQ ID NO:1) и (GGSGGGGS)_n(SEQ ID NO:2), где n равно 1-10.

65. Конструкция по любому из пп. 61-64, отличающаяся тем, что иммуносупрессивный фактор выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, CI-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, и Mfge8.

66. Конструкция по любому из пп. 61-65, отличающаяся тем, что индуцируемый элемент дегрон выбран из группы, состоящей из индуцируемого лигандом элемента дегрон, индуцируемого пептидного элемента дегрон и элемента пептидной протеолиз-таргетированной химеры (PROTAC).

67. Конструкция по п. 66, отличающаяся тем, что индуцируемый лигандом элемент дегрон выбран из элемента дегрон отключения с помощью малых молекул (SMASH), чувствительного к Shield-1 элемента дегрон, чувствительного к ауксину элемента дегрон, и чувствительного к рапамицину элемента дегрон.

68. Конструкция по любому из пп. 61-67, дополнительно содержащая 5'-плечо гомологии и 3'-плечо гомологии для направленной интеграции в геномный локус «безопасная гавань», выбранный из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5.

69. Композиция, содержащая выделенную клетку, содержащую конструкцию по любому из пп. 61-68.

70. Композиция по п. 69, отличающаяся тем, что выделенная клетка представляет собой стволовую клетку, выбранную из группы, состоящей из стволовой клетки, эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной стволовой клетки и взрослой стволовой клетки.

71. Композиция, содержащая выделенные дифференцированные клетки, полученные путем культивирования стволовой клетки по п. 70 в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

72. Способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий:

- (a) введение пациенту композиции по п. 71; и
- (b) воздействие экзогенного фактора на композицию для активации индуцируемого элемента дегрон, тем самым контролируя иммуногенность клеток композиции.

73. Композиция, содержащая выделенную клетку, содержащую ДНК-направленную нуклеазную систему для контроля иммуногенности клетки, включающую:

- (a) первый элемент, содержащий от 5'-конца к 3'-концу: первый промотор и ген иммуносупрессивного фактора;
- (b) второй элемент, содержащий от 5'-конца к 3'-концу: второй промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Cas9 или ее вариант; и
- (c) третий элемент, содержащий от 5'-конца к 3'-концу: промотор индуцируемой РНК-полимеразы, последовательность направляющей РНК (нРНК), нацеленную на иммуносупрессивный фактор, третий промотор и транскрибирующий элемент, соответствующий индуцируемому промотору.

74. Композиция по п. 73, отличающаяся тем, что иммуногенность клетки можно контролировать при воздействии на нее экзогенного фактора для индукции активности

трансактивирующего элемента.

75. Композиция по п. 73 или п. 74, отличающаяся тем, что промотор индуцируемой РНК-полимеразы представляет собой промотор U6Tet, трансактивирующий элемент представляет собой репрессорный элемент Tet, а экзогенный фактор представляет собой тетрациклин или его производное.

76. Композиция по любому из пп. 73-75, отличающаяся тем, что иммуносупрессивный фактор выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, CI-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8.

77. Композиция по любому из пп. 73-76, отличающийся тем, что первый, второй и/или третий промоторы представляют собой конститутивные промоторы, каждый из которых независимо выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

78. Композиция по любому из пп. 73-77, отличающаяся тем, что выделенная клетка представляет собой выделенную сконструированную клетку человека, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой.

79. Композиция по п. 78, отличающаяся тем, что выделенная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА, В2М и/или NLRC5.

80. Композиция по п. 78 или п. 79, отличающаяся тем, что выделенная клетка человека является гипоиммуногенной и является стволовой клеткой.

81. Композиция, содержащая выделенные дифференцированные клетки, полученные путем культивирования стволовой клетки по п. 80 в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

82. Способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий:

(а) культивирование клетки по п. 81; и

(b) воздействие экзогенного фактора на композицию для активации промотора индуцируемой РНК-полимеразы, тем самым контролируя иммуногенность клеток композиции.

83. Композиция, содержащая выделенную клетку млекопитающего, имеющую модификацию, содержащую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую систему условной экспрессии одного или более иммуносупрессивных факторов.

84. Композиция, содержащая выделенную клетку млекопитающего, содержащую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую систему

условной экспрессии одного или более иммунных сигнальных факторов.

85. Композиция по п. 83, отличающаяся тем, что экспрессия одного или более иммуносупрессивных факторов контролируется экзогенным фактором.

86. Композиция по п. 84, отличающаяся тем, что экспрессия одного или более иммунных сигнальных факторов контролируется экзогенным фактором.

87. Композиция по п. 83 или п. 85, отличающаяся тем, что система включает систему индуцируемой деградации белка для снижения уровней белка одного или более иммуносупрессивных факторов.

88. Композиция по п. 87, отличающийся тем, что система индуцируемой деградации белка выбрана из группы, состоящей из системы отключения с помощью малых молекул (SMASH), индуцируемого Shield-1 дегрона, индуцируемого ауксином дегрона, индуцируемого IMid дегрона, пептидного дегрона, протеолиз-таргетированной химеры и антитела для направленной деградации.

89. Композиция по п. 83 или п. 85, отличающаяся тем, что указанная система включает систему регуляции РНК для контролируемого снижения уровней РНК одного или более иммуносупрессивных факторов.

90. Композиция по п. 89, отличающаяся тем, что система регуляции РНК выбрана из группы, состоящей из индуцируемой кшРНК, индуцируемой миРНК, интерференции CRISPR (CRISPRi) и РНК-нацеленной нуклеазной системы.

91. Композиция по п. 90, отличающаяся тем, что система регуляции РНК контролируется индуцируемым лигандом фактором транскрипции, рецептором SynNotch или регулируемым лигандом рибопереключателем.

92. Композиция по п. 83 или п. 85, отличающаяся тем, что система включает систему регуляции ДНК для снижения уровней экспрессии одного или более иммуносупрессивных факторов, выбранных из группы, состоящей из системы экспрессии на основе тканеспецифического промотора, системы экспрессии на основе индуцируемого промотора, регулируемой молекулой системы на основе рибопереключателя и системы редактирования генома на основе индуцируемой нуклеазы.

93. Композиция по п. 92, отличающаяся тем, что система экспрессии на основе индуцируемого промотора содержит промотор U6Tet и репрессорный элемент Tet.

94. Композиция по п. 84 или п. 86, отличающаяся тем, что система содержит индуцируемую систему стабилизации белка для повышения уровней белка одного или более иммунных сигнальных факторов.

95. Композиция по п. 94, отличающаяся тем, что система индуцируемой стабилизации белка включает систему индуцируемой лигандом стабилизации белка, и систему индуцируемой малыми молекулами стабилизации белка.

96. Композиция по п. 84 или п. 86, отличающаяся тем, что система включает систему регуляции РНК для повышения уровней РНК одного или более иммунных сигнальных факторов.

97. Композиция по п. 96, отличающаяся тем, что система регуляции РНК включает

систему активации CRISPR (CRISPR a).

98. Композиция по п. 84 или п. 86, отличающаяся тем, что система включает систему регуляции ДНК для повышения уровней экспрессии одного или более иммунных сигнальных факторов.

99. Композиция по п. 98, отличающаяся тем, что система регуляции ДНК содержит одну или более систем регуляции ДНК, выбранных из группы, состоящей из системы активации CRISPR (CRISPR a), тканеспецифического промотора, индуцируемого промотора и регулируемой молекулой системы на основе рибопереклочателя.

100. Композиция по п. 92 или п. 99, отличающаяся тем, что тканеспецифический промотор выбран из группы, состоящей из специфичного для клеток сердца промотора, специфичного для гепатоцитов промотора, специфичного для клеток почек промотора, специфичного для клеток поджелудочной железы промотора, специфичного для нервных клеток промотора, специфичного для иммунных клеток промотора, специфичного для мезенхимальных клеток промотора и специфичного для эндотелиальных клеток промотора.

101. Композиция по п. 99, отличающаяся тем, что индуцируемый промотор содержит систему TetOn.

102. Композиция по п. 92 или п. 99, отличающаяся тем, что регулируемая молекулой система на основе рибопереклочателя содержит регулируемый теофиллином рибопереклочатель или регулируемый гуанином рибопереклочатель.

103. Композиция по п. 92, отличающаяся тем, что система редактирования генома на основе индуцируемой нуклеазы включает систему, выбранную из группы, состоящей из редактирования генома CRISPR, включающего индуцируемую направляющую РНК, направленную на один или более иммуносупрессивных факторов, индуцируемого редактирования генома TALEN, индуцируемого редактирования генома ZFN и улучшенного малыми молекулами редактирования генома CRISPR.

104. Композиция по любому из пп. 83, 85, 87-93, 100 или 102-103, отличающаяся тем, что один или более иммуносупрессивных факторов выбраны из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, CI-ингибитора, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8.

105. Композиция по любому из пп. 84, 86 или 94-102, отличающаяся тем, что один или более иммунных сигнальных факторов выбраны из группы, состоящей из бета-2-микроглобулина (B2M), родственного цепи МНС класса I белка A (MIC-A), родственного цепи МНС класса I белка B (MIC-B), HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFXANK, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1I/ULBP1, RAET1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3 и других лигандов NKG2D.

106. Композиция по любому из пп. 83-105, отличающаяся тем, что выделенная клетка млекопитающего представляет собой выделенную сконструированную клетку человека, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию

человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой.

107. Композиция по п. 106, отличающаяся тем, что выделенная сконструированная клетка человека дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА, В2М и/или NLRC5.

108. Композиция по любому из пп. 106-107, отличающаяся тем, что выделенная сконструированная человеческая клетка является гипоиммуногенной и является стволовой клеткой.

109. Композиция, содержащая выделенную дифференцированную клетку, полученную путем культивирования стволовой клетки по п. 108 в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

110. Способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий:

(а) культивирование клетки по п. 109; и

(б) воздействие экзогенного фактора на композицию для контроля экспрессии одного или более иммуносупрессивных факторов, тем самым контролируя иммуногенность клеток композиции.

111. Конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) трансген защитного переключателя; (2) последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; (3) ген гипоиммунитета.

112. Конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) ген гипоиммунитета; (2) последовательность проскока рибосом или линкер; (3) трансген защитного переключателя.

113. Конструкция по п. 111 или п. 112, отличающаяся тем, что трансген защитного переключателя выбран из группы, состоящей из гена HSVtk, гена цитозиндезаминазы, гена нитроредуктазы, гена пуриннуклеозидфосфорилазы, гена пероксидазы хрена, гена iCaspase9, трансгена HER1, трансгена RQR8, трансгена CD20, трансгена CCR4, трансгена HER2, трансгена CD19, трансгена MUC1, трансгена EGFR, трансгена GD2, трансгена PSMA, трансгена CD16 и трансгена CD30.

114. Конструкция по любому из пп. 101-103, отличающаяся тем, что последовательность проскока рибосом включает последовательность, кодирующую последовательность IRES, или последовательность, кодирующую 2А-кодирующую последовательность.

115. Конструкция по любому из пп. 111-114, отличающаяся тем, что линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

116. Конструкция по любому из пп. 111-115, отличающаяся тем, что ген гипоиммунитета выбран из группы, состоящей из: CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9,

CC121 и Mfge8.

117. Конструкция по любому из пп. 111 или 113-116, дополнительно содержащая элемент регуляции транскрипции, функционально связанный с трансгеном защитного переключателя, и последовательность полиаденилирования на 3'-конце гена гипоиимунитета или элемент регуляции транскрипции, функционально связанный с геном гипоиимунитета и последовательность полиаденилирования на 3'-конце трансгена защитного переключателя.

118. Конструкция по любому из пп. 111-117, отличающаяся тем, что элемент регуляции транскрипции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

119. Конструкция по любому из пп. 111-118, дополнительно содержащая векторный остов для экспрессии лентивируса.

120. Способ доставки конструкции в выделенную клетку, включающий трансдукцию выделенной клетки лентивирусной конструкцией, содержащей конструкцию по п. 119; и отбор сконструированной клетки, имеющей трансген защитного переключателя и ген гипоиимунитета.

121. Выделенная клетка или ее популяция, содержащая конструкцию по любому из пп. 111-119.

122. Выделенная клетка или ее популяция по п. 121, отличающаяся тем, что конструкция была введена в целевой локус гена.

123. Выделенная клетка или ее популяция по п. 121 или п. 122, отличающиеся тем, что целевой локус гена представляет собой либо локус «безопасная гавань», выбранный из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5, либо локус гена иммунного сигналинга, выбранный из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, RFXANK, SIPA, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1I/ULBP1, RAET1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3 и других лигандов NKG2D.

124. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 121-123, отличающаяся тем, что выделенная клетка представляет собой выделенную сконструированную клетку человека, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой.

125. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 121-124, отличающаяся тем, что выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию SIPA, B2M и/или NLRC5.

126. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 121-125, отличающаяся тем, что выделенная клетка является гипоииммуногенной и является стволовой клеткой.

127. Дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования стволовой клетки по п. 126 в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

128. Способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции по п. 127.

129. Способ лечения пациента, включающий активацию защитного переключателя у пациента, которому ранее вводили дифференцированные клетки или их популяцию по п. 127.

130. Конструкция для гомологичной репарации в локусе «безопасная гавань», содержащая от 5'-конца к 3'-концу : (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань»; (2) трансген защитного переключателя; (3) последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; (4) ген гипоиммунитета; (5) последовательность полиаденилирования; и (6) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань».

131. Конструкция для гомологичной репарации в локусе «безопасная гавань», содержащая от 5'-конца к 3'-концу : (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга; (2) трансген защитного переключателя; (3) последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; (4) ген гипоиммунитета; (5) последовательность полиаденилирования; и (6) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга.

