(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202293107 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.20

(22) Дата подачи заявки
2021.04.27

(51) Int. Cl. ***C12N 5/0783*** (2010.01)
C07K 14/725 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(54) ПОВТОРНОЕ ВВЕДЕНИЕ ДОЗ ГИПОИММУНОГЕННЫХ КЛЕТОК

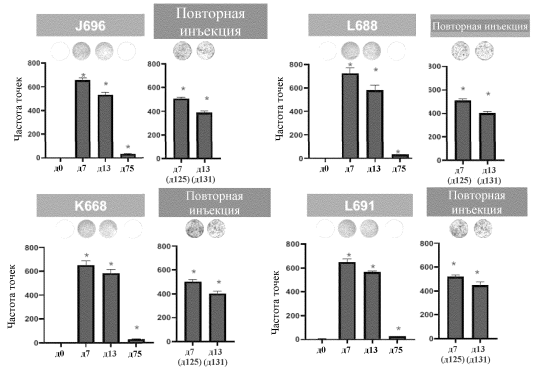
(31) **63/016,190; 63/052,360**
(32) **2020.04.27; 2020.07.15**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/029443**
(87) **WO 2021/222285 2021.11.04**
(88) **2021.12.09**

(71) Заявитель:
САНА БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Шрепфер Соня (US)

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

(57) В изобретении описаны способы лечения расстройства у пациента путем введения клеток, ускользающих от иммунитета. В некоторых вариантах осуществления пациент получает более одного введения таких клеток. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки имеют сниженные уровни или сниженную активность лейкоцитарных антигенов человека ГКГС I и/или ГКГС II. В некоторых вариантах осуществления клетки получены из первичных Т-клеток или плюрипотентных стволовых клеток, которые ускользают от иммунного распознавания. В некоторых вариантах осуществления клетки содержат химерный антигенный рецептор.



202293107 A1

202293107 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576298EA/081

ПОВТОРНОЕ ВВЕДЕНИЕ ДОЗ ГИПОИММУНОГЕННЫХ КЛЕТОК

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Эта заявка заявляет приоритет по 35 U.S.C. § 119(e) по предварительным заявкам США №№ 63/016190, поданной 27 апреля 2020 г., и 63/052360, поданной 15 июля 2020 г., описание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Регенеративная клеточная терапия является важным потенциальным вариантом лечения для регенерации поврежденных органов и тканей. С учетом низкой доступности органов для трансплантации и сопутствующего долгого ожидания возможность регенерации тканей путем трансплантации пациентам легко доступных клеточных линий очевидно является привлекательной. Регенеративная клеточная терапия продемонстрировала перспективные первые результаты для реабилитации поврежденных тканей после трансплантации в животных моделях (например, после инфаркта миокарда). Однако способность иммунной системы реципиента трансплантата отторгать аллогенный материал сильно снижает потенциальную эффективность терапевтических средств и уменьшает возможные положительные эффекты, связанные с таким лечением.

Существует достаточное количество данных, полученных как для животных моделей, так и для пациентов-людей, подтверждающих, что трансплантация гипоиммуногенных клеток является научно реализуемым и клинически перспективным подходом к лечению многочисленных расстройств и состояний.

Остается потребность в новых подходах, композициях и способах получения клеточных терапевтических средств, которые могут избегать выявления иммунной системой реципиента.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения расстройства у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II, причем ранее пациенту ввели начальную популяцию таких гипоиммуногенных клеток.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки имеют сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и класса II. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки экспрессируют экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки экспрессируют экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки представляют собой дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток. В

некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из кардиомиоцитов, нейральных клеток, эндотелиальных клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы и Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки включают клетки, полученные из первичных Т-клеток. В определенных вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, получены из пула Т-клеток, содержащего первичные Т-клетки от одного или более (например, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, десяти или более, двадцати или более, пятидесяти или более или ста или более) субъектов, отличных от пациента.

В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор (CAR) выбран из группы, состоящей из: (a) CAR первого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен; (b) CAR второго поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена; (c) CAR третьего поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и (d) CAR четвертого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из: (a) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки; (b) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для Т-клетки; (c) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства; (d) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток; (e) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и (f) антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающих части или фрагмента, scFv и Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22 или BCMA. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой анти-CD19 scFv, такой как, но без ограничения этим, FMC63.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранной области TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε,

CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34, CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и их функционального варианта.

В некоторых вариантах осуществления сигнальный(е) домен(ы) включает(ют) костимулирующий(е) домен(ы). В определенных вариантах осуществления сигнальный домен включает костимулирующий домен. В других вариантах осуществления сигнальные домены включают костимулирующие домены. В некоторых случаях CAR содержит два или более костимулирующих доменов, причем два костимулирующих домена не являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления костимулирующие домены включают два костимулирующих домена, которые не являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен усиливает выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления костимулирующие домены усиливают выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток. В некоторых случаях ген цитокина представляет собой эндогенный или экзогенный для гипоиммуногенных клеток ген цитокина. В некоторых случаях ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин. В некоторых вариантах осуществления провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функционального фрагмента. В некоторых вариантах осуществления домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант. В определенных вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) анти-CD19 scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) анти-CD19 scFv, анти-CD20 scFv, анти-CD22 scFv или анти-BCMA scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их

функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию белка 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4), и/или белка запрограммированной клеточной гибели (PD1).

В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных клеток вводят по меньшей мере через 3 дня или более после начального введения, необязательно по меньшей мере через 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяца или 60 месяцев или более. В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных клеток вводят по меньшей мере через 3-7 дней или более после начального введения. В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных клеток вводят по меньшей мере через 1 месяц или более после начального введения. В определенных вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных клеток вводят по меньшей мере через 2 месяца или более после начального введения.

В некоторых вариантах осуществления после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень иммунной активации или не вызывает иммунную активацию у пациента. В некоторых вариантах осуществления после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень системной активации TH1 или не вызывает системную активацию TH1 у пациента. В некоторых вариантах осуществления после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень иммунной активации мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) или не вызывает иммунную активацию МКПК у пациента. В некоторых вариантах осуществления после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает появление сниженного уровня донор-специфических антител IgG или не вызывает появления донор-специфических антител IgG против гипоиммуногенных клеток у пациента. В некоторых вариантах осуществления после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень выработки антител IgM и IgG или не вызывает выработку антител IgM и IgG против гипоиммуногенных клеток у пациента. В некоторых вариантах осуществления после введения популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень уничтожения цитотоксическими Т-клетками или не вызывает уничтожения цитотоксическими Т-клетками гипоиммуногенных клеток у пациента.

В некоторых вариантах осуществления популяция гипоиммуногенных клеток от начального введения более не присутствует в организме пациента при последующем введении.

В некоторых вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент в интервале по меньшей мере 3 дней или более до или после начального ведения популяции гипоиммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент в интервале по меньшей мере 3 дней или более до или после последующего ведения популяции гипоиммуногенных клеток.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка выбрана из группы, состоящей из плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, Т-клетки, дифференцированной из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, первичной Т-клетки и клетки, полученной из первичной Т-клетки, и гипоиммуногенная клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, содержащую экзогенные полипептиды CD47 и, необязательно, CAR.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения расстройства у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективных количеств популяции гипоиммуногенных клеток в рамках схемы введения, включающей первое введение, период восстановления и второе введение, причем гипоиммуногенные клетки содержат экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки дополнительно имеют сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и II. В определенных вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки экспрессируют экзогенный полипептид CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA. В других вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки экспрессируют экзогенный полипептид CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки представляют собой дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. В определенных вариантах осуществления дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из кардиомиоцитов, нейральных клеток, эндотелиальных клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы и Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки включают клетки, полученные из первичных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки включают клетки, полученные из первичных Т-клеток. В определенных вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, получены из пула Т-клеток, содержащего первичные Т-клетки от одного или более (например, двух или более, трех или более,

четырех или более, пяти или более, десяти или более, двадцати или более, пятидесяти или более или ста или более) субъектов, отличных от пациента.

В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор (CAR) выбран из группы, состоящей из: (a) CAR первого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен; (b) CAR второго поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена; (c) CAR третьего поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и (d) CAR четвертого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из: (a) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки; (b) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для Т-клетки; (c) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства; (d) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток; (e) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и (f) антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающих части или фрагмента, scFv и Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22 или BCMA. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой анти-CD19 scFv, такой как, но без ограничения этим, FMC63.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранной области TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34, CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и их функционального варианта.