132. Конструкция для гомологичной репарации в локусе «безопасная гавань», содержащая от 5'-конца к 3'-концу : (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань»; (2) трансген защитного переключателя; (3) последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (4) ген основного клеточного фактора; (5) последовательность полиаденилирования; и (6) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань».

133. Конструкция для гомологичной репарации иммунного сигналинга, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга; (2) трансген защитного переключателя; (3) последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (4) ген основного клеточного фактора; (5) последовательность полиаденилирования; и (6) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга.

134. Конструкция гомологичной репарации локуса гена основного клеточного фактора, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) первое плечо гомологии, гомологичное

первой эндогенной последовательности локуса гена основного клеточного фактора; (2) последовательность, кодирующую линкер; (3) трансген защитного переключателя; и (4) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса гена основного клеточного фактора.

135. Конструкция по п. 130 или п. 131, отличающаяся тем, что ген гипоиммунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8.

136. Конструкция по п. 132 или п. 133, отличающаяся тем, что основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы и белка субъединицы сплайсосомы.

137. Конструкция по п. 134, отличающаяся тем, что основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы и белка субъединицы сплайсосомы.

138. Конструкция по любому из пп. 130, 132 или 135-136, отличающаяся тем, что локус «безопасная гавань» выбран из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5.

139. Конструкция по любому из пп. 131, 133 или 135-136, отличающаяся тем, что локус гена иммунного сигналинга выбран из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, RFXANK, CIITA, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1I/ULBP1, RAE1 1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3 и других лигандов NKG2D.

140. Конструкция по любому из пп. 133, 136 или 139, отличающаяся тем, что локус гена иммунного сигналинга выбран из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D и HLA-E.

141. Конструкция по любому из пп. 130-133, 135-136 или 138-140, отличающаяся тем, что последовательность проскока рибосом включает последовательность, кодирующую последовательность IRES, или последовательность, кодирующую 2A-кодирующую последовательность.

142. Конструкция по п. 141, отличающаяся тем, что 2A-кодирующая последовательность выбрана из группы, состоящей из T2A, P2A, E2A и F2A.

143. Конструкция по любому из пп. 130-133, 135-136 или 138-142, отличающаяся тем, что конструкция позволяет нацеливающей нуклеазе расщеплять локус «безопасная гавань» или локус гена иммунного сигналинга, тем самым позволяя конструкции рекомбинировать в локус посредством гомологичной репарации.

144. Конструкция по любому из пп. 134 или 137, отличающаяся тем, что конструкция позволяет нацеливающей нуклеазе расщеплять локус гена основного клеточного фактора, тем самым позволяя конструкции рекомбинировать в локус посредством гомологичной репарации.

145. Конструкция по любому из пп. 130-144, дополнительно содержащая элемент регуляции транскрипции, выбранный из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC, который расположен на 5'-конце трансгена защитного переключателя.

146. Конструкция по любому из пп. 130-145, отличающаяся тем, что трансген защитного переключателя выбран из группы, состоящей из гена HSVtk, гена цитозиндезаминазы, гена нитроредуктазы, гена пуриннуклеозидфосфорилазы, гена пероксидазы хрена, гена iCaspase9, трансгена HER1, трансгена RQR8, трансгена CD20, трансгена CCR4, трансгена HER2, трансгена CD19, трансгена MUC1, трансгена EGFR, трансгена GD2, трансгена PSMA, трансгена CD16 и трансгена CD30.

147. Конструкция по любому из пп. 130-146, отличающаяся тем, что линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

148. Выделенная клетка или ее популяция, содержащая трансген защитного переключателя и ген гипоиммунитета, интегрированный в локус «безопасная гавань» или локус гена иммунного сигналинга, причем конструкция по любому из пп. 130, 135, 138, 141-143 или 145-147 рекомбинировала в эндогенный локус «безопасная гавань» клетки, или конструкция по любому из пп. 131, 135 или 135-147 рекомбинировала в эндогенный локус гена иммунного сигналинга клетки.

149. Выделенная клетка или ее популяция, содержащая трансген защитного переключателя и ген основного клеточного фактора, интегрированный в локус «безопасная гавань» или локус гена иммунного сигналинга, причем конструкция по любому из пп. 132, 136, 138, 141, 143 или 145-147 рекомбинировала в эндогенный локус «безопасная гавань» клетки, или при этом конструкция по любому из пп. 133, 136, 139-143 или 145-147 рекомбинировала в эндогенный локус гена иммунного сигналинга клетки, и при этом клетка или ее популяция не способны экспрессировать основной клеточный фактор из эндогенного локуса.

150. Выделенная клетка или ее популяция по п. 148 или п. 149, отличающаяся тем, что выделенная клетка представляет собой выделенную сконструированную клетку человека, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой.

151. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 148-150, отличающаяся тем, что выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА, В2М и/или NLRC5.

152. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 148-151, отличающаяся тем, что выделенная клетка является гипоиммуногенной и является стволовой клеткой.

153. Дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем

культивирования стволовой клетки по п. 152 в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клетки печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

154. Способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции по п. 153.

155. Способ лечения пациента, включающий активацию защитного переключателя у пациента, которому ранее вводили дифференцированные клетки или их популяцию по п. 153.

156. Независимая от гомологии донорная конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) 5'-концевые длинные повторы (LTR), содержащие левый элемент (LE); (2) элемент акцептор сплайсинга-вирусный пептид 2A (SA-2A); (3) трансген защитного переключателя; (4) последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (5) ген гипоиимунитета; (6) последовательность полиаденилирования; и (7) 3' LTR, содержащий правый элемент (RE).

157. Независимая от гомологии донорная конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) 5'-длинные концевые повторы (LTR), содержащие левый элемент (LE); (2) элемент акцептор сплайсинга-вирусный пептид 2A (SA-2A); (3) трансген защитного переключателя; (4) последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (5) ген основного клеточного фактора; (6) последовательность полиаденилирования; и (7) 3' LTR, содержащий правый элемент (RE).

158. Независимая от гомологии донорная конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) 5'-длинные концевые повторы (LTR), содержащие левый элемент (LE); (2) элемент акцептор сплайсинга-вирусный пептид 2A (SA-2A); (3) ген основного клеточного фактора; (4) последовательность проскока рибосом или последовательность, кодирующую линкер; (5) трансген защитного переключателя; (6) последовательность полиаденилирования; и (7) 3' LTR, содержащий правый элемент (RE).

159. Конструкция по п. 156, отличающаяся тем, что ген гипоиимунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, и Mfge8.

160. Конструкция по п. 157 или п. 158, отличающаяся тем, что основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы и субъединицы сплайсосомы белок.

161. Конструкция по любому из пп. 156-160, отличающаяся тем, что конструкция предназначена для интеграции в целевой локус гена выделенной клетки для нарушения экспрессии целевого гена.

162. Конструкция по любому из пп. 156-161, отличающаяся тем, что трансген защитного переключателя выбран из группы, состоящей из гена HSVtk, гена цитозиндезаминазы, гена нитроредуктазы, гена пуриннуклеозидфосфорилазы, гена

пероксидазы хрена, гена iCaspase9, трансгена HER1, трансгена RQR8, трансгена CD20, трансгена CCR4, трансгена HER2, трансгена CD19, трансгена MUC1, трансгена EGFR, трансгена GD2, трансгена PSMA, трансгена CD16 и трансгена CD30.

163. Конструкция по любому из пп. 156-162, отличающаяся тем, что целевой локус гена представляет собой локус гена иммунного сигналинга, выбранный из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, RFXANK, СИТА, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAETI/ULBP1, RAET1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3, и других лигандов NKG2D.

164. Конструкция по любому из пп. 156-162, отличающаяся тем, что целевой локус гена представляет собой локус гена иммунного сигналинга, выбранный из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA C, HLA-D и HLA-E.

165. Конструкция по любому из пп. 156-164, отличающаяся тем, что целевой локус гена представляет собой локус «безопасная гавань», выбранный из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26 и локуса CCR5.

166. Выделенная клетка или ее популяция, содержащая конструкцию по любому из пп. 156-165, отличающаяся тем, что конструкция интегрирована в эндогенный целевой ген для нарушения экспрессии целевого гена в выделенной клетке.

167. Выделенная клетка или популяция по п. 166, отличающаяся тем, что выделенная клетка не способна экспрессировать основной клеточный фактор из эндогенных локусов.

168. Выделенная клетка или ее популяция по п. 167, отличающаяся тем, что конструкция интегрирована в целевой ген в целевом сайте нуклеазы или транспозазы.

169. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 166-168, отличающаяся тем, что один аллель целевого гена нарушен в результате нацеливания нуклеазы или транспозазы.

170. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 166-169, отличающаяся тем, что оба аллеля целевого гена нарушены в результате нацеливания нуклеазы или транспозазы.

171. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 166-170, отличающаяся тем, что выделенная клетка представляет собой выделенную сконструированную клетку человека, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой клеткой.

172. Выделенная клетка или ее популяция по п. 171, отличающаяся тем, что выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА, B2M и/или NLRC5.

173. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 166-172, отличающаяся тем, что выделенная клетка является гипоиммуногенной и является стволовой клеткой.

174. Дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования стволовой клетки по п. 173 в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

175. Способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции по п. 174.

176. Способ лечения пациента, включающий активацию защитного переключателя у пациента, которому ранее вводили дифференцированные клетки или их популяцию по п. 174 или п. 175.

177. Выделенная клетка или ее популяция, содержащая ген основного клеточного фактора, функционально связанный с последовательностью, кодирующей линкер, который функционально связан с трансгеном защитного переключателя.

178. Выделенная клетка или ее популяция по п. 177, отличающаяся тем, что основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psm14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы и белка субъединицы сплайсосомы.

179. Выделенная клетка или ее популяция по п. 177 или п. 178, отличающаяся тем, что линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

180. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 177-179, отличающаяся тем, что трансген защитного переключателя выбран из группы, состоящей из гена HSVtk, гена цитозиндезаминазы, гена нитроредуктазы, гена пуриннуклеозидфосфорилазы, гена пероксидазы хрена, гена iCaspase9, трансгена HER1, трансгена RQR8, трансгена CD20, трансгена CCR4, трансгена HER2, трансгена CD19, трансгена MUC1, трансгена EGFR, трансгена GD2, трансгена PSMA, трансгена CD30 и трансгена CD16.

181. Слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа, содержащий: (1) фактор гипоиимунитета, выбранный из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, Mfge8 и их мембраносвязанных форм; и (2) экспонированный на поверхности пептидный эпитоп, гетерологичный фактору гипоиимунитета, выбранный из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

182. Конструкция, кодирующая слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа, содержащая: (1) последовательность, кодирующую фактор гипоиимунитета, выбранный из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, Mfge8 и их мембраносвязанных форм; и (2) последовательность, кодирующую экспонированный на поверхности пептидный эпитоп, гетерологичный фактору гипоиимунитета, выбранному из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4,

эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

183. Белок по п. 181 или конструкция по п. 182, отличающиеся тем, что эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутузумаба, ублитуксимаба, окаратузумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотузумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томузотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RLic и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

184. Белок по п. 181 или п. 183, отличающийся тем, что фактор гипоиимунитета и/или пептидный эпитоп находятся на N-конце слитого белка.

185. Белок по любому из пп. 181 или 183, дополнительно содержащий линкер, соединяющий фактор гипоиимунитета и пептидный эпитоп и/или расположенный на N-конце или С-конце слитого белка, причем линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

186. Конструкция по любому из пп. 182 или 183, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая фактор гипоиимунитета, находится на 5'-конце последовательности, кодирующей пептидный эпитоп, и/или последовательность, кодирующая пептидный эпитоп, расположена на 5'-конце последовательности, кодирующей фактор гипоиимунитета.

187. Конструкция по любому из пп. 182 или 183, дополнительно содержащая последовательность, кодирующую линкер, соединяющий последовательность, кодирующую фактор гипоиимунитета, и последовательность, кодирующую пептидный эпитоп, и/или расположенный на N-конце или С-конце слитого белка.

188. Конструкция по п. 187, отличающаяся тем, что линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

189. Конструкция по любому из пп. 182-184 или 186-188, дополнительно содержащая элемент регуляции транскрипции, выбранный из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40,

промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

190. Конструкция по любому из пп. 182-184 или 186-189, дополнительно содержащая первое плечо гомологии и второе плечо гомологии, гомологичную локусу целевого гена, для гомологичной репарации на основе CRISPR.

191. Конструкция по любому из пп. 182-184 или 186-190, дополнительно содержащая векторный остов для экспрессии лентивируса.

192. Способ, включающий трансдукцию выделенной клетки конструкцией по п. 191; и отбор выделенной клетки, которая экспрессирует слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа.

193. Выделенная клетка или ее популяция, содержащая конструкцию по любому из пп. 182-184 или 186-191.

194. Выделенная клетка или ее популяция по п. 193, отличающаяся тем, что выделенная клетка представляет собой выделенную клетку человека, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека.

195. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 193-194, отличающаяся тем, что выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА, В2М и/или NLRC5.

196. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 193-195, отличающаяся тем, что выделенная клетка является гипоиммуногенной и является стволовой клеткой.

197. Дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования стволовой клетки по п. 196 в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

198. Способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции по п. 197.

199. Способ лечения пациента, включающий введение пациенту, которому ранее вводили дифференцированную клетку или ее популяцию по п. 197, антитела, которое связывает пептидный эпитоп.

200. Способ по п. 199, отличающийся тем, что антитело опосредует АЗКЦ или КЗЦ.

201. Слитый белок рекомбинантный CD47-внутренний пептидный эпитоп, содержащий от N-конца к С-концу: (1) фрагмент CD47 человека, содержащий домен IgV CD47; (2) первый линкер; (3) гетерологичный пептидный эпитоп; (4) второй линкер; и (5) трансмембранный домен CD47 человека.

202. Белок по п. 201, отличающийся тем, что фрагмент CD47 человека,

содержащий домен IgV, содержит аминокислотные остатки 1-127 белка CD47 человека.

203. Белок по п. 201 или п. 202, отличающийся тем, что трансмембранный домен CD47 человека содержит аминокислотные остатки 128-348 белка CD47 человека.

204. Белок по любому из пп. 201-203, отличающийся тем, что первый и второй линкеры выбраны из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

205. Белок по любому из пп. 201-204, отличающийся тем, что пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

206. Белок по п. 205, отличающийся тем, что эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутузумаба, ублитуксимаба, окаратузумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотузумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томузотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RLic и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

207. Конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) элемент регуляции транскрипции; (2) последовательность, кодирующую фрагмент CD47 человека, содержащий домен IgV CD47; (3) первый линкер; (4) последовательность, кодирующую пептидный эпитоп; (5) второй линкер; и (6) последовательность, кодирующую фрагмент CD47 человека, включающий трансмембранный домен и С-конец.

208. Конструкция по п. 207, отличающаяся тем, что фрагмент CD47 человека, содержащий домен IgV, кодирует аминокислотные остатки 1-127 белка CD47 человека.

209. Конструкция по п. 207 или п. 208, отличающаяся тем, что фрагмент CD47 человека, кодирующий трансмембранный домен и С-конец, содержит аминокислотные остатки 128-348 белка CD47 человека.

210. Конструкция по любому из пп. 207-209, отличающаяся тем, что первый и второй линкеры выбраны из любых линкеров, представленных в таблице 3.

211. Конструкция по любому из пп. 207-210, отличающаяся тем, что пептидный

эпитоп, кодируемый последовательностью (4) конструкции, выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

212. Конструкция по п. 211, отличающаяся тем, что эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутузумаба, ублитуксимаба, окаратузумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотузумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томизотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RLic и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

213. Конструкция по любому из пп. 207-212, отличающаяся тем, что элемент регуляции транскрипции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

214. Конструкция по любому из пп. 207-213, дополнительно содержащая первое плечо гомологии и второе плечо гомологии, гомологичное локусу целевого гена, для гомологичной репарации на основе CRISPR.

215. Конструкция по любому из пп. 207-214, дополнительно содержащая векторный остов для экспрессии лентивируса.

216. Способ, включающий трансдукцию выделенной клетки конструкцией по п. 215; и отбор выделенной клетки, которая экспрессирует слитый белок CD47-внутренний пептидный эпитоп.

217. Выделенная клетка или ее популяция, содержащая конструкцию по любому из пп. 207-215.

218. Выделенная клетка или ее популяция по п. 217, отличающаяся тем, что выделенная клетка представляет собой выделенную сконструированную клетку человека, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с

немодифицированной клеткой человека.

219. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 217-218, отличающаяся тем, что выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию CPTA, B2M и/или NLRC5.

220. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 217-219, отличающаяся тем, что выделенная клетка является гипоиммуногенной и является стволовой клеткой.

221. Дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования стволовой клетки по п. 220 в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

222. Способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции по п. 221.

223. Способ лечения пациента, которому ранее вводили дифференцированную клетку или ее популяцию по п. 221, включающий введение пациенту антитела, которое связывает пептидный эпитоп.

224. Способ по п. 223, отличающийся тем, что антитело опосредует АЗКЦ или КЗЦ.

225. Конструкция, содержащая (1) элемент регуляции транскрипции, (2) ген основного клеточного фактора, (3) посттранскрипционный или посттрансляционный регуляторный элемент и (4) последовательность полиаденилирования.

226. Конструкция по п. 225, отличающаяся тем, что основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы и белка субъединицы сплайсосомы.

227. Конструкция по п. 225 или п. 226, отличающаяся тем, что элемент регуляции транскрипции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

228. Конструкция по любому из пп. 225-227, отличающаяся тем, что посттранскрипционный регуляторный элемент представляет собой систему регуляции РНК, выбранную из группы, состоящей из индуцируемой кшРНК, индуцируемой киРНК, интерференции CRISPR (CRISPRi) и РНК-нацеленной нуклеазной системы

229. Конструкция по любому из пп. 225-227, отличающаяся тем, что посттрансляционный регуляторный элемент представляет собой систему индуцируемой деградации белка, выбранную из группы, состоящей из системы отключения с помощью малых молекул (SMASH), индуцируемого Shield-1 дегрона, индуцируемого ауксином дегрона, индуцируемого IMid дегрона, пептидного дегрона, протеолиз-таргетированной химеры и антитела для направленной деградации.

230. Выделенная клетка, содержащая рекомбинантный основной клеточный фактор, находящийся под контролем посттранскрипционного или посттрансляционного регуляторного элемента, где ген эндогенного основного клеточного фактора инактивирован, а экспрессия рекомбинантного основного клеточного фактора контролируется экзогенным фактором.

231. Выделенная клетка по п. 230, отличающаяся тем, что основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы и белка субъединицы сплайсосомы.

232. Выделенная клетка пп. 230-231, отличающаяся тем, что посттранскрипционный регуляторный элемент представляет собой систему регуляции РНК, выбранную из группы, состоящей из индуцируемой кшРНК, индуцируемой киРНК, интерференции CRISPR (CRISPRi) и РНК-нацеленной нуклеазной системы

233. Выделенная клетка по любому из пп. 230-232, отличающаяся тем, что посттрансляционный регуляторный элемент представляет собой систему индуцируемой деградации белка, выбранную из группы, состоящей из системы отключения с помощью малых молекул (SMASH), индуцируемого Shield-1 дегрона, индуцируемого ауксином дегрона, индуцируемого IMid дегрона, пептидного дегрона, протеолиз-таргетированной химеры и антитела для направленной деградации.

234. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 230-233, отличающаяся тем, что выделенная клетка представляет собой аутологичную клетку человека или аллогенную клетку человека.

235. Выделенная клетка или ее популяция по п. 234, отличающаяся тем, что выделенная клетка представляет собой выделенную сконструированную клетку человека, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека.

236. Выделенная клетка или ее популяция по п. 234 или п. 235, отличающаяся тем, что выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СПТА, В2М и/или NLRC5.

237. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 234-236, отличающаяся тем, что выделенная клетка является гипоиммуногенной и выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки и дифференцированной клетки.

238. Бицистронная конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) элемент регуляции транскрипции; (2) последовательность, кодирующую экспонированный на поверхности пептидный эпитоп; (3) последовательность проскока рибосом; и (4) последовательность, кодирующую фактор гипоиммунитета.

239. Конструкция по п. 238, отличающаяся тем, что фактор гипоиммунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой

цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, Mfge8 и их мембраносвязанных форм.

240. Конструкция по п. 238 или п. 239, отличающаяся тем, что экспонированный на поверхности пептидный эпитоп, кодируемый последовательностью (2) конструкции, выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

241. Конструкция по п. 240, отличающаяся тем, что эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутумаба, ублитуксимаба, окаратузумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастузумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томузотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RL1c и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

242. Конструкция по любому из пп. 238-241, отличающаяся тем, что последовательность проскока рибосом включает последовательность, кодирующую последовательность IRES, или последовательность, кодирующую 2А-кодирующую последовательность.

243. Конструкция по любому из пп. 238-242, отличающаяся тем, что элемент регуляции транскрипции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

244. Конструкция по любому из пп. 238-243, дополнительно содержащая первое плечо гомологии и второе плечо гомологии, гомологичное локусу целевого гена, для гомологичной репарации на основе CRISPR.

245. Конструкция по любому из пп. 238-244, дополнительно содержащая векторный остов для экспрессии лентивируса.

246. Способ, включающий трансдукцию выделенной клетки конструкцией по п. 245; и отбор выделенной клетки, которая экспрессирует фактор гипои иммунитета и

пептидный эпитоп.

247. Выделенная клетка или ее популяция, содержащая конструкцию по любому из пп. 238-245.

248. Выделенная клетка или ее популяция по п. 247, отличающаяся тем, что выделенная клетка представляет собой выделенную сконструированную клетку человека, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека.

249. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 247-248, отличающаяся тем, что выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СПТА, В2М и/или NLRC5.

250. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 247-249, отличающаяся тем, что выделенная клетка является гипоиммуногенной и является стволовой клеткой.

251. Дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования стволовой клетки по п. 250 в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

252. Способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции по п. 251.

253. Способ лечения пациента, включающий введение пациенту, которому ранее вводили дифференцированную клетку или ее популяцию по п. 251, антитела, которое связывается с пептидным эпитопом.

254. Способ по п. 253, отличающийся тем, что антитело опосредует АЗКЦ или КЗЦ.

255. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, (ii) трансген защитного переключателя и (iii) ген фактора гипоиммунитета, причем экспрессия трансгена защитного переключателя модулирует экспрессию гена фактора гипоиммунитета.

256. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию В2М и СПТА, (ii) сверхэкспрессию CD47, (iii) трансген защитного переключателя и (iv) ген фактора гипоиммунитета, причем экспрессия трансгена защитного переключателя модулирует экспрессию ген фактора гипоиммунитета.

257. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II, (ii) защитный переключатель и (iv) фактор гипоиммунитета, причем экспрессия защитного переключателя модулирует экспрессию фактор гипоиммунитета.

258. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную

экспрессию B2M и СИТА, (ii) сверхэкспрессию CD47, (iii) защитный переключатель и (iv) фактор гипоиимунитета, причем экспрессия защитного переключателя модулирует экспрессию фактора гипоиимунитета.

259. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию молекул МНС класса I и/или молекул МНС класса II и (ii) фактор гипоиимунитета, связанный с экспонированным на поверхности пептидным эпитопом; при этом пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30, и при этом фактор гипоиимунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, Mfge8 и их мембраносвязанных форм.

260. Плюрипотентная стволовая клетка, имеющая (i) сниженную или подавленную экспрессию B2M и СИТА, (ii) сверхэкспрессию CD47 и (iii) фактор гипоиимунитета, связанный с экспонированным на поверхности пептидным эпитопом; причем пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30, и при этом фактор гипоиимунитета выбран из группы, состоящей из CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, Mfge8 и их мембраносвязанных форм.

261. Конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) трансген защитного переключателя; (2) последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; и (3) ген основного клеточного фактора.

262. Конструкция, содержащая от 5'-конца к 3'-концу: (1) ген основного клеточного фактора; (2) последовательность проскока рибосом или линкер; и (3) трансген защитного переключателя.

263. Конструкция по п. 261 или п. 262, отличающаяся тем, что трансген защитного переключателя выбран из группы, состоящей из гена HSVtk, гена цитозиндезаминазы, гена нитроредуктазы, гена пуриннуклеозидфосфорилазы, гена пероксидазы хрена, гена iCaspase9, трансгена HER1, трансгена RQR8, трансгена CD20, трансгена CCR4, трансгена HER2, трансгена CD19, трансгена MUC1, трансгена EGFR, трансгена GD2, трансгена PSMA, трансгена CD16 и трансгена CD30.

264. Конструкция по любому из пп. 261-263, отличающаяся тем, что последовательность проскока рибосом включает последовательность, кодирующую последовательность IRES, или последовательность, кодирующую 2A-кодирующую последовательность.

265. Конструкция по любому из пп. 261-264, отличающаяся тем, что линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

266. Конструкция по любому из пп. 261-265, отличающаяся тем, что ген гипоиимунитета выбран из группы, состоящей из: CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E,

HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121 и Mfge8.

267. Конструкция по любому из пп. 261 или 263-266, дополнительно содержащая элемент регуляции транскрипции, функционально связанный с трансгеном защитного переключателя, и последовательность полиаденилирования на 3'-конце гена гипоиммунитета, или элемент регуляции транскрипции, функционально связанный с геном гипоиммунитета, и последовательность полиаденилирования на 3'-конце трансгена защитного переключателя.

268. Конструкция по любому из пп. 261-267, отличающаяся тем, что элемент регуляции транскрипции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

269. Конструкция по любому из пп. 261-268, дополнительно содержащая векторный остов для экспрессии лентивируса.

270. Способ, включающий трансдукцию выделенной клетки конструкцией по п. 269; и отбор выделенной клетки, несущей трансген защитного переключателя и ген гипоиммунитета.

271. Выделенная клетка или ее популяция, содержащая конструкцию по любому из пп. 261-269.

272. Выделенная клетка или ее популяция по п. 271, отличающаяся тем, что конструкция была введена в целевой локус гена.

273. Выделенная клетка или ее популяция по п. 271 или п. 272, отличающиеся тем, что целевой локус гена выбран из группы, состоящей из локуса «безопасная гавань», выбранного из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CLBYL, локуса CXCR4, локуса Rosa26, и локуса CCR5, и локуса гена иммунного сигналинга, выбранного из группы, состоящей из B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, RFXANK, СИТА, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAETI/ULBP1, RAET1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3, и других лигандов NKG2D.

274. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 271-273, отличающаяся тем, что выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека.

275. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 271-274, отличающаяся тем, что выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СИТА, B2M и/или NLRC5.

276. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 271-275, отличающаяся тем, что выделенная клетка является гипоиμмогенной и является стволовой клеткой.

277. Дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем

культивирования стволовой клетки по п. 276 в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

278. Способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции по п. 277.

279. Способ лечения пациента, которому ранее вводили дифференцированные клетки или их популяцию по п. 277, включающий активацию защитного переключателя у пациента.

280. Слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа, содержащий: (1) основной клеточный фактор; и (2) экспонированный на поверхности пептидный эпитоп, гетерологичный основному клеточному фактору.

281. Белок по п. 280, отличающийся тем, что основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы, белка субъединицы сплайсосомы и их мембраносвязанных форм.

282. Белок по п. 280 или п. 281, отличающийся тем, что пептидный эпитоп выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

283. Белок по п. 282, отличающийся тем, что эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутумаба, ублитуксимаба, окаратумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастуумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томузотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, с.60C3-RL1c и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2хCD16 и их биоаналогов.