В некоторых вариантах осуществления сигнальный(е) домен(ы) включает(ют) костимулирующий(е) домен(ы). В определенных вариантах осуществления сигнальный домен включает костимулирующий домен. В других вариантах осуществления сигнальные домены включают костимулирующие домены. В некоторых случаях CAR содержит два или более костимулирующих доменов, причем два костимулирующих домена не являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления костимулирующие домены включают два костимулирующих домена, которые не

являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен усиливает выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления костимулирующие домены усиливают выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток. В некоторых случаях ген цитокина представляет собой эндогенный или экзогенный для гипоиммуногенных клеток ген цитокина. В некоторых случаях ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин. В некоторых вариантах осуществления провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функционального фрагмента. В некоторых вариантах осуществления домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант. В определенных вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) анти-CD19 scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) анти-CD19 scFv, анти-CD20 scFv, анти-CD22 scFv или анти-BCMA scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию белка 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4), и/или белка запрограммированной клеточной гибели (PD1).

В некоторых вариантах осуществления период восстановления составляет по меньшей мере 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13

недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяца или 60 месяцев или более. В некоторых вариантах осуществления период восстановления составляет от по меньшей мере 3 дней до по меньшей мере 7 дней или более. В некоторых вариантах осуществления период восстановления составляет по меньшей мере 1 месяц или более. В некоторых вариантах осуществления период восстановления составляет по меньшей мере 2 месяца или более.

В некоторых вариантах осуществления второе введение начинают, когда у пациента более не выявляется популяция гипоиммуногенных клеток от первого введения.

В некоторых вариантах осуществления после первого и/или второго введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень иммунной активации или не вызывает иммунную активацию у пациента. В некоторых вариантах осуществления после первого и/или второго введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень системной активации TH1 или не вызывает системную активацию TH1 у пациента. В некоторых вариантах осуществления после первого и/или второго введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень иммунной активации мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) или не вызывает иммунную активацию МКПК у пациента. В некоторых вариантах осуществления после первого и/или второго введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает появление сниженного уровня донор-специфических антител IgG или не вызывает появления донор-специфических антител IgG против гипоиммуногенных клеток у пациента. В некоторых вариантах осуществления после первого и/или второго введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень выработки антител IgM и IgG или не вызывает выработку антител IgM и IgG против гипоиммуногенных клеток у пациента. В некоторых вариантах осуществления после первого и/или второго введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень уничтожения цитотоксическими Т-клетками или не вызывает уничтожения цитотоксическими Т-клетками гипоиммуногенных клеток у пациента.

В некоторых вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент в интервале по меньшей мере 3 дней или более до или после первого ведения популяции гипоиммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент в интервале по меньшей мере 3 дней или более до или после второго ведения популяции гипоиммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент во время периода восстановления.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка выбрана из группы, состоящей из плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, Т-клетки, дифференцированной из индуцированной

плюрипотентной стволовой клетки, первичной Т-клетки и клетки, полученной из первичной Т-клетки, и гипоиммуногенная клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, содержащую экзогенные полипептиды CD47 и, необязательно, CAR.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения расстройства у пациента путем введения клеток, которые не инициируют системный острый клеточный иммунный ответ у пациента, при этом способ включает: (a) введение пациенту терапевтически эффективного количества первой популяции клеток и (b) введение пациенту терапевтически эффективного количества второй популяции клеток после периода восстановления после этапа (a), причем клетки первой и второй популяций клеток содержат экзогенные полипептиды CD47 имеют сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II, и при этом период восстановления составляет по меньшей мере 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяца или 60 месяцев или более.

В некоторых вариантах осуществления клетки первой и второй популяций имеют сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и ГКГС класса II. В некоторых вариантах осуществления клетки первой и второй популяций экспрессируют экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA. В некоторых вариантах осуществления клетки первой и второй популяций экспрессируют экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA.

В некоторых вариантах осуществления первая и вторая популяции клеток содержат дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток. Во многих вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. В одном варианте осуществления дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из кардиомиоцитов, нейральных клеток, эндотелиальных клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы и Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления первая и вторая популяции клеток содержат клетки, полученные из первичных Т-клеток. В определенных вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, получены из пула Т-клеток, содержащего первичные Т-клетки от одного или более (например, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, десяти или более, двадцати или более, пятидесяти или более или ста или более) субъектов, отличных от пациента.

В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор (CAR) выбран из группы, состоящей из: (a) CAR первого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен; (b) CAR второго поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена; (c) CAR третьего поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и (d) CAR четвертого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из: (a) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки; (b) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для Т-клетки; (c) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства; (d) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток; (e) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и (f) антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающих части или фрагмента, scFv и Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22 или BCMA. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой анти-CD19 scFv, такой как, но без ограничения этим, FMC63.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранной области TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34, CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и их функционального варианта.

В некоторых вариантах осуществления сигнальный(е) домен(ы) включает(ют) костимулирующий(е) домен(ы). В определенных вариантах осуществления сигнальный домен включает костимулирующий домен. В других вариантах осуществления сигнальные домены включают костимулирующие домены. В некоторых случаях CAR содержит два или более костимулирующих доменов, причем два костимулирующих домена не являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления костимулирующие домены включают два костимулирующих домена, которые не являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен усиливает выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления костимулирующие домены усиливают выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-

клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток. В некоторых случаях ген цитокина представляет собой эндогенный или экзогенный для гипоиммуногенных клеток ген цитокина. В некоторых случаях ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин. В некоторых вариантах осуществления провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функционального фрагмента. В некоторых вариантах осуществления домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант. В определенных вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) анти-CD19 scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) анти-CD19 scFv, анти-CD20 scFv, анти-CD22 scFv или анти-BCMA scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию белка 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4), и/или белка запрограммированной клеточной гибели (PD1).

В некоторых вариантах осуществления период восстановления составляет по меньшей мере 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяца или 60 месяцев или более. В некоторых вариантах осуществления период восстановления составляет по меньшей мере

2 месяца или более. В некоторых вариантах осуществления этап (b) проводят, когда у пациента более не выявляется первая популяция клеток.

В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая популяция клеток вызывает сниженный уровень иммунной активации или не вызывает иммунную активацию у пациента. В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая популяция клеток вызывает сниженный уровень системной активации TH1 или не вызывает системную активацию TH1 у пациента. В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая популяция клеток вызывает сниженный уровень иммунной активации мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) или не вызывает иммунную активацию МКПК у пациента. В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая популяция клеток вызывает появление сниженного уровня донор-специфических антител IgG или не вызывает появления донор-специфических антител IgG против гипоиммуногенных клеток у пациента. В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая популяция клеток вызывает сниженный уровень выработки антител IgM и IgG или не вызывает выработку антител IgM и IgG против гипоиммуногенных клеток у пациента. В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая популяция клеток вызывает сниженный уровень уничтожения цитотоксическими Т-клетками или не вызывает уничтожения цитотоксическими Т-клетками гипоиммуногенных клеток у пациента.

В некоторых вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент в интервале по меньшей мере 3 дней или более до или после ведения первой популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент в интервале по меньшей мере 3 дней или более до или после ведения второй популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент во время периода восстановления.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка выбрана из группы, состоящей из плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, Т-клетки, дифференцированной из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, первичной Т-клетки и клетки, полученной из первичной Т-клетки, и гипоиммуногенная клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, содержащую экзогенные полипептиды CD47 и, необязательно, CAR.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении описано применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II, для лечения расстройства у пациента, при этом пациент ранее получил начальную популяцию таких гипоиммуногенных клеток.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении описано применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и класса II, для лечения расстройства у пациента, при этом пациент ранее получил

начальную популяцию таких гипоиммуногенных клеток.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении описано применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженные уровни полипептидов B2M и CIITA, для лечения расстройства у пациента, при этом пациент ранее получил начальную популяцию таких гипоиммуногенных клеток.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении описано применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47, геномную модификацию гена B2M и геномную модификацию гена CIITA, для лечения расстройства у пациента, при этом пациент ранее получил начальную популяцию таких гипоиммуногенных клеток.

В некоторых вариантах осуществления популяция гипоиммуногенных клеток содержит дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из кардиомиоцитов, нейральных клеток, эндотелиальных клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы и Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток. В определенных вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, получены из пула Т-клеток, содержащего первичные Т-клетки от одного или более (например, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, десяти или более, двадцати или более, пятидесяти или более или ста или более) субъектов, отличных от пациента.

В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор (CAR) выбран из группы, состоящей из: (a) CAR первого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен; (b) CAR второго поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена; (c) CAR третьего поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и (d) CAR четвертого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из: (a) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки; (b) антигенсвязывающего домена, который

нацелен на антиген, характерный для Т-клетки; (c) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства; (d) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток; (e) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и (f) антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающих части или фрагмента, scFv и Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22 или BCMA. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой анти-CD19 scFv, такой как, но без ограничения этим, FMC63.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранной области TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34, CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и их функционального варианта.