284. Белок по любому из пп. 280-283, отличающийся тем, что основной клеточный фактор находится на N-конце слитого белка.

285. Белок по любому из пп. 280-284, отличающийся тем, что пептидный эпитоп находится на N-конце слитого белка.

286. Белок по любому из пп. 280-285, дополнительно содержащий линкер, соединяющий основной клеточный фактор и пептидный эпитоп.

287. Белок по любому из пп. 280-286, дополнительно содержащий линкер, расположенный на N-конце пептидного эпитопа.

288. Белок по п. 286 или п. 287, отличающийся тем, что линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

289. Конструкция, кодирующая слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа, содержащая: (1) последовательность, кодирующую основной клеточный фактор; и (2) последовательность, кодирующую экспонированный на поверхности пептидный эпитоп, гетерологичный основному клеточному фактору.

290. Конструкция по п. 289, отличающаяся тем, что основной клеточный фактор выбран из группы, состоящей из RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpn22, Psmd14, PSMA3, белка субъединицы рибосомы, белка субъединицы протеасомы, белка субъединицы сплайсосомы и их мембраносвязанных форм.

291. Конструкция по п. 289 или п. 290, отличающаяся тем, что пептидный эпитоп, кодируемый последовательностью (2) конструкции, выбран из группы, состоящей из эпитопа CD20, эпитопа CCR4, эпитопа HER2, эпитопа CD19, эпитопа MUC1, эпитопа EGFR, эпитопа GD2, эпитопа PSMA, эпитопа CD16 и эпитопа CD30.

292. Конструкция по п. 291, отличающаяся тем, что эпитоп CD20 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из обинутумаба, ублитуксимаба, окаратумаба, ритуксимаба, ритуксимаба-RL1b и их биоаналогов; эпитоп CCR4 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из могамулизумаба и его биоаналогов; эпитоп HER2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из маргетуксимаба, трастуумаба, TrasGEX и их биоаналогов; эпитоп CD19 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из MOR208 и его биоаналогов; эпитоп MUC1 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из гатипотумаба и его биоаналогов; эпитоп EGFR распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из томизотуксимаба, RO5083945 (GA201), цетуксимаба и их биоаналогов; эпитоп GD2 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из Hul4.18K322A, Hul4.18-IL2, Hu3F8, динитуксимаба, c.60C3-RLic и их биоаналогов; эпитоп PSMA распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из KM2812 и его биоаналогов; эпитоп CD30 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из AFM13 и его биоаналогов, или эпитоп CD20 или CD16 распознается терапевтическим антителом, выбранным из группы, состоящей из (CD20)2xCD16 и их биоаналогов.

293. Конструкция по любому из пп. 289-292, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая основной клеточный фактор, расположена на 5'-конце

последовательности, кодирующей пептидный эпитоп.

294. Конструкция по любому из пп. 289-293, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая пептидный эпитоп, находится на 5'-конце последовательности, кодирующей основной клеточный фактор.

295. Конструкция по любому из пп. 289-294, дополнительно содержащая последовательность, кодирующую линкер, соединяющий последовательность, кодирующую основной клеточный фактор, и последовательность, кодирующую пептидный эпитоп.

296. Конструкция по любому из пп. 289-295, дополнительно содержащая последовательность, кодирующую линкер, расположенный на N-конце или C-конце слитого белка.

297. Конструкция по любому из пп. 295-296, отличающаяся тем, что линкер выбран из любого из линкеров, представленных в таблице 3.

298. Конструкция по любому из пп. 289-297, дополнительно содержащая элемент регуляции транскрипции, выбранный из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

299. Конструкция по любому из пп. 289-298, дополнительно содержащая первое плечо гомологии и второе плечо гомологии, гомологичное локусу целевого гена, для гомологичной репарации на основе CRISPR.

300. Конструкция по любому из пп. 289-299, дополнительно содержащая векторный остов для экспрессии лентивируса.

301. Способ, включающий трансдукцию выделенной клетки конструкцией по п. 300; и отбор выделенной клетки, экспрессирующей слитый белок рекомбинантного пептидного эпитопа.

302. Выделенная клетка или ее популяция, содержащая конструкцию по любому из пп. 289-300.

303. Выделенная клетка или ее популяция по п. 302, отличающаяся тем, что выделенная клетка представляет собой выделенную клетку человека, дополнительно имеющую делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека.

304. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 302-303, отличающаяся тем, что выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию SPТА, B2M и/или NLRC5.

305. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 302-304, отличающаяся тем, что выделенная клетка является гипоиммуногенной и является стволовой клеткой.

306. Дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования стволовой клетки по п. 305 в условиях дифференцировки, подходящих

для дифференцировки стволовой клетки в тип клеток, выбранный из группы, состоящей из клеток сердца, клеток печени, клеток почек, клеток поджелудочной железы, нервных клеток, иммунных клеток, мезенхимальных клеток и эндотелиальных клеток.

307. Способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции по п. 306.

308. Способ лечения пациента, включающий введение пациенту, которому ранее вводили дифференцированную клетку или ее популяцию по п. 307, антитела, которое связывает пептидный эпитоп.

309. Способ по п. 308, отличающийся тем, что антитело опосредует АЗКЦ или КЗЦ.

310. Конструкция для гомологичной репарации в локусе «безопасная гавань», содержащая от 5'-конца к 3'-концу : (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань»; (2) элемент регуляции транскрипции; (3) трансген защитного переключателя HSVtk; (4) последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; (5) ген гипоиимунитета CD47; (6) последовательность полиаденилирования; и (7) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса «безопасная гавань».

311. Конструкция для гомологичной репарации в локусе «безопасная гавань», содержащая от 5'-конца к 3'-концу : (1) первое плечо гомологии, гомологичное первой эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга; (2) элемент регуляции транскрипции; (3) трансген защитного переключателя HSVtk; (4) последовательность проскока рибосом и/или последовательность, кодирующую линкер; (5) ген гипоиимунитета CD47; (6) последовательность полиаденилирования; и (7) второе плечо гомологии, гомологичное второй эндогенной последовательности локуса гена иммунного сигналинга.

312. Конструкция по п. 310 или п. 311, отличающаяся тем, что элемент регуляции транскрипции выбран из группы, состоящей из промотора EF1A, промотора EFS, промотора CMV, промотора CAGGS, промотора SV40, промотора COPIA, промотора ACT5C, промотора TRE, промотора CBh, промотора PGK и промотора UBC.

313. Конструкция по любому из пп. 310-312, дополнительно содержащая векторный остов для экспрессии лентивируса.

314. Выделенная клетка или ее популяция, содержащие трансген защитного переключателя и ген гипоиимунитета, интегрированный в локус «безопасная гавань» или локус гена иммунного сигналинга, причем конструкция по любому из пп. 310-313 рекомбинировала в эндогенный локус «безопасная гавань» выделенной клетки или в эндогенный локус целевого гена выделенной клетки.

315. Выделенная клетка или ее популяция по п. 314, отличающаяся тем, что выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или делецию или сниженную

экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой человека.

316. Выделенная клетка или ее популяция по п. 314 или п. 315, отличающаяся тем, что выделенная клетка дополнительно имеет делецию или сниженную экспрессию СПТА, В2М и/или NLRC5.

317. Выделенная клетка или ее популяция по любому из пп. 314-316, отличающаяся тем, что выделенная клетка является гипоиммуногенной и является стволовой клеткой.

318. Дифференцированная клетка или ее популяция, полученная путем культивирования стволовой клетки по п. 317 в условиях дифференцировки, подходящих для дифференцировки в клетки поджелудочной железы.

319. Дифференцированная клетка или ее популяция по п. 318, отличающаяся тем, что клетки поджелудочной железы представляют собой бета-инсулоциты.

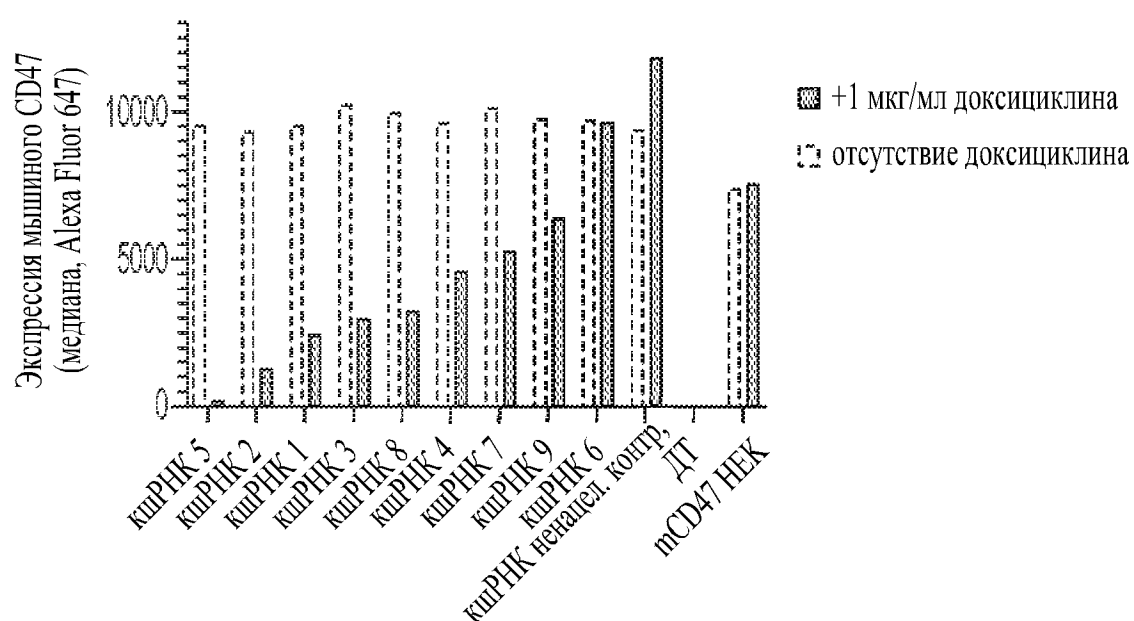
320. Способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение пациенту дифференцированных клеток или их популяции по п. 318 или п. 319 и активацию защитного переключателя у пациента, которому ранее вводили дифференцированные клетки или их популяцию по п. 318 или п. 319.

По доверенности

Фиг. 1

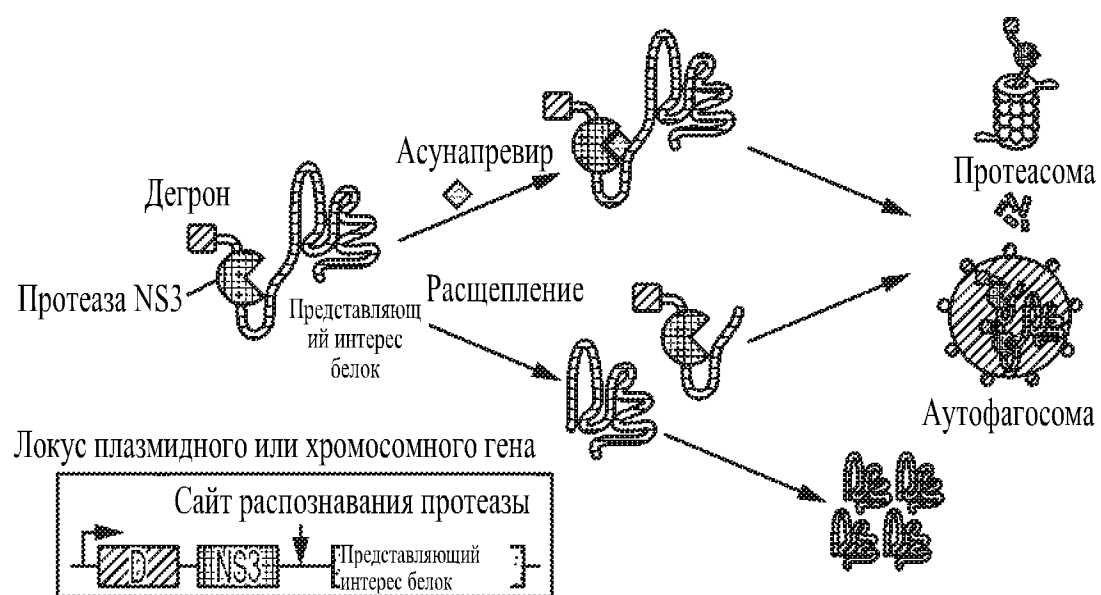


Нокдаун экспрессии мышиного CD47
с помощью индуцируемой кшРНК



Индукцируемый мышиный CD47, нацеленный на кшРНК

Фиг. 2

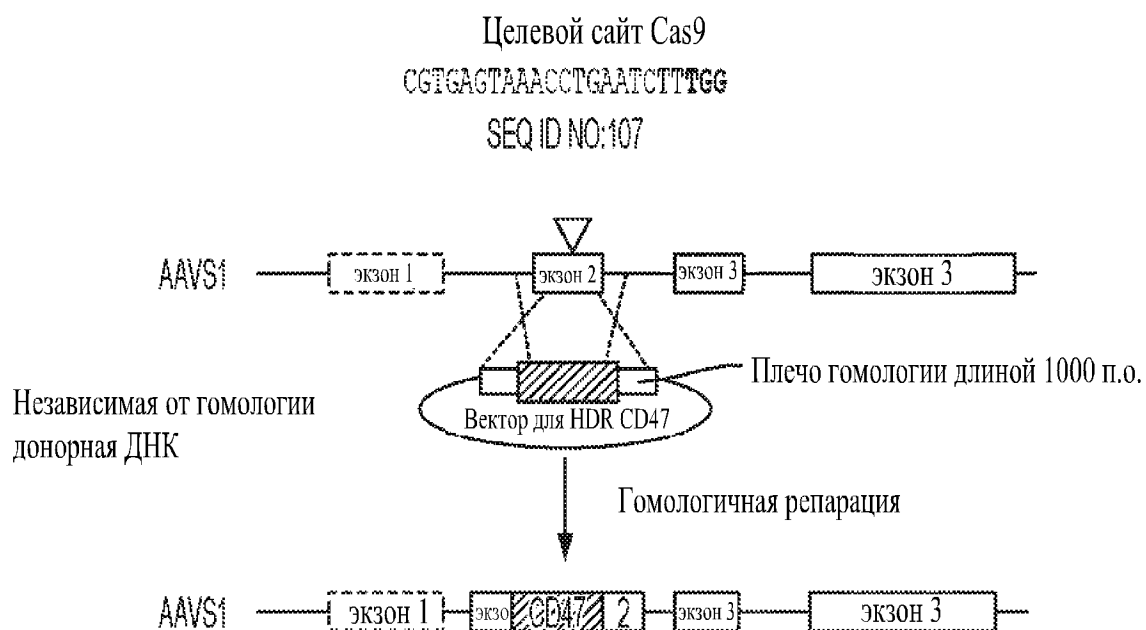


Фиг. 3А и 3В

а.



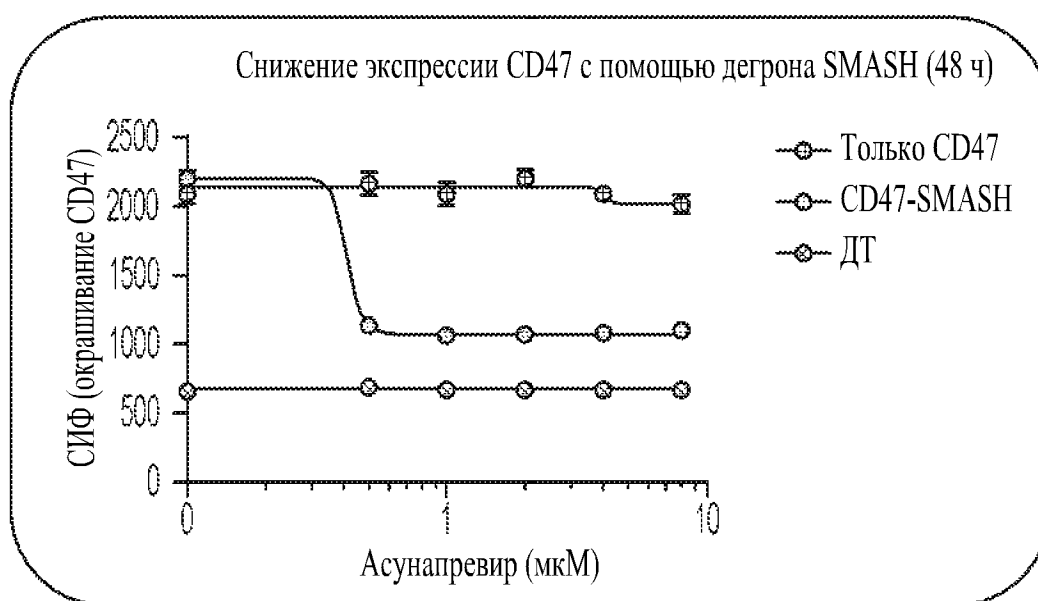
б.



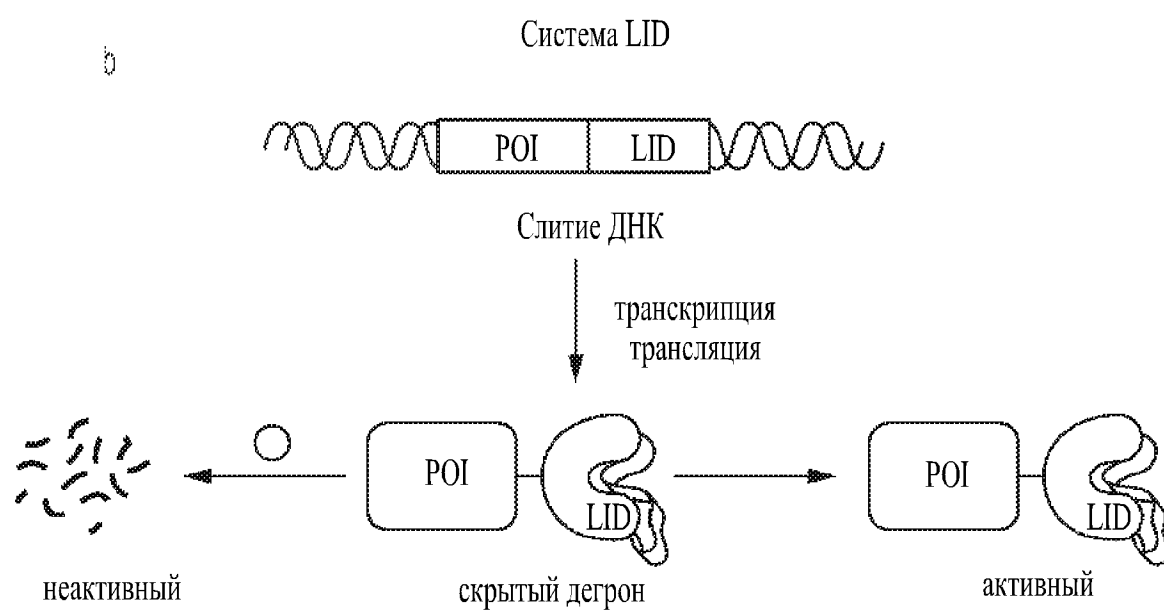
Фиг. 4



LTR-LTR: 4758 п.о.



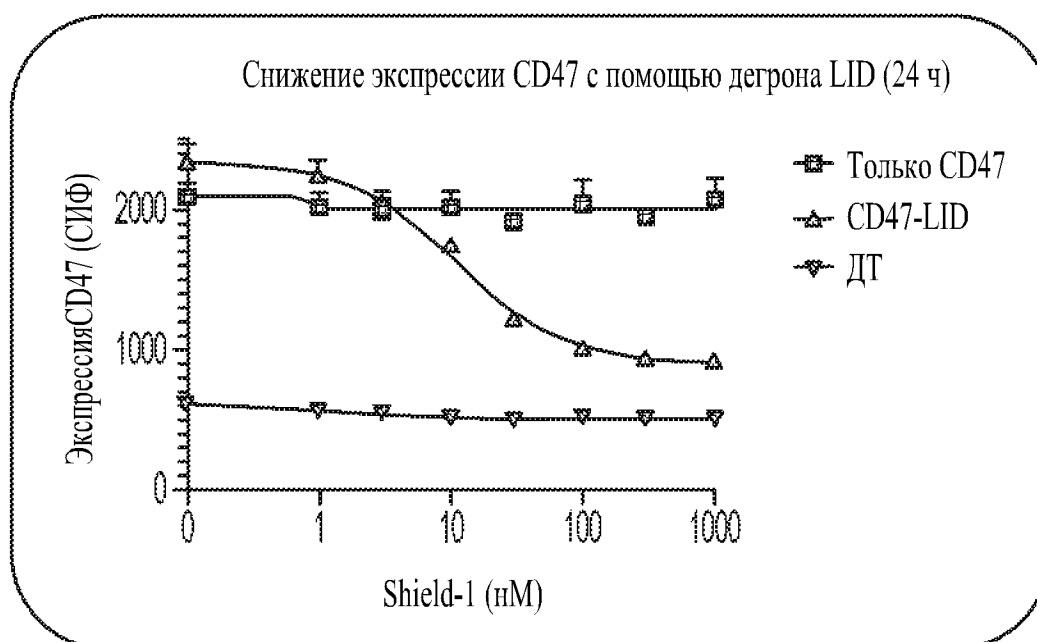
Фиг. 5



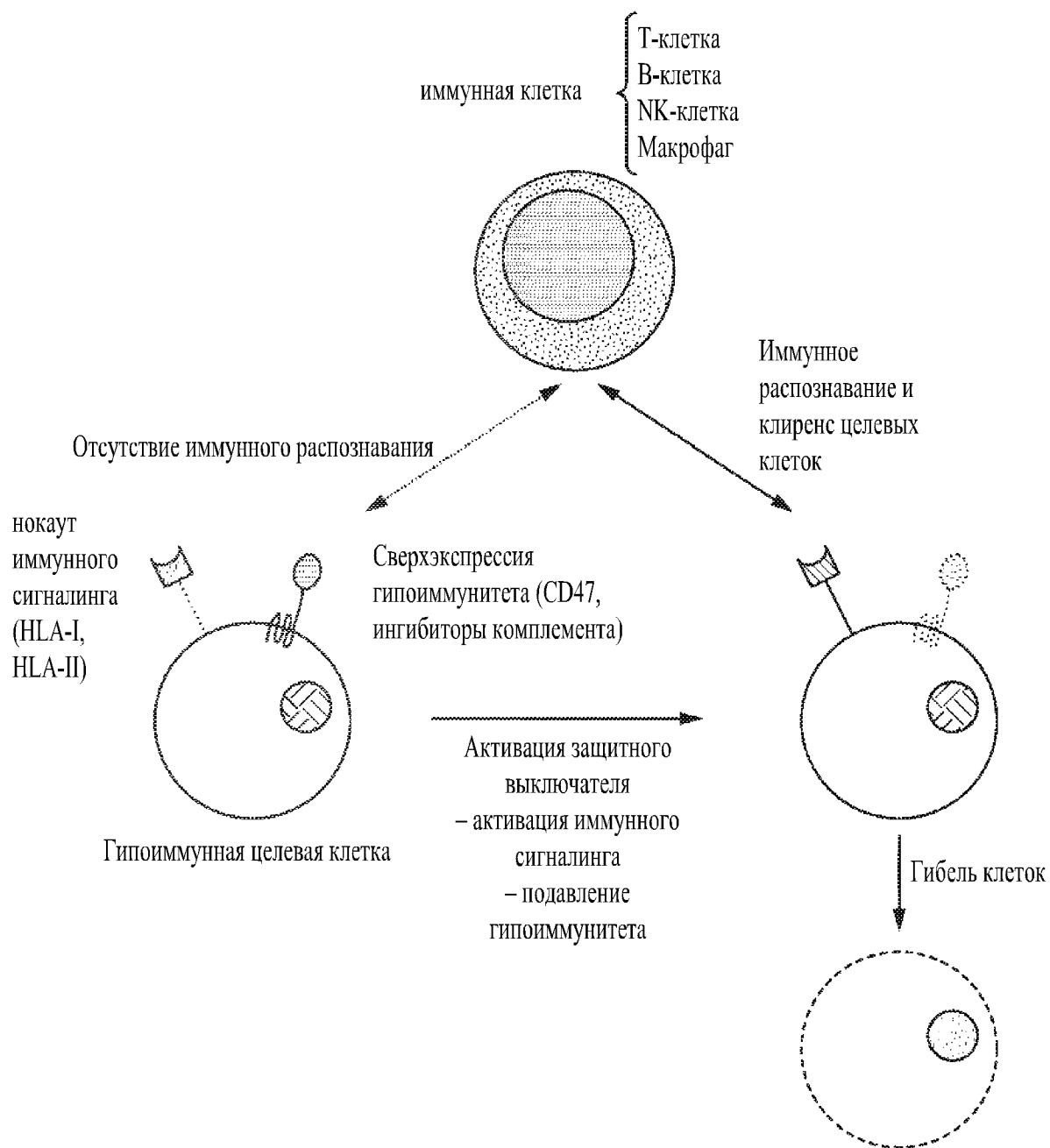
Фиг. 6



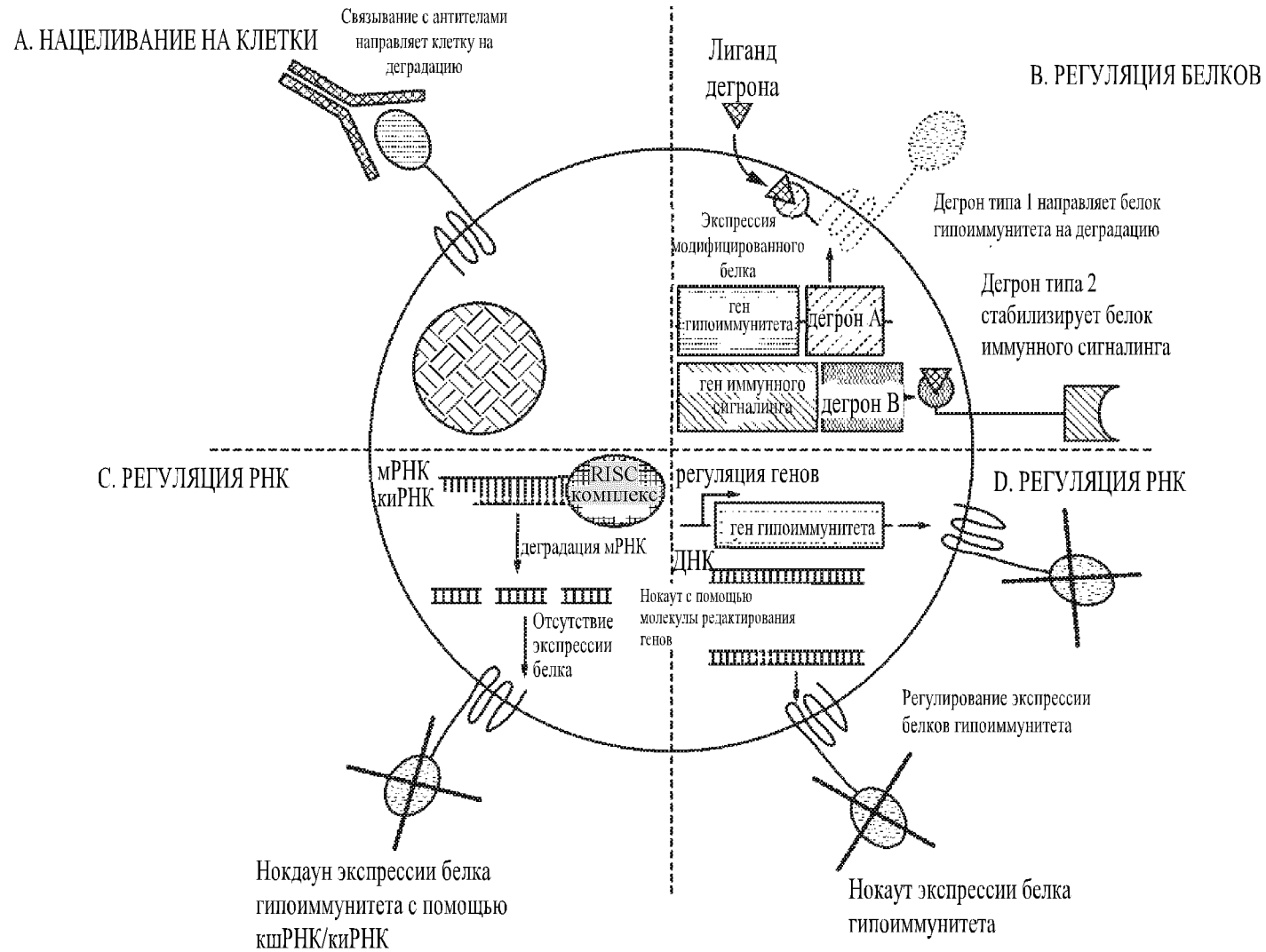
LTR-LTR: 4230 п.о.