В некоторых вариантах осуществления сигнальный(е) домен(ы) включает(ют) костимулирующий(е) домен(ы). В определенных вариантах осуществления сигнальный домен включает костимулирующий домен. В других вариантах осуществления сигнальные домены включают костимулирующие домены. В некоторых случаях CAR содержит два или более костимулирующих доменов, причем два костимулирующих домена не являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления костимулирующие домены включают два костимулирующих домена, которые не являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен усиливает выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления костимулирующие домены усиливают выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток. В некоторых случаях ген цитокина представляет собой эндогенный или экзогенный для гипоиммуногенных клеток ген цитокина. В некоторых случаях ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин. В некоторых вариантах осуществления провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функционального фрагмента. В некоторых вариантах осуществления домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный

вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант. В определенных вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) анти-CD19 scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) анти-CD19 scFv, анти-CD20 scFv, анти-CD22 scFv или анти-BCMA scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию белка 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4), и/или белка запрограммированной клеточной гибели (PD1).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем химерный антигенный рецептор (CAR) выбран из группы, состоящей из: (a) CAR первого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен; (b) CAR второго поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена; (c) CAR третьего поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и (d) CAR четвертого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из: (a) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки; (b) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для Т-клетки; (c) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства; (d) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для стареющих

клеток; (e) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и (f) антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающей части, scFv и Fab.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22 или BCMA.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем трансмембранный домен включает домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранной области TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34, CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и их функционального варианта.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем сигнальный(е) домен(ы) включает(ют) костимулирующий(е) домен(ы). В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем костимулирующие домены включают два костимулирующих домена, которые не являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем костимулирующий(е) домен(ы) усиливает(ют) выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем ген цитокина представляет собой эндогенный или экзогенный для гипоиммуногенных клеток ген цитокина. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функционального фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена

цитокина, включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем CAR содержит (i) анти-CD19 scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, причем гипоиммуногенная клетка выбрана из группы, состоящей из плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, Т-клетки, дифференцированной из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, первичной Т-клетки и клетки, полученной из первичной Т-клетки, и гипоиммуногенная клетка содержит экзогенный CD47 и/или, необязательно, CAR, и при этом гипоиммуногенная клетка необязательно представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$ и/или необязательно клетку $CIITA^{индел/индел}$.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена популяция гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I или класса II, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена популяция гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС

класса I и класса II, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена популяция гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженные уровни полипептидов B2M и CIITA, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена популяция гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47, геномную модификацию гена B2M и геномную модификацию гена CIITA, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления популяция гипоиммуногенных клеток содержит дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из кардиомиоцитов, нейральных клеток, эндотелиальных клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы и Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток. В определенных вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, получены из пула Т-клеток, содержащего первичные Т-клетки от одного или более (например, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, десяти или более, двадцати или более, пятидесяти или более или ста или более) субъектов, отличных от пациента.

В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор (CAR) выбран из группы, состоящей из: (a) CAR первого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен; (b) CAR второго поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена; (c) CAR третьего поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и (d) CAR четвертого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из: (a) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки; (b) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для Т-клетки; (c) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства;

(d) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток; (e) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и (f) антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающих части или фрагмента, scFv и Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22 или BCMA. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой анти-CD19 scFv, такой как, но без ограничения этим, FMC63.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранной области TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34, CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и их функционального варианта.

В некоторых вариантах осуществления сигнальный(е) домен(ы) включает(ют) костимулирующий(е) домен(ы). В определенных вариантах осуществления сигнальный домен включает костимулирующий домен. В других вариантах осуществления сигнальные домены включают костимулирующие домены. В некоторых случаях CAR содержит два или более костимулирующих доменов, причем два костимулирующих домена не являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления костимулирующие домены включают два костимулирующих домена, которые не являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен усиливает выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления костимулирующие домены усиливают выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток. В некоторых случаях ген цитокина представляет собой эндогенный или экзогенный для гипоиммуногенных клеток ген цитокина. В некоторых случаях ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин. В некоторых вариантах осуществления провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функционального фрагмента. В некоторых вариантах осуществления домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный

тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант. В определенных вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) анти-CD19 scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) анти-CD19 scFv, анти-CD20 scFv, анти-CD22 scFv или анти-BCMA scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию белка 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4), и/или белка запрограммированной клеточной гибели (PD1).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и класса II, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженные уровни полипептидов B2M и CIITA, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47, геномную модификацию гена B2M и геномную модификацию гена CIITA, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления популяция гипоиммуногенных клеток содержит любые такие клетки, описанные в данном документе. В некоторых вариантах

осуществления популяция гипоиммуногенных клеток предназначена для применения в лечении расстройства у пациента, причем пациент ранее получил начальную популяцию таких гипоиммуногенных клеток.

В некоторых вариантах осуществления популяции гипоиммуногенных клеток гипоиммуногенная клетка или клетки выбраны из группы, состоящей из плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, Т-клетки, дифференцированной из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, первичной Т-клетки и клетки, полученной из первичной Т-клетки, и гипоиммуногенная клетка содержит экзогенный CD47 и/или, необязательно, CAR, и при этом клетка или клетки необязательно представляют собой клетку $B2M^{индел/индел}$ и/или необязательно клетку $CIITA^{индел/индел}$.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и класса II, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженные уровни полипептидов B2M и CIITA, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47, геномную модификацию гена B2M и геномную модификацию гена CIITA, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, причем клетки, полученные из первичных Т-клеток, получены из пула Т-клеток, содержащего Т-клетки от одного или более субъектов, отличных от пациента.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, причем клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор (CAR).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено

применение популяции гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, причем клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, причем клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию белка 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4), и/или белка запрограммированной клеточной гибели (PD1).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем химерный антигенный рецептор (CAR) выбран из группы, состоящей из: (a) CAR первого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен; (b) CAR второго поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена; (c) CAR третьего поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и (d) CAR четвертого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из: (a) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки; (b) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для Т-клетки; (c) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства; (d) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток; (e) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и (f) антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающей части, scFv и Fab.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22 или BCMA.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем трансмембранный домен включает домен, выбранный из группы, состоящей из

трансмембранной области TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34, CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и их функционального варианта.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем сигнальный(е) домен(ы) включает(ют) костимулирующий(е) домен(ы). В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, причем костимулирующие домены включают два костимулирующих домена, которые не являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, причем костимулирующий(е) домен(ы) усиливает(ют) выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, причем ген цитокина представляет собой эндогенный или экзогенный для гипоиммуногенных клеток ген цитокина. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, причем ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функционального фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных Т-клеток, описанных в данном документе, причем домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, причем CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, причем CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, причем CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный

тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) костимулирующий домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, причем CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, причем CAR содержит (i) анти-CD19 scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) анти-CD19 scFv, анти-CD20 scFv, анти-CD22 scFv или анти-BCMA scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, для применения в лечении расстройства у пациента, причем пациент ранее получил начальную популяцию таких гипоиммуногенных клеток.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение популяции гипоиммуногенных клеток, описанных в данном документе, причем гипоиммуногенная клетка выбрана из группы, состоящей из плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, Т-клетки, дифференцированной из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, первичной Т-клетки и клетки, полученной из первичной Т-клетки, и гипоиммуногенная клетка содержит экзогенный CD47 и/или, необязательно, CAR, и при этом гипоиммуногенная клетка необязательно представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$ и/или необязательно клетку $CIITA^{индел/индел}$.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения расстройства у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества популяции гипоиммуногенных Т-клеток, полученных из первичных Т-клеток, которые содержат экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II, причем ранее пациенту ввели начальную популяцию таких гипоиммуногенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения расстройства у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества популяции гипоиммуногенных Т-клеток, полученных из

первичных Т-клеток, которые содержат экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II, причем ранее пациенту ввели начальную популяцию таких гипоиммуногенных Т-клеток или начальную популяцию гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные Т-клетки имеют сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и класса II.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные Т-клетки экспрессируют экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные Т-клетки экспрессируют экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные Т-клетки содержат химерный антигенный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор (CAR) выбран из группы, состоящей из: (a) CAR первого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен; (b) CAR второго поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена; (c) CAR третьего поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и (d) CAR четвертого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из: (a) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки; (b) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для Т-клетки; (c) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства; (d) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток; (e) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и (f) антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающей части, scFv и Fab.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22 или BCMA.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранной области TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34,

CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и их функционального варианта.