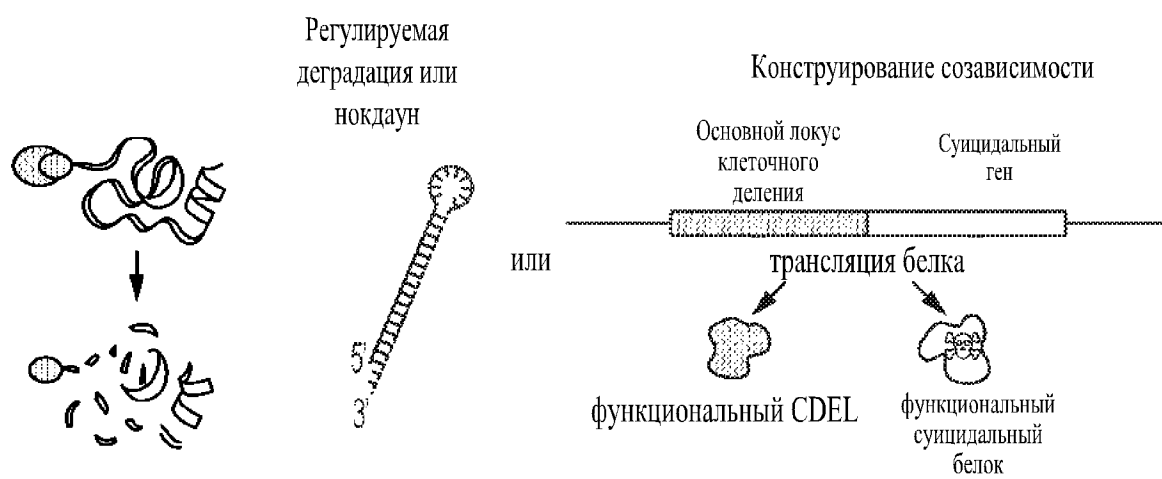
Фиг. 7



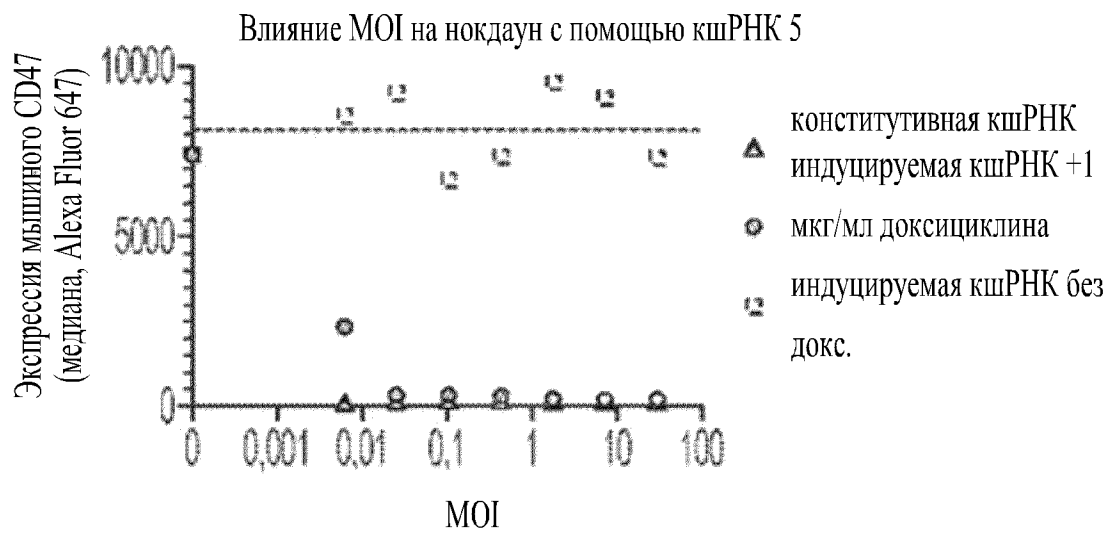
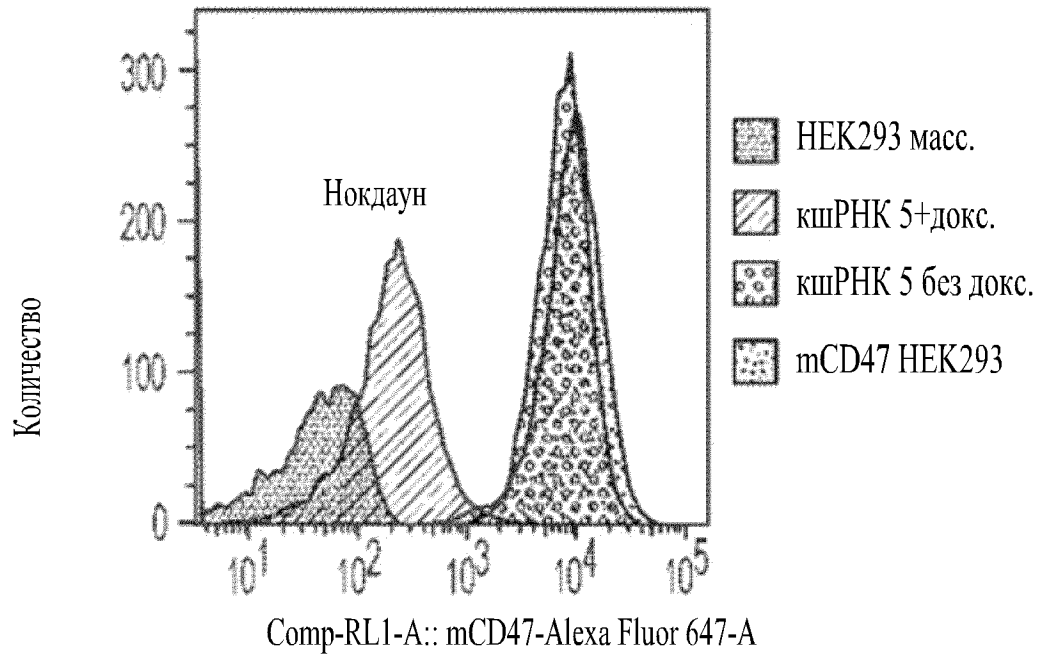
Фиг. 8А, 8В, 8С и 8D