В некоторых вариантах осуществления сигнальный(е) домен(ы) включает(ют) костимулирующий(е) домен(ы).

В некоторых вариантах осуществления костимулирующие домены включают два костимулирующих домена, которые не являются одинаковыми.

В некоторых вариантах осуществления костимулирующий(е) домен(ы) усиливает(ют) выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления ген цитокина представляет собой эндогенный или экзогенный для гипоиммуногенных Т-клеток ген цитокина.

В некоторых вариантах осуществления ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин.

В некоторых вариантах осуществления провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функционального фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) анти-CD19 scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) анти-CD19 scFv, анти-CD20 scFv, анти-CD22 scFv или анти-BCMA scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii)

костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные Т-клетки имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные Т-клетки имеют сниженную экспрессию белка 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4), и/или белка запрограммированной клеточной гибели (PD1).

В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных Т-клеток вводят по меньшей мере через 3 дня или более после начального введения, необязательно по меньшей мере через 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяца или 60 месяцев или более.

В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных Т-клеток вводят по меньшей мере через 3-7 дней или более после начального введения.

В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных Т-клеток вводят по меньшей мере через 1 месяц или более после начального введения.

В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных Т-клеток вводят по меньшей мере через 2 месяца или более после начального введения.

В некоторых вариантах осуществления после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных Т-клеток вызывает сниженный уровень иммунной активации или не вызывает иммунную активацию у пациента.

В некоторых вариантах осуществления после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных Т-клеток вызывает сниженный уровень системной активации TH1 или не вызывает системную активацию TH1 у пациента.

В некоторых вариантах осуществления после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных Т-клеток вызывает сниженный уровень иммунной активации мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) или не вызывает иммунную активацию МКПК у пациента.

В некоторых вариантах осуществления после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных Т-клеток вызывает появление сниженного уровня донор-специфических антител IgG или не вызывает появления донор-специфических антител IgG против гипоиммуногенных клеток у пациента.

В некоторых вариантах осуществления после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных Т-клеток вызывает сниженный уровень выработки антител IgM и IgG или не вызывает выработку антител IgM и IgG против гипоиммуногенных клеток у пациента.

В некоторых вариантах осуществления после введения популяция гипоиммуногенных Т-клеток вызывает сниженный уровень уничтожения

цитотоксическими Т-клетками или не вызывает уничтожения цитотоксическими Т-клетками гипоиммуногенных клеток у пациента.

В некоторых вариантах осуществления популяция гипоиммуногенных Т-клеток от начального введения более не присутствует в организме пациента при последующем введении.

В некоторых вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент в интервале по меньшей мере 3 дней или более до или после начального ведения популяции гипоиммуногенных клеток.

В некоторых вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент в интервале по меньшей мере 3 дней или более до или после последующего ведения популяции гипоиммуногенных клеток.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная Т-клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, содержащую экзогенные полипептиды CD47 и, необязательно, CAR.

Настоящее изобретение связано с предварительной заявкой № 63/016190, поданной 27 апреля 2020 г., и 63/052360, поданной 15 июля 2020 г., содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. Подробные описания гипоиммуногенных клеток, способов их получения и способов их применения можно найти в WO2016183041, поданной 9 мая 2015 г., WO2018132783, поданной 14 января 2018 г., WO2020018615, поданной 17 июля 2019 г., и WO2020018620, поданной 17 июля 2019 г., описания которых, включая примеры, перечни последовательностей и графические материалы, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 приведен набор изображений ELISPOT и количественный анализ по сыворотке ОЧП, которым вводили человеческие iPSC дикого типа в дни 0, 7, 13 и 75 после первой инъекции и дни 7 и 13 после повторной инъекции человеческих iPSC дикого типа. *=$p < 0,01$ по данным однофакторного анализа ANOVA, Бонферрони.

На Фиг. 2 приведен набор изображений ELISPOT и количественный анализ по сыворотке ОЧП, которым вводили человеческие клетки HIP в дни 0, 7, 13 и 75 после первой инъекции и дни 7 и 13 после повторной инъекции человеческих клеток HIP.

На Фиг. 3 приведен набор кривых клеточной выживаемости человеческих iPSC дикого типа, которые инкубировали с МКПК, выделенными у ОЧП в дни 7 и 13 после повторной инъекции человеческих iPSC дикого типа.

На Фиг. 4 приведен набор кривых клеточной выживаемости человеческих клеток HIP, которые инкубировали с МКПК, выделенными у ОЧП в дни 7 и 13 после повторной инъекции человеческих клеток HIP.

На Фиг. 5 приведен набор кривых клеточной выживаемости человеческих iPSC дикого типа, которые инкубировали с цитотоксическими Т-клетками (CD3+CD8+), выделенными у ОЧП в дни 7 и 13 после повторной инъекции человеческих iPSC дикого типа.

На Фиг. 6 приведен набор кривых клеточной выживаемости человеческих клеток HIP, которые инкубировали с цитотоксическими Т-клетками (CD3+CD8+), выделенными у ОЧП в дни 7 и 13 после повторной инъекции человеческих клеток HIP.

На Фиг. 7 приведен набор графиков, иллюстрирующих связывание донор-специфического антитела IgM в сыворотке ОЧП, которым вводили человеческие iPSC дикого типа в дни 0, 7, 13 и 75 после первой инъекции и дни 7 и 13 после повторной инъекции человеческих iPSC дикого типа.

На Фиг. 8 приведен набор графиков, иллюстрирующих связывание донор-специфического антитела IgG в сыворотке ОЧП, которым вводили человеческие iPSC дикого типа в дни 0, 7, 13 и 75 после первой инъекции и дни 7 и 13 после повторной инъекции человеческих iPSC дикого типа.

На Фиг. 9 приведен набор графиков, иллюстрирующих связывание донор-специфического антитела IgM в сыворотке ОЧП, которым вводили человеческие клетки HIP в дни 0, 7, 13 и 75 после первой инъекции и дни 7 и 13 после повторной инъекции человеческих клеток HIP.

На Фиг. 10 приведен набор графиков, иллюстрирующих связывание донор-специфического антитела IgG в сыворотке ОЧП, которым вводили человеческие клетки HIP в дни 0, 7, 13 и 75 после первой инъекции и дни 7 и 13 после повторной инъекции человеческих клеток HIP.

На Фиг. 11 приведен набор графиков, иллюстрирующих общее количество антител IgM в сыворотке ОЧП, которым вводили человеческие iPSC дикого типа в дни 0, 7, 13 и 75 после первой инъекции и дни 7 и 13 после повторной инъекции человеческих iPSC дикого типа.

На Фиг. 12 приведен набор графиков, иллюстрирующих общее количество антител IgG в сыворотке ОЧП, которым вводили человеческие iPSC дикого типа в дни 0, 7, 13 и 75 после первой инъекции и дни 7 и 13 после повторной инъекции человеческих iPSC дикого типа.

На Фиг. 13 приведен набор графиков, иллюстрирующих общее количество антител IgM в сыворотке ОЧП, которым вводили человеческие клетки HIP в дни 0, 7, 13 и 75 после первой инъекции и дни 7 и 13 после повторной инъекции человеческих клеток HIP.

На Фиг. 14 приведен набор графиков, иллюстрирующих общее количество антител IgG в сыворотке ОЧП, которым вводили человеческие клетки HIP в дни 0, 7, 13 и 75 после первой инъекции и дни 7 и 13 после повторной инъекции человеческих клеток HIP.

Другие цели, преимущества и варианты осуществления представленной технологии станут очевидны из нижеследующего подробного описания.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

I. Введение

Представленная технология относится к способам лечения расстройств и состояний, включающим введение более одной дозы гипоиммуногенных клеток. Чтобы преодолеть проблему отторжения этих полученных из стволовых клеток трансплантатов

иммунной системой субъекта, авторы изобретения разработали и описали в данном документе способы введения гипоиммуногенных клеток (например, гипоиммуногенных Т-клеток и дифференцированных клеток, полученных из гипоиммуногенных плюрипотентных стволовых клеток), которые представляют перспективный источник любого подлежащего трансплантации типа клеток. Такие клетки защищены от отторжения адаптивным и врожденным иммунитетом после введения субъекту-реципиенту. Преимуществом является то, что описанные в данном документе клетки не отторгаются иммунной системой субъекта-реципиента вне зависимости от генетического профиля субъекта. Такие клетки защищены от отторжения адаптивным и врожденным иммунитетом после введения субъекту-реципиенту.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки, предложенные в данном документе, не подвержены отторжению клетками врожденного иммунитета. В некоторых случаях гипоиммуногенные клетки не восприимчивы к опосредованному NK-клетками лизису. В некоторых случаях гипоиммуногенные клетки не восприимчивы к поглощению макрофагами. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки применимы как источник универсально совместимых клеток или тканей (например, универсальных донорных клеток или тканей), которые трансплантируют субъекту-реципиенту с необходимостью в небольшом количестве иммуносупрессивного агента или без необходимости в нем. Такие гипоиммуногенные клетки сохраняют клеточно-специфические характеристики и признаки при трансплантации.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы лечения расстройства, включающие введение клеток (*например*, первичных Т-клеток и дифференцированных производных стволовых клеток), которые ускользают от иммунного отторжения у несовместимого по ГКГС аллогенного реципиента. В некоторых случаях дифференцированные клетки, полученные из описанных в данном документе стволовых клеток, ускользают от иммунного отторжения при повторном введении (например, при трансплантации или пересадке) несовместимому по ГКГС аллогенному реципиенту.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены клетки, полученные из первичных Т-клеток, которые являются гипоиммуногенными, и дифференцированных клеток, полученных из гипоиммуногенных плюрипотентных стволовых клеток, которые также являются гипоиммуногенными. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки, предложенные в данном документе, имеют сниженную иммуногенность (например, по меньшей мере на 2,5%-99% меньшую иммуногенность) по сравнению с иммуногенными клетками дикого типа. В некоторых случаях у гипоиммуногенных Т-клеток отсутствует иммуногенность по сравнению с Т-клетками дикого типа. Их дифференцированные производные подходят как универсальные донорные клетки для трансплантации или прививания пациенту-реципиенту. В некоторых вариантах осуществления такие клетки являются неиммуногенными для субъекта.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки не способны вызывать системный иммунный ответ после введения субъекту. В некоторых случаях клетки не вызывают иммунную активацию мононуклеарных клеток периферической крови и сывороточных факторов после введения субъекту. В некоторых случаях клетки не активируют иммунную систему. Другими словами, описанные в данном документе клетки демонстрируют характеристики и свойства, позволяющие ускользать от иммунитета. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки демонстрируют характеристики и свойства иммунопривилегированности.

II. Определения

Используемый в данном документе для характеристики клетки термин «гипоиммуногенная» в общем случае означает, что такая клетка менее подвержена иммунному отторжению субъектом, которому трансплантированы такие клетки. Например, по отношению к неизмененной или немодифицированной клетке дикого типа такая гипоиммуногенная клетка может быть на около 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или более менее подверженной иммунному отторжению субъектом, которому трансплантированы такие клетки. В некоторых вариантах осуществления используют технологии редактирования генома для модуляции экспрессии генов ГКГС I и ГКГС II и, таким образом, создают гипоиммуногенную клетку. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка ускользает от иммунного отторжения в организме несовместимого по ГКГС аллогенного реципиента. В некоторых случаях дифференцированные клетки, полученные из гипоиммуногенных стволовых клеток, предложенных в данном документе, ускользают от иммунного отторжения при введении (например, при трансплантации или пересадке) несовместимому по ГКГС аллогенному реципиенту. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка защищена от опосредованного Т-клетками отторжения со стороны адаптивного иммунитета и/или отторжения клетками врожденного иммунитета.

В контексте данного документа выражения «гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных плюрипотентных стволовых клеток» и/или «гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC» могут использоваться взаимозаменяемо и охватывают такие дифференцированные клетки, включая, например, но не ограничиваясь этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы, клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) и/или любые другие клетки субъекта, например, субъекта-человека.

Гипоиммуногенность клетки можно определить путем оценки иммуногенности клетки, например, способности клетки вызывать адаптивный и врожденный иммунные ответы. Такой иммунный ответ можно оценить с помощью анализов, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления в анализе

иммунного ответа оценивают эффект гипоиммуногенной клетки на пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток, уничтожение Т-клетками, пролиферацию NK-клеток, активацию NK-клеток и активность макрофагов. В некоторых случаях гипоиммуногенные клетки и их производные меньше подвергаются уничтожению Т-клетками и/или NK-клетками после введения 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 гипоиммуногенная клетка является неиммуногенной или не вызывает иммунный ответ у субъекта-реципиента.

В контексте данного документа «плюрипотентные стволовые клетки» обладают потенциалом к дифференцировке 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). В контексте данного документа термин «плюрипотентные стволовые клетки» также включает «индуцированные плюрипотентные стволовые клетки» или «iPSC», «эмбриональные стволовые клетки» или «ESC», тип плюрипотентных стволовых клеток, полученных из неплюрипотентных клеток. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку получают или создают из клетки, которая не является плюрипотентной клеткой. Другими словами плюрипотентные стволовые клетки могут представлять собой прямое или непрямое потомство неплюрипотентной клетки. Примеры родительских клеток включают соматические клетки, которые были перепрограммированы для индукции плюрипотентного недифференцированного фенотипа различными способами. Такие клетки «ESC», «ESC», «iPS» или «iPSC» можно создавать путем индукции экспрессии определенных регуляторных генов или путем экзогенного применения определенных белков. Способы индукции клеток iPS известны в данной области техники и дополнительно описаны ниже. (*Смотрите*, 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); каждая из которых в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки). Генерация индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) описана ниже. В контексте данного документа «hiPSC» представляют собой человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

Под «HLA» или «лейкоцитарным антигеном человека» подразумевается генный комплекс, кодирующий белки главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) у человека. Эти белки клеточной поверхности, составляющие комплекс HLA, отвечают за регуляцию иммунного ответа на антигены. У людей существует два ГКГС, класс I и класс

II, «HLA-I» и «HLA-II». HLA-I включает три белка, HLA-A, HLA-B и HLA-C, которые презентируют пептиды внутри 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 презентируют антигены за пределами клетки Т-лимфоцитам. Это стимулирует CD4+ клетки (также известные как Т-хелперные клетки). Следует понимать, что использование терминов «ГКГС» или «HLA» не подразумевает ограничения, поскольку это зависит от того, получены гены от человека (HLA) или мыши (ГКГС). Таким образом, в отношении клеток млекопитающих эти термины можно взаимозаменяемо использовать в данном документе.

В контексте данного документа термины «прививание», «введение», «внесение», «имплантация» и «трансплантация», а также их грамматические вариации, используются взаимозаменяемо в контексте помещения клеток (например, описанных в данном документе клеток) в организм субъекта методом или путем, который приводит к по меньшей мере частичной локализации внесенных клеток в необходимом участке. Клетки можно имплантировать непосредственно в необходимый участок или, в альтернативном варианте, вводить любым подходящим путем, который приводит к доставке в необходимый участок организма субъекта, при этом по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остается жизнеспособной. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может составлять от нескольких часов, например, двадцать четыре часа, до нескольких дней и даже до нескольких лет. В некоторых вариантах осуществления клетки также можно вводить (например, инъецировать) в место, отличное от необходимого участка, например, в головной мозг или подкожно, например, в капсуле, чтобы сохранить имплантированные клетки в месте имплантации и избежать миграции имплантированных клеток.

В контексте данного документа термин «лечение» включает введение субъекту эффективного количества описанных в данном документе клеток так, чтобы у субъекта наблюдалось ослабление по меньшей мере одного симптома заболевания или улучшение в заболевании, например, благоприятные или необходимые клинические результаты. В целях этой технологии благоприятные или необходимые клинические результаты включают, но не ограничиваются этим, облегчение одного или более симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т. е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), выявляемые или невыявляемые. Лечение может относиться к продлению выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствие лечения. Таким образом, специалисту в данной области техники понятно, что лечение может улучшить болезненное состояние, но может не обеспечивать полное излечение заболевания. В некоторых вариантах осуществления происходит облегчение одного или более симптомов

состояния, заболевания или расстройства по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50% после лечения состояния, заболевания или расстройства.

В контексте данного документа термин «рак» определяется как гиперпролиферация клеток, чей уникальный признак (например, потеря нормального контроля) приводит к нерегулируемому росту, отсутствию дифференцировки, локальной тканевой инвазии и метастазированию. В контексте способов по изобретению рак может представлять собой любой рак, в том числе любое из острого лимфоцитарного рака, острого миелоидного лейкоза, альвеолярной рабдомиосаркомы, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного мозга, рака молочной железы, рака ануса, анального канала или аноректума, рака глаза, рака внутрипеченочного желчного протока, рака сустава, рака шеи, рака желчного пузыря или плевры, рака носа, носовой полости или среднего уха, рака ротовой полости, рака вульвы, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного рака, рака толстой кишки, рака пищевода, рака шейки матки, фибросаркомы, желудочно-кишечной карциноиной опухоли, лимфомы Ходжкина, рака гортаноглотки, рака почки, рака гортани, лейкоза, жидких опухолей, рака печени, рака легкого, лимфомы, злокачественной мезотелиомы, мастоцитомы, меланомы, множественной миеломы, рака носоглотки, неходжкинской лимфомы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака брюшной полости, сальника и брыжейки, рака глотки, рака предстательной железы, ректального рака, почечного рака, рака кожи, рака тонкого кишечника, рака мягкий тканей, солидных опухолей, рака желудка, рака яичка, рака щитовидной железы, рака уретры и рака мочевого пузыря. В контексте данного документа термин «опухоль» относится к аномальному росту клеток или тканей злокачественного типа, если явно не указано иное, и не включает ткани доброкачественного типа.