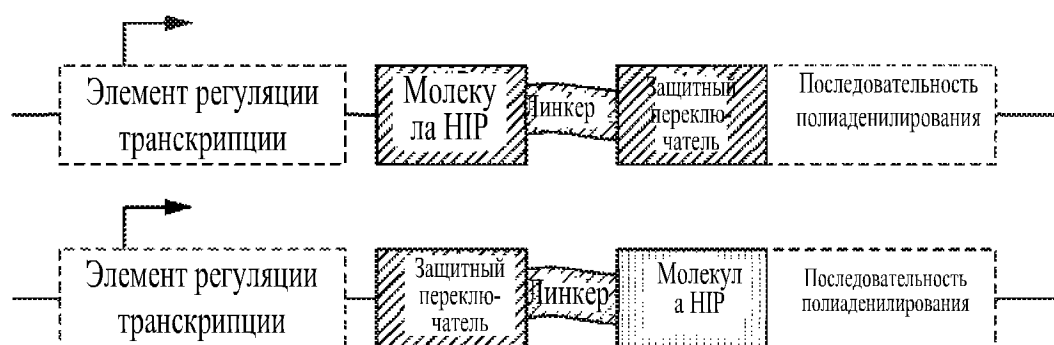
Фиг. 9



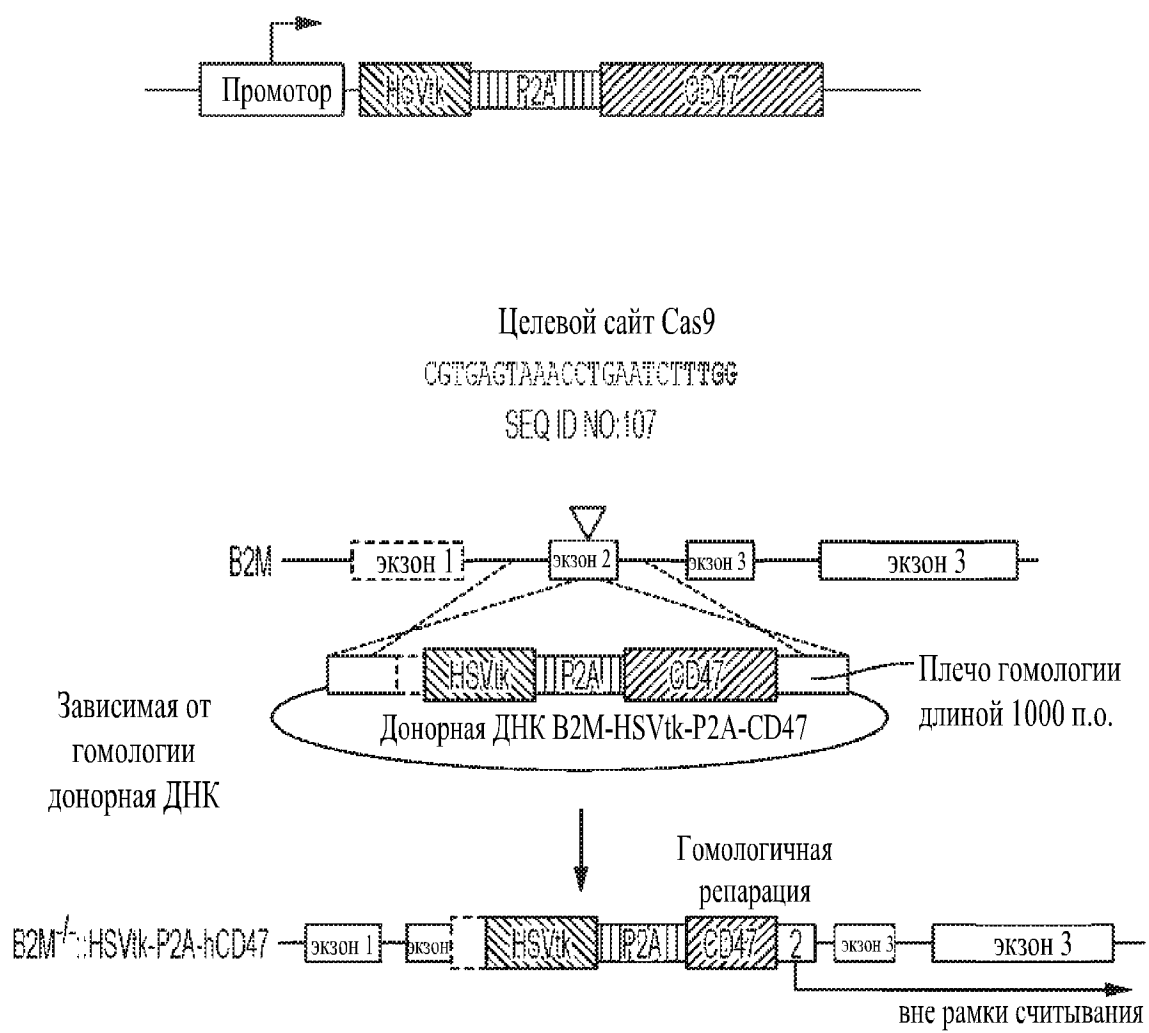
Фиг. 10



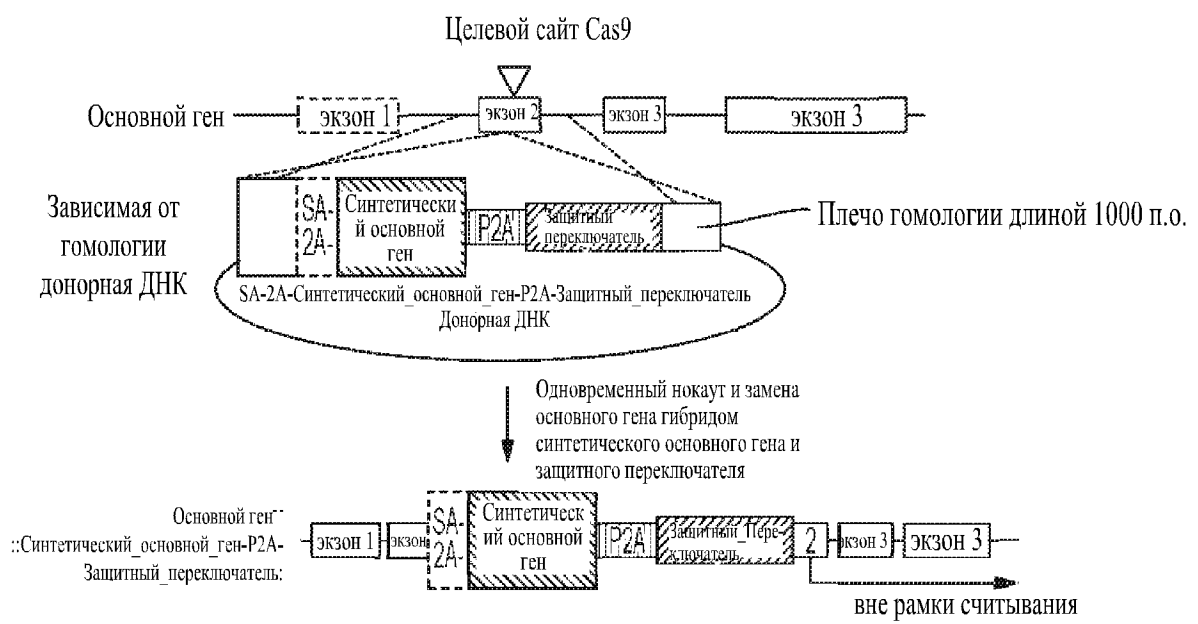
Фиг. 11



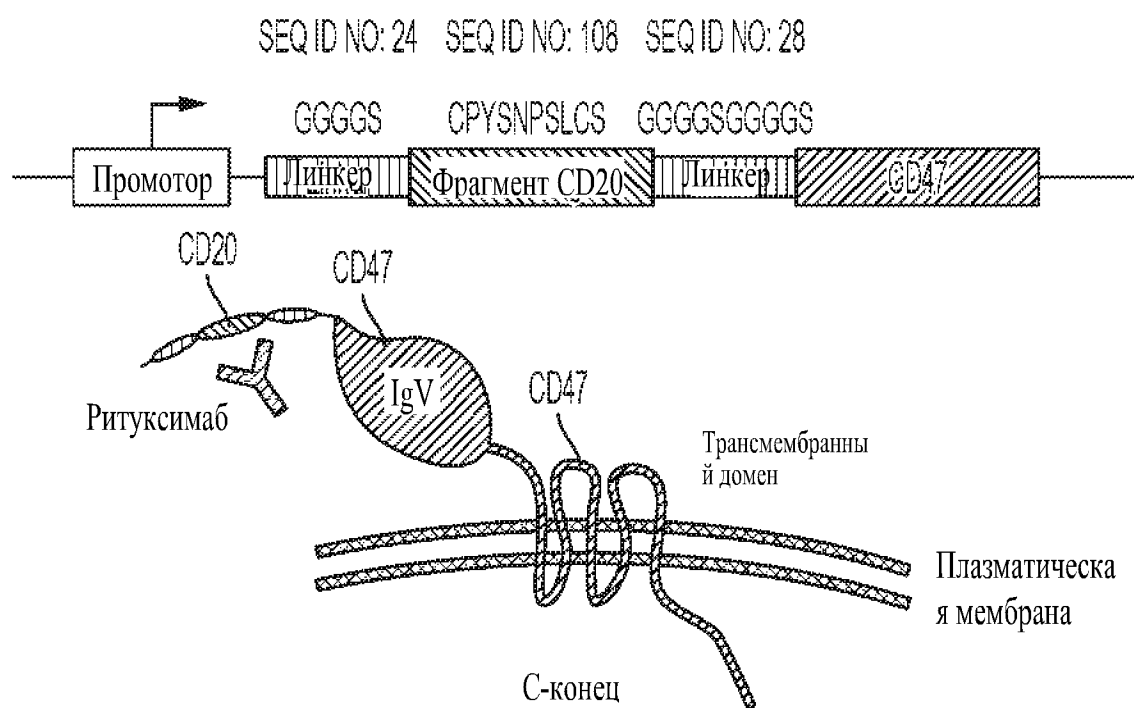
Фиг. 12



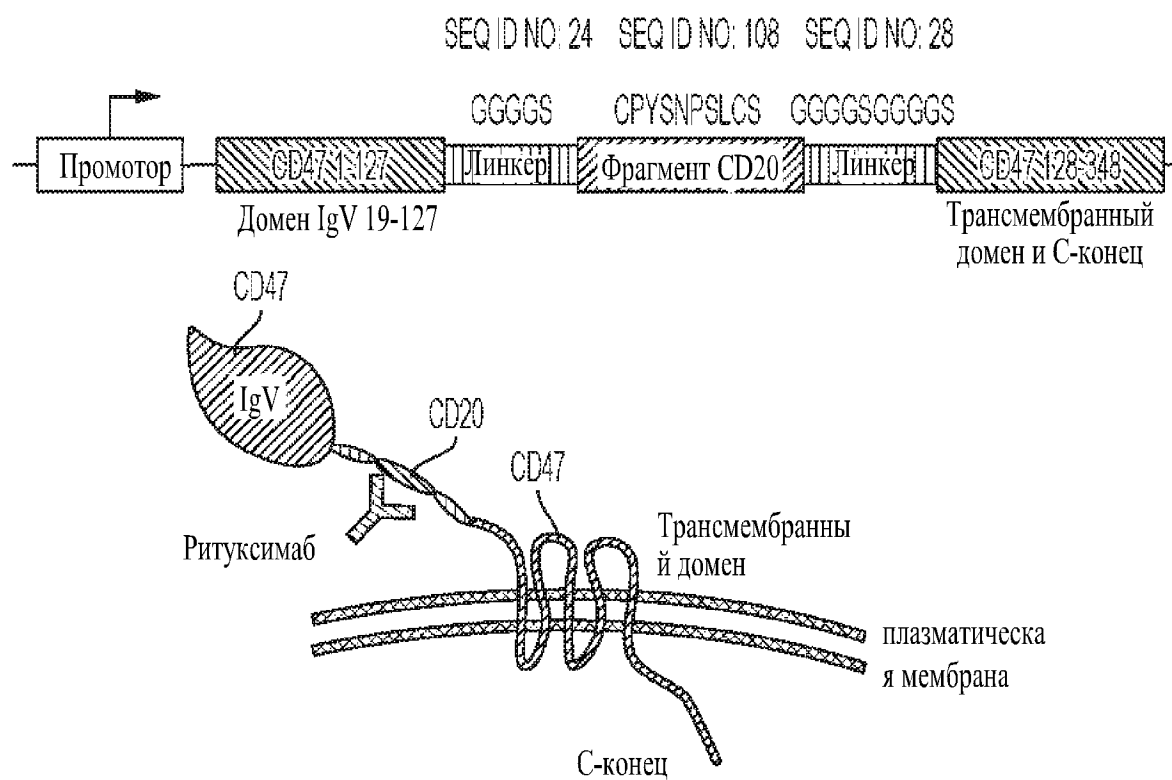
Фиг. 13



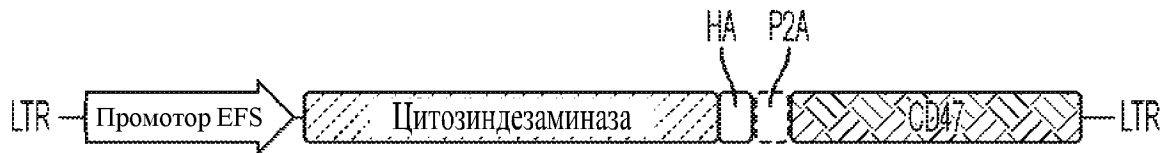
Фиг. 14



Фиг. 15

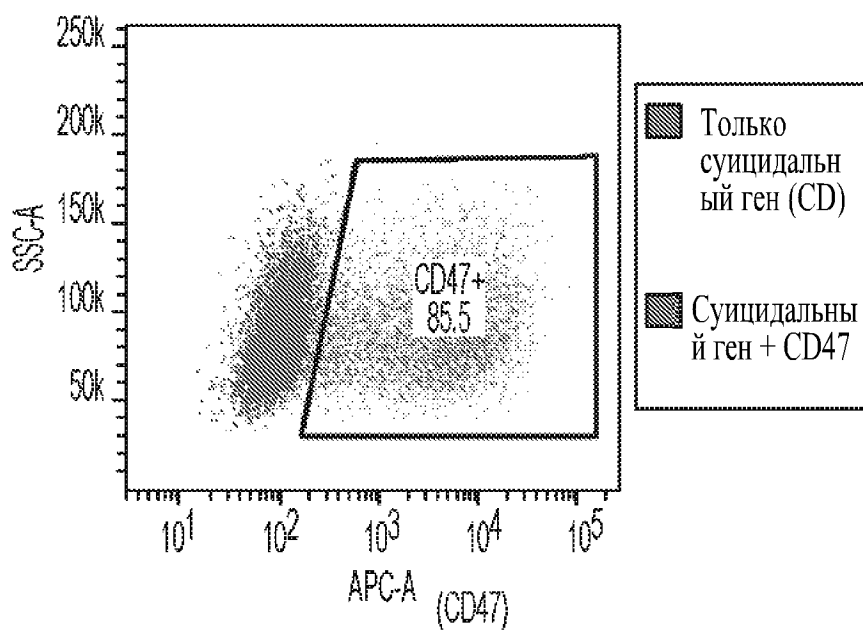
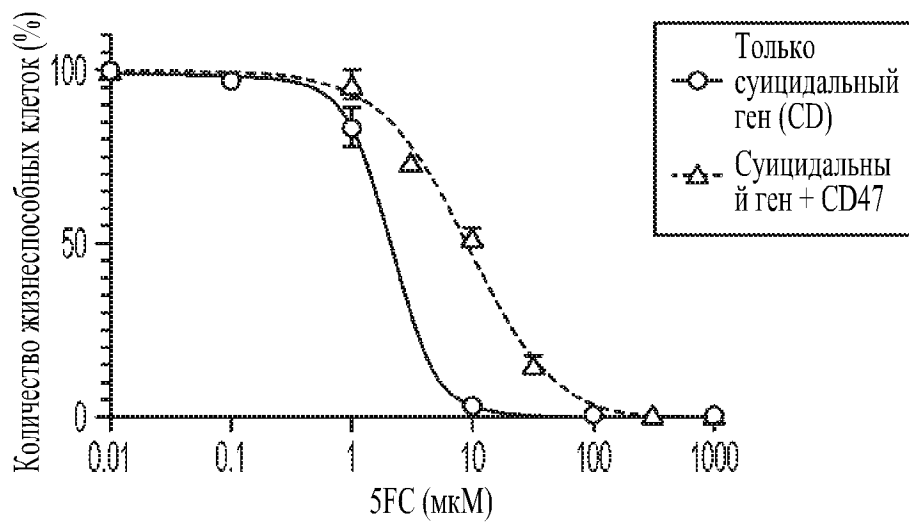


Фиг. 16



LTR-LTR: 5097 п.о.

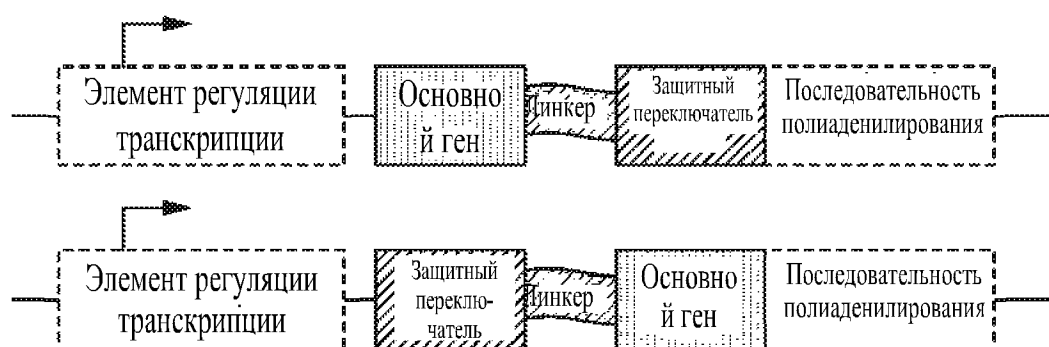
Кривая уничтожения иПСК человека для цитозиндезаминазы



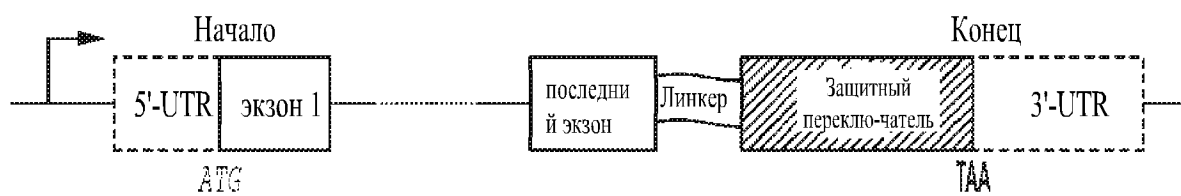
Фиг. 17



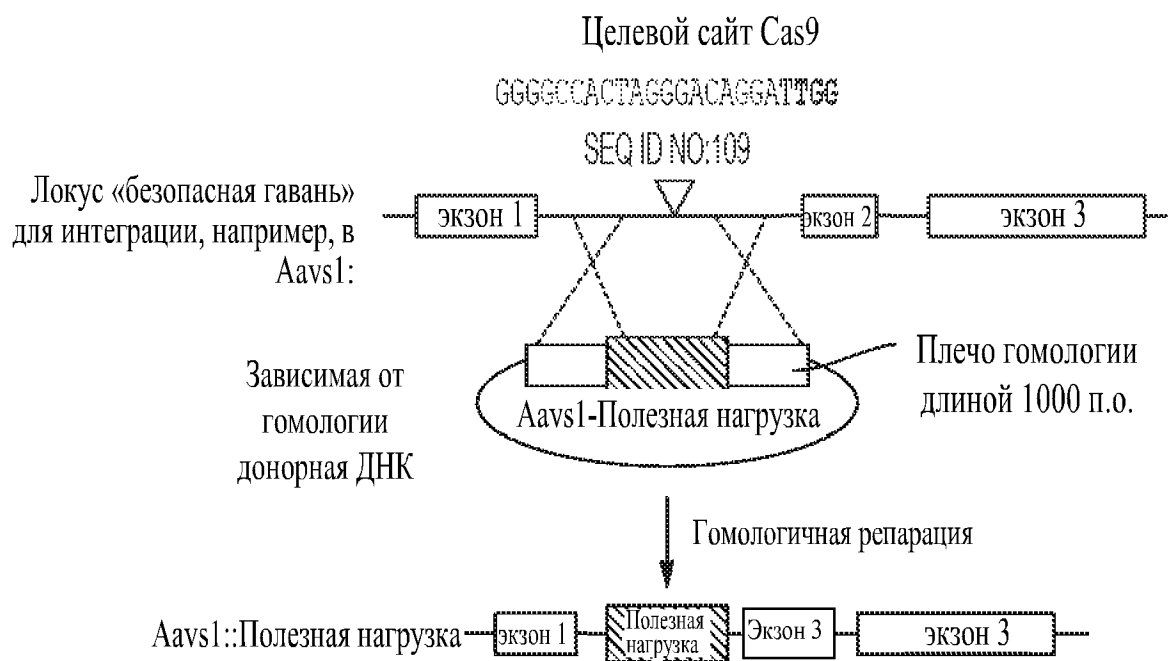
Фиг. 18



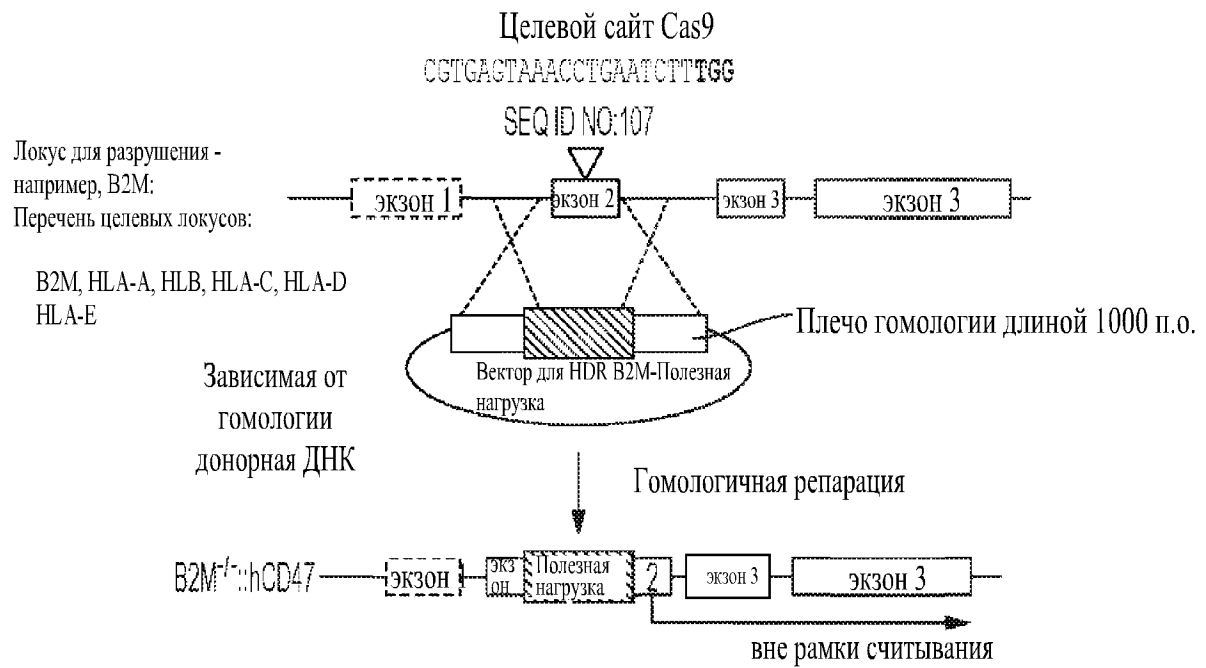
Фиг. 19



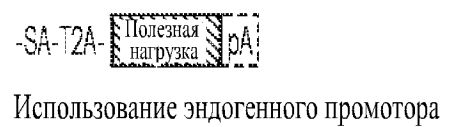
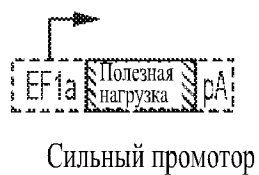
Фиг. 20



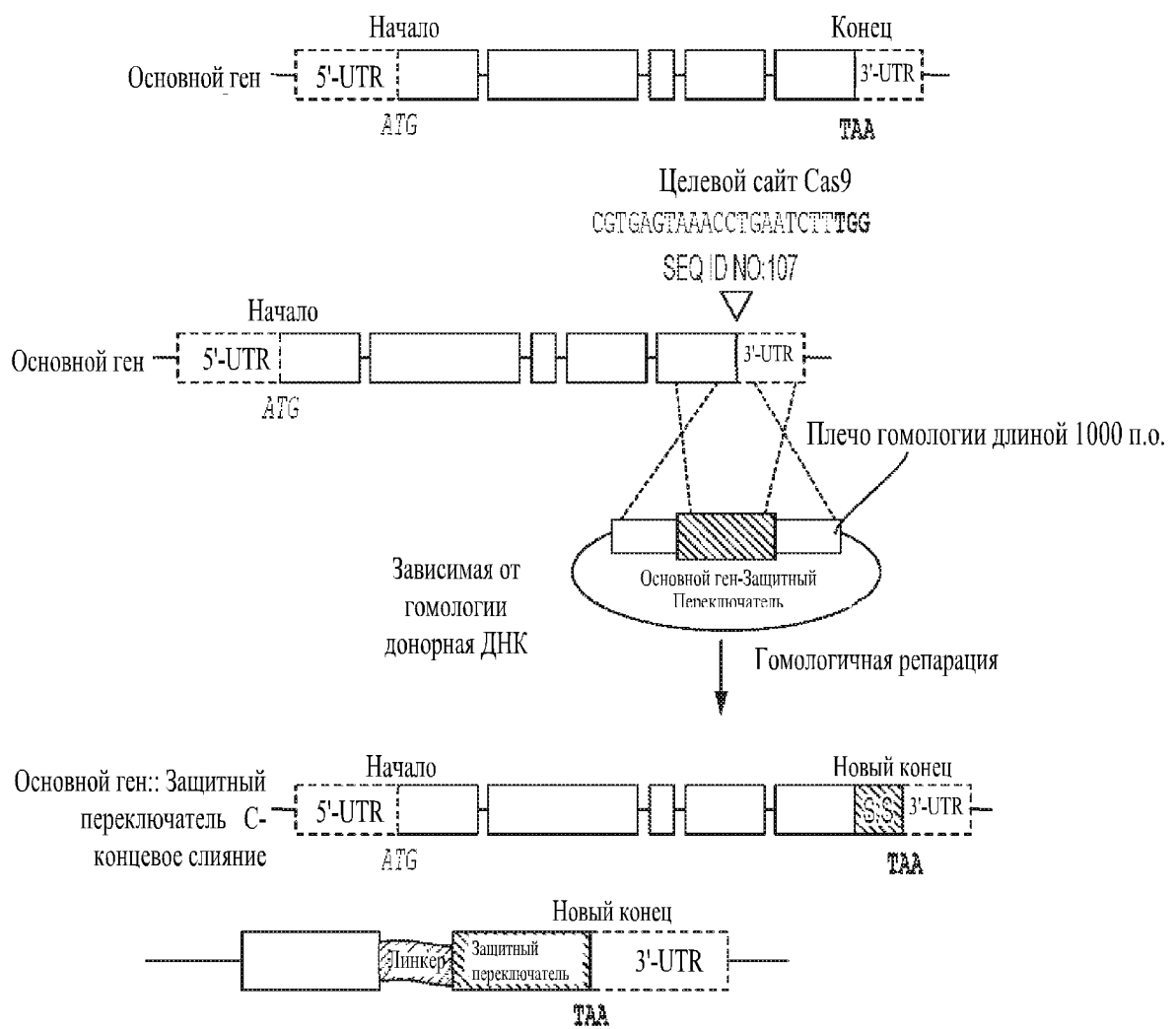
Фиг. 21



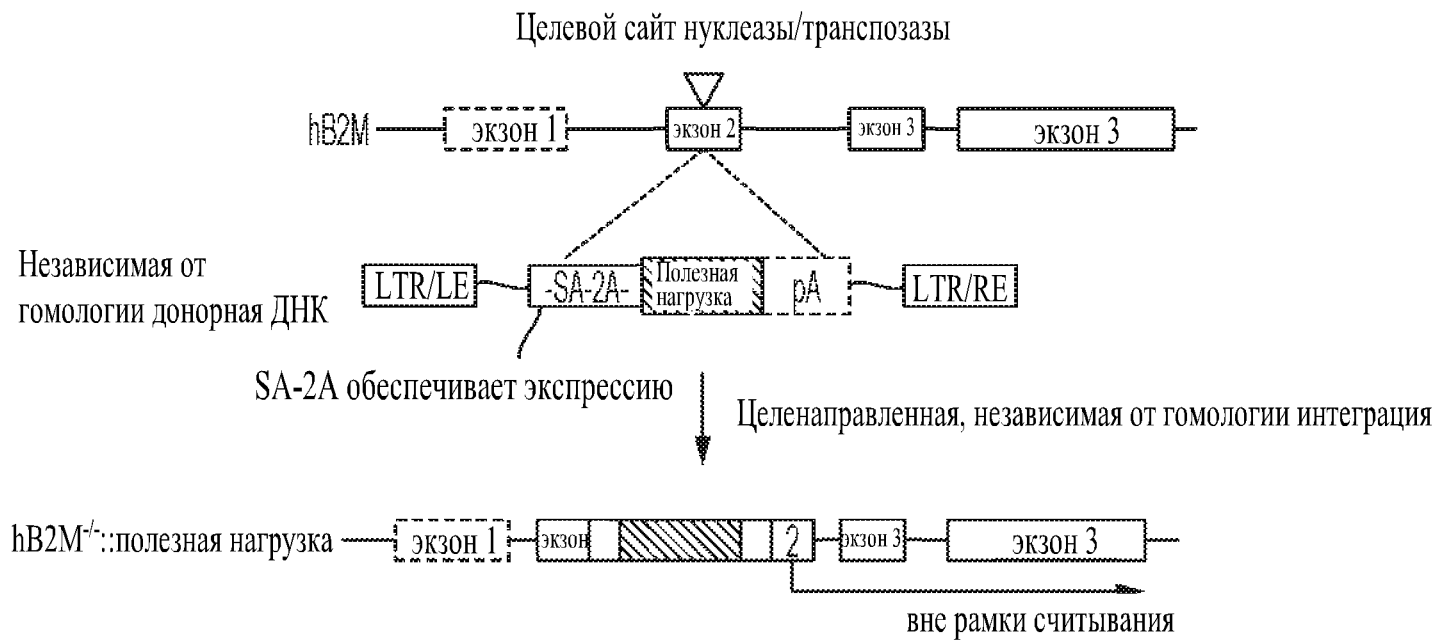
Примеры использования донорных ДНК: регуляция экспрессии



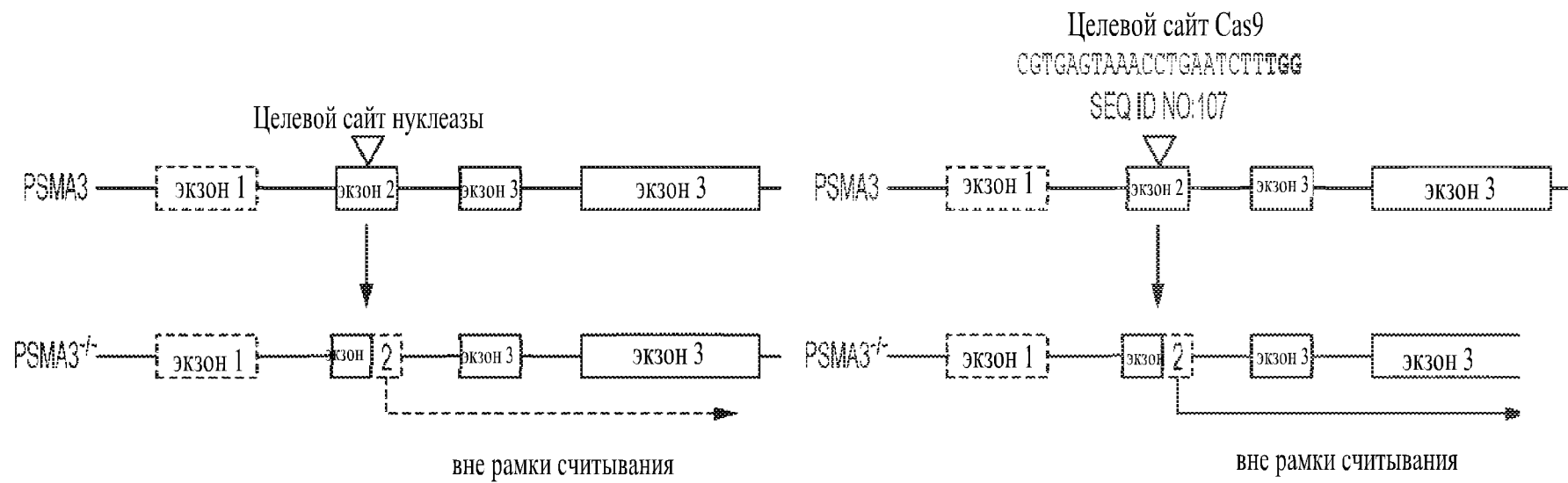
Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25