Термин «хроническое инфекционное заболевание» относится к заболеванию, вызываемому инфекционным агентом, при этом инфекция является персистентной. Такое заболевание может включать гепатит (A, B или C), вирус герпеса (например, VZV, HSV-1, HSV-6, HSV-II, CMV и EBV) и ВИЧ/СПИД. Невирусные примеры могут включать хронические грибковые заболевания, такие как аспергиллез, кандидоз, кокцидиридомикоз, и заболевания, связанные с Cryptococcus и Histoplasmosis. Неограничивающими примерами хронических бактериальных инфекционных агентов могут быть Chlamydia pneumoniae, Listeria monocytogenes и Mycobacterium tuberculosis. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой инфекцию, вызванную вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД).

Термин «аутоиммунное заболевание» относится к любому заболеванию или расстройству, при котором у субъекта развивается деструктивный иммунный ответ против собственных тканей. Аутоиммунные расстройства могут поражать практически любую органную систему субъекта (например, человека), включая, но не ограничиваясь этим, заболевания нервной, желудочно-кишечной и эндокринной систем, а также кожи и других

соединительных тканей, глаз, крови и кровеносных сосудов. Примеры аутоиммунных заболеваний включают, но не ограничиваются этим, тиреоидит Хашимото, системную красную волчанку, синдром Шегрена, болезнь Грейвса, склеродермию, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, миастению гравис и диабет.

В некоторых вариантах осуществления представленная технология предусматривает лечение несенсибилизированных субъектов. Например, субъекты, предполагаемые для представленных способов лечения, не сенсибилизированы в отношение или против одного или более аллоантигенов. В некоторых вариантах осуществления пациент не сенсибилизирован после предыдущей беременности или предыдущего аллогенного трансплантата (включая, например, но не ограничиваясь этим, алогенный клеточный трансплантат, аллогенное переливание крови, аллогенный тканевый трансплантат и аллогенный органный трансплантат). В некоторых вариантах осуществления один или более антигенов, в отношение которых пациент не сенсибилизирован, включают лейкоцитарные антигены человека. В некоторых вариантах осуществления пациент не демонстрирует наличия В-клеток памяти и/или Т-клеток памяти против одного или более аллоантигенов. В некоторых вариантах осуществления сенсибилизация может включать сенсибилизацию в отношение по меньшей мере части аутологичной CAR Т-клетки, такой как CAR, экспрессируемый Т-клеткой, а в представленных способах пациент не сенсибилизирован против любой части таких аутологичных CAR Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления представленная технология предусматривает изменение целевых полинуклеотидных последовательностей любым способом, известным специалисту в данной области техники, например, с использованием системы TALEN или РНК-направляемых транспозаз. Следует понимать, что хотя примеры способов, в которых используют CRISPR/Cas (например, Cas9 и Cas12A) и TALEN, подробно описаны в данном документе, технология не ограничена применением этих способов/систем. В рамках данного документа можно использовать другие способы нацеливания, например B2M, для снижения или устранения экспрессии в клетках-мишенях, известные специалистам в данной области техники.

Способы по представленной технологии можно использовать для изменения целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. Представленная технология предусматривает изменение целевых полинуклеотидных последовательностей в клетке в любых целях. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность в клетке изменена с целью получения мутантной клетки. В контексте данного документа термин «мутантная клетка» относится к клетке с результирующим генотипом, который отличается от исходного генотипа. В некоторых случаях «мутантная клетка» демонстрирует мутантный фенотип, например, когда нормально функционирующий ген изменяют, используя системы CRISPR/Cas. В других случаях «мутантная клетка» демонстрирует фенотип дикого типа, например, когда систему CRISPR/Cas используют для коррекции мутантного генотипа. В некоторых вариантах

осуществления целевую полинуклеотидную последовательность в клетке изменяют для коррекции или исправления генетической мутации (например, для восстановления нормального фенотипа клетки). В некоторых вариантах осуществления целевую полинуклеотидную последовательность в клетке изменяют, чтобы индуцировать генетическую мутацию (например, чтобы нарушить функцию гена или геномного элемента).

В некоторых вариантах осуществления изменение представляет собой индел. В контексте данного документа «индел» относится к мутации в результате вставки, делеции или их комбинации. Как известно специалистам в данной области техники, индел в кодирующей области геномной последовательности приводит к мутации со сдвигом рамки, если длина индела не кратна трем. В некоторых вариантах осуществления изменение представляет собой точечную мутацию. В контексте данного документа «точечная мутация» относится к замене с замещением одного из нуклеотидов. Систему CRISPR/Cas можно использовать для индукции индела любой длины или точечной мутации в целевой полинуклеотидной последовательности.

В контексте данного документа «нокаут» включает делецию всей или части целевой полинуклеотидной последовательности так, чтобы это препятствовало функции целевой полинуклеотидной последовательности. Например, нокаут можно обеспечить путем изменения целевой полинуклеотидной последовательности путем индукции индела в целевой полинуклеотидной последовательности в функциональном домене целевой полинуклеотидной последовательности (например, ДНК-связывающем домене). Специалисты в данной области техники без проблем поймут, как использовать системы CRISPR/Cas для нокаута целевой полинуклеотидной последовательности или ее части, на основании подробной информации, описанной в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления изменение приводит к нокауту целевой полинуклеотидной последовательности или ее части. В ряде применений может быть полезен нокаут целевой полинуклеотидной последовательности или ее части с помощью системы CRISPR/Cas. Например, нокаут целевой полинуклеотидной последовательности в клетке можно проводить in vitro в исследовательских целях. В ex vivo целях нокаут целевой полинуклеотидной последовательности в клетке может быть полезен для лечения или предотвращения расстройства, связанного с экспрессией целевой полинуклеотидной последовательности (например, за счет нокаута мутантной аллели в клетке ex vivo и введения этих клеток, содержащих нокаутированную мутантную аллель субъекту).

Под «нокином» в данном документе подразумевается процесс, который добавляет генетическую функцию в клетке-хозяине. Это вызывает повышение уровней генного продукта с нокином, *например* РНК или кодируемого белка. Как понятно специалистам в данной области техники, это можно осуществлять несколькими способами, включая добавление одной или более дополнительных копий гена в клетку-хозяина или изменение регуляторного компонента эндогенного гена, повышающего экспрессию белка. Это можно осуществлять посредством модификации промотора, добавления другого

промотора, добавления энхансера или модификации других экспрессионных последовательностей генов.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изменение приводит к понижению экспрессии полинуклеотидной последовательности-мишени. Термины «снижение», «уменьшенный», «уменьшение» и «сниженный» используют в данном документе, как правило, для обозначения снижения на статистически значимую величину. Однако, во избежание сомнений, «снижение», «уменьшенный», «уменьшение», «снижение» означает снижение по меньшей мере на 10% по сравнению с эталонным уровнем или эталонной клеткой, например, снижение по меньшей мере на около 20%, или по меньшей мере на около 30%, или по меньшей мере на около 40%, или по меньшей мере на около 50%, или по меньшей мере на около 60%, или по меньшей мере на около 70%, или по меньшей мере на около 80%, или по меньшей мере на около 90%, или до и включая снижение на 100% (т. е. до отсутствия уровня по сравнению с эталонным образцом), или любое снижение на 10-100% по сравнению с эталонным уровнем.

Термины «увеличенный», «увеличивать», «усиливать» или «активировать» используют в данном документе в общем случае для обозначения увеличения на статически значимую величину; во избежание каких-либо сомнений, термины «увеличенный», «увеличивать», «усиливать» или «активировать» означают увеличение по меньшей мере на 10% по сравнению с эталонным уровнем, например увеличение по меньшей мере на около 20%, или по меньшей мере на около 30%, или по меньшей мере на около 40%, или по меньшей мере на около 50%, или по меньшей мере на около 60%, или по меньшей мере на около 70%, или по меньшей мере на около 80%, или по меньшей мере на около 90%, или до и включая увеличение на 100%, или любое увеличение на 10-100% по сравнению с эталонным уровнем, или по меньшей мере в около 2 раза, или по меньшей мере в около 3 раза, или по меньшей мере в около 4 раза, или по меньшей мере в около 5 раз, или по меньшей мере в около 10 раз, или любое увеличение в 2-10 раз или более по сравнению с эталонным уровнем.

В контексте данного документа подразумевается, что термин «экзогенный» обозначает, что указанная молекула или указанный полипептид вносят в представляющую интерес клетку. Полипептид можно вносить, например, посредством внесения кодирующей нуклеиновой кислоты в генетический материал клеток, например посредством интеграции в хромосому, или в виде нехромосомного генетического материала, такого как плазмида или экспрессионный вектор. Следовательно, этот термин в отношении экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты относится к внесению кодирующей нуклеиновой кислоты в экспрессируемой форме в клетку.

Термин «эндогенный» относится к указанным молекуле или полипептиду, которые присутствуют в клетке. Аналогично, этот термин в отношении экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты относится к экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты, содержащейся внутри клетки, а не внесенной экзогенно.

Термин процент «идентичности» в контексте двух или более последовательностей

нуклеиновых кислот или полипептидов относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые имеют определенный процент одинаковых нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, по определению с помощью одного из алгоритмов сравнения последовательностей, описанных ниже (*например*, BLASTP и BLASTN или другие алгоритмы, доступные специалистам), или визуального осмотра. В зависимости от применения процент «идентичности» может относиться к области сравниваемой последовательности, например, протяжению функционального домена, или, в альтернативном варианте, относится ко всей длине двух сравниваемых последовательностей. При сравнении 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 указывают координаты подпоследовательности и указывают программные параметры алгоритма для работы с последовательностями. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для исследуемой(ых) последовательности(ей) в сравнении с эталонной последовательностью на основании указанных программных параметров.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), алгоритма выравнивания областей гомологии по Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), метода поиска сходства по Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) или визуального осмотра (в общем случае смотрите Ausubel et al., ниже).

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.

Термины «субъект» и «индивид» взаимозаменяемо используются в данном документе и относятся к животному, например человеку, от которого можно получать клетки и/или в отношении которого применяют лечение, включая профилактическое лечение, клетками, описанными в данном документе. В случае лечения тех инфекций, состояний или болезненных состояний, которые являются специфическими для конкретного животного, такого как человек, термин «субъект» относится к этому конкретному животному. Термины «отличные от человека животные» и «отличные от человека млекопитающие», взаимозаменяемо используемые в данном документе, 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. При этом субъект преимущественно представляет собой млекопитающее, такое как человек или другие млекопитающие, такие как одомашненное млекопитающее, например собака, кошка, лошадь и т. п., или сельскохозяйственное млекопитающее, например, корова, овца, свинья и т. п.

Следует отметить, что формула изобретения может быть составлена так, чтобы исключать любой необязательный элемент. Следовательно, подразумевается, что данное утверждение служит в качестве предварительного основания для использования такой исключительной терминологии, как «единственно», «только» и т. п. в связи с указанием элементов формулы изобретения или использования «отрицательного» ограничения. Как станет очевидно специалистам в данной области техники после прочтения этого описания, каждый из отдельных вариантов осуществления, описанных и проиллюстрированных в данном документе, имеет дискретные компоненты и признаки, которые легко отделить от признаков или объединить с признаками любого из других нескольких вариантов осуществления, не выходя за рамки объема или сущности представленной технологии. Любой изложенный способ можно выполнять в порядке изложения событий или в любом другом логически возможном порядке. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в данном документе, также можно использовать при практической реализации или тестировании представленной технологии, далее описаны репрезентативные иллюстративные способы и материалы.

В контексте представленной технологии будут использоваться следующие термины, которые определены, как указано ниже.

Перед тем как продолжить описание представленной технологии, необходимо принять во внимание, что данная технология не ограничена конкретными описанными вариантами осуществления, поскольку они, конечно, могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена для описания только некоторых вариантов осуществления и не подразумевает ограничения, поскольку объем представленной технологии ограничивается только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют общепринятые значения, понятные любому специалисту в области техники, к которой относится эта технология. В случае, когда приведен диапазон значений, следует понимать, что представленная 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 представленную технологию за исключением любого явным образом исключенного предела в указанном диапазоне. Если

указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие один или оба этих включенных предела, также включены в представленную технологию. Определенные диапазоны представлены в данном документе числовыми значениями, которым предшествует термин «около». В контексте данного документа термин «около» означает точное число, которому он предшествует, а также числа, которые близки или приблизительно соответствуют числу, которому предшествует этот термин. При определении того, является ли число близким или приблизительным к конкретно указанному числу, близкое или приблизительное неуказанное число может представлять собой число, которое в данном контексте является по существу эквивалентным конкретно указанному числу.

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 включенные посредством ссылки. Кроме того, каждая цитируемая публикация, патент или патентная заявка включены в данный документ посредством ссылки в отношении раскрытия и описания предмета, в связи с которым эти публикации процитированы. Цитирование любой публикации соответствует ее раскрытию до даты подачи заявки и ее не следует воспринимать как признание того, что представленная технология не имеет права датировать такую публикацию более ранним числом в силу предыдущей технологии. Более того, даты приведенных публикаций могут отличаться от фактических дат публикаций, что может потребовать независимого подтверждения.

III. Подробное описание вариантов осуществления

A. Способы введения гипоиммуногенных клеток

Как более подробно описано в данном документе, предложены способы лечения пациента с расстройством путем многократного введения клеток, в частности гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, и гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). Как должно быть понятно, для всего множества описанных в данном документе вариантов осуществления, связанных со сроками и/или комбинациями вариантов терапии, введение клеток осуществляют способом или путем, который приводит к по меньшей мере частичной локализации внесенных клеток в необходимом участке. Клетки можно имплантировать непосредственно в необходимый участок или, в альтернативном варианте, вводить любым подходящим путем, который приводит к доставке в необходимый участок организма субъекта, при этом по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остается жизнеспособной.

В данном документе предложены способы лечения пациента с расстройством,

включающие осуществление по меньшей мере двух введений популяции(й) гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)) пациенту. В некоторых вариантах осуществления способ включает осуществление по меньшей мере двух введений популяции(й) гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления первое введение гипоиммуногенных клеток пациенту осуществляют по меньшей мере за 1 месяц (например, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев или более) или более до второго введения гипоиммуногенных клеток. В других вариантах осуществления первое введение гипоиммуногенных клеток пациенту осуществляют по меньшей мере за 2 месяца (например, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев или более) или более до второго введения гипоиммуногенных клеток. В определенных вариантах осуществления первое введение гипоиммуногенных клеток пациенту осуществляют по меньшей мере за 1 неделю (например, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель или более) или более до второго введения гипоиммуногенных клеток. В определенных вариантах осуществления первое введение пациенту гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), осуществляют по меньшей мере за 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней или более до второго введения гипоиммуногенных клеток. Во многих вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), и вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iiPSC (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), содержат одинаковые типы клеток. В некоторых вариантах осуществления первая популяция клеток и вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных

из гипоиммунных iPSC, содержат одинаковые типы клеток. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержат одинаковое процентное соотношение типов клеток. В других вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержат разное процентное соотношение типов клеток. В определенных вариантах осуществления первое введение пациенту гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, осуществляют по меньшей мере за 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней или более до второго введения гипоиммуногенных клеток. Во многих вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, и вторая популяция гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, содержат одинаковые типы клеток. В некоторых вариантах осуществления первая популяция клеток и вторая популяция гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, содержат одинаковые типы клеток. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, и вторая популяция гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, содержат одинаковое процентное соотношение типов клеток. В других вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, и вторая популяция гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, содержат разное процентное соотношение типов клеток.

В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент не вводят пациенту до первого введения популяции гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или популяции гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). Во многих вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту до первого введения популяции гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или популяции гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий

агент вводят по меньшей мере за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней или более до первого введения гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере за 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более до первого введения гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент не вводят пациенту после первого введения гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), или вводят по меньшей мере через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней или более после введения гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более после первого введения гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные

клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). Неограничивающие примеры иммуносупрессивного и/или иммуномодулирующего агента включают циклоспорин, азатиоприн, микофеноловую кислоту, микофенолата мофетил, кортикостероиды, такие как преднизон, метотрексат, соли золота, сульфасалазин, противомалярийные средства, бреквинар, лефлуномид, мизорибин, 15-деоксиспергуалин, 6-меркаптопурин, циклофосфамид, рапамицин, такролимус (FK-506), OKT3, антитимоцитарный глобулин, тимопентин, тимозин-α и сходные агенты. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент выбран из группы иммуносупрессивных антител, состоящей из антител, связывающихся с p75 рецептора IL-2, антител, связывающихся, например, с MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN-гамма, TNF-альфа, IL-4, IL-5, IL-6R, IL-6, IGF, IGFR1, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a или CD58, и антител, связывающихся с любыми их лигандами. В некоторых вариантах осуществления, в которых иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту до или после первого введения гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC, введение осуществляют в меньшей дозировке, чем была бы необходима для гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC, с экспрессией ГКГС I и/или ГКГС II и без экзогенной экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления, в которых иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту до или после введения клеток, введение осуществляют в меньшей дозировке, чем была бы необходима для гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC, с экспрессией ГКГС I и/или ГКГС II и без экзогенной экспрессии CD24.

В одном варианте осуществления такой иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент может быть выбран из растворимых молекул IL-15R, IL-10, B7 (например, B7-1, B7-2, их вариантов и их фрагментов), ICOS и OX40, ингибитора негативного Т-клеточного регулятора (такого как антитело к CTLA4) и сходных агентов.

В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент не вводят пациенту до второго введения популяции гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых

клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). Во многих вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту до второго введения популяции гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней или более до второго введения гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере за 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более до второго введения гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту после второго введения клеток или вводят по меньшей мере за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней или более после второго введения гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более после второго введения гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC. В некоторых вариантах осуществления, в которых иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту до или после второго введения гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC, введение осуществляют в меньшей дозировке, чем была бы необходима для гипоиммуногенных клеток, таких как, но не

ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, с экспрессией ГКГС I и/или ГКГС II и без экзогенной экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления, в которых иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту до или после второго введения гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC, введение осуществляют в меньшей дозировке, чем была бы необходима для клеток с экспрессией ГКГС I и/или ГКГС II и без экзогенной экспрессии CD24.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения включает введение пациенту первой популяции гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), с последующим периодом восстановления, когда пациенту не вводят гипоиммуногенные клетки, такие как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), а затем введение пациенту второй популяции гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления период восстановления составляет по меньшей мере 1 месяц (например, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяца или 60 месяцев или более) или более. В определенных вариантах осуществления период восстановления составляет по меньшей мере 1 неделю (например, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12

недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель или более) или более. В определенных вариантах осуществления период восстановления составляет по меньшей мере 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 1 неделю. В определенных вариантах осуществления период восстановления составляет по меньшей мере 3 дня. В некоторых вариантах осуществления период восстановления начинается после первого введения популяции гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или популяции гипоиммуногенных клеток дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и заканчивается когда такие клетки более не присутствуют или не выявляются у пациента. В некоторых вариантах осуществления период восстановления основан на пути введения. В некоторых вариантах осуществления период восстановления составляет около 3 дней, когда путь введения является внутримышечным. В определенных вариантах осуществления период восстановления основан на сроках применения дополнительной терапии. В некоторых вариантах осуществления период восстановления основан на сроках применения дополнительной терапии, причем дополнительная терапия не включает гипоиммуногенные клетки, такие как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC.

В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимая пациенту, является такой же, как и вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимая пациенту. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимая пациенту, отличается от второй популяции гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимой пациенту. В некоторых вариантах осуществления вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимая пациенту, представляет собой смесь первой популяции гипоиммуногенных клеток, вводимой пациенту, и отличной популяции гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержит Т-лимфоциты (Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержит Т-лимфоциты (Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, вводимая пациенту, является такой же, как и вторая популяция гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, вводимая пациенту. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, вводимая пациенту, отличается от второй популяции гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, вводимой пациенту. В некоторых вариантах осуществления вторая популяция гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, вводимая пациенту, представляет собой

смесь первой популяции гипоиммуногенных клеток, вводимой пациенту, и отличной популяции гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы первой популяции, является таким же, как и число гипоиммуногенных клеток (таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC), вводимых в рамках дозы второй популяции. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток (таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC), вводимых в рамках дозы первой популяции, является меньшим, чем число гипоиммуногенных клеток (таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC), вводимых в рамках дозы второй популяции. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток (таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC), вводимых в рамках дозы первой популяции, является большим, чем число гипоиммуногенных клеток (таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных iPSC), вводимых в рамках дозы второй популяции.

В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, выбрана из группы, состоящей из Т-клеток, нейральных/нейрональных клеток, бета-клеток, гепатоцитов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток, клеток щитовидной железы, типов островковых клеток поджелудочной железы и/или клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС). В некоторых вариантах осуществления вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, выбрана из группы, состоящей из Т-клеток, нейральных/нейрональных клеток, бета-клеток, гепатоцитов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток, клеток щитовидной железы, типов островковых клеток поджелудочной железы и/или клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС). В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы первой популяции, является таким же, как и число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы второй популяции. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы первой популяции, является меньшим, чем число гипоиммуногенных клеток,

дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы второй популяции. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы первой популяции, является большим, чем число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы второй популяции.

В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, выбрана из группы, состоящей из нейральных/нейрональных клеток, бета-клеток, гепатоцитов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток, клеток щитовидной железы, типов островковых клеток поджелудочной железы и/или клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС). В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, выбрана из группы, состоящей из нейральных/нейрональных клеток, бета-клеток, гепатоцитов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток, клеток щитовидной железы, типов островковых клеток поджелудочной железы и/или клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой бета-клетки. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой гепатоциты. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой кардиомиоциты. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой эндотелиальные клетки. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой клетки щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой типы островковых клеток поджелудочной железы. В некоторых

вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС). В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержит Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержит Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы первой популяции, является таким же, как и число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы второй популяции. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы первой популяции, является меньшим, чем число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы второй популяции. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы первой популяции, является большим, чем число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы второй популяции.

В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержит Т-клетки и, необязательно, одну или более других гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, выбранных из группы, состоящей из нейральных/нейрональных клеток, бета-клеток, гепатоцитов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток, клеток щитовидной железы, типов островковых клеток поджелудочной железы и/или клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС). В некоторых вариантах осуществления вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержит Т-клетки и, необязательно, одну или более других гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, выбранных из группы, состоящей из нейральных/нейрональных клеток, бета-клеток, гепатоцитов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток, клеток щитовидной железы, типов островковых клеток поджелудочной железы и/или клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС). В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой нейральные/нейрональные клетки. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой бета-клетки. В некоторых вариантах осуществления первая популяция

гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой гепатоциты. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой кардиомиоциты. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой эндотелиальные клетки. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой клетки щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой типы островковых клеток поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой Т-клетки, а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой клетки ПЭС. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы первой популяции, является таким же, как и число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы второй популяции. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы первой популяции, является меньшим, чем число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы второй популяции. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы первой популяции, является большим, чем число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы второй популяции.

В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержит Т-клетки и, необязательно, одну или более других гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, выбранных из группы, состоящей из нейральных/нейрональных клеток, бета-клеток, гепатоцитов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток, клеток щитовидной железы, типов островковых клеток поджелудочной железы и/или клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), а вторая популяция гипоиммуногенных клеток,

дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой нейральные/нейрональные клетки. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержит Т-клетки и, необязательно, одну или более других гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, выбранных из группы, состоящей из нейральных/нейрональных клеток, бета-клеток, гепатоцитов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток, клеток щитовидной железы, типов островковых клеток поджелудочной железы и/или клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой бета-клетки. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержит Т-клетки и, необязательно, одну или более других гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, выбранных из группы, состоящей из нейральных/нейрональных клеток, бета-клеток, гепатоцитов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток, клеток щитовидной железы, типов островковых клеток поджелудочной железы и/или клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой гепатоциты. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержит Т-клетки и, необязательно, одну или более других гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, выбранных из группы, состоящей из нейральных/нейрональных клеток, бета-клеток, гепатоцитов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток, клеток щитовидной железы, типов островковых клеток поджелудочной железы и/или клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой кардиомиоциты. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержит Т-клетки и, необязательно, одну или более других гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, выбранных из группы, состоящей из нейральных/нейрональных клеток, бета-клеток, гепатоцитов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток, клеток щитовидной железы, типов островковых клеток поджелудочной железы и/или клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой эндотелиальные клетки. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержит Т-клетки и, необязательно, одну или более других гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, выбранных из группы, состоящей из нейральных/нейрональных клеток, бета-клеток, гепатоцитов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток, клеток щитовидной железы, типов островковых клеток поджелудочной железы и/или клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), а вторая

популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой клетки щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержит Т-клетки и, необязательно, одну или более других гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, выбранных из группы, состоящей из нейральных/нейрональных клеток, бета-клеток, гепатоцитов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток, клеток щитовидной железы, типов островковых клеток поджелудочной железы и/или клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой типы островковых клеток поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержит Т-клетки и, необязательно, одну или более других гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, выбранных из группы, состоящей из нейральных/нейрональных клеток, бета-клеток, гепатоцитов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток, клеток щитовидной железы, типов островковых клеток поджелудочной железы и/или клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, представляет собой клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС). В некоторых вариантах осуществления первая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержит Т-клетки и, необязательно, одну или более других гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, выбранных из группы, состоящей из нейральных/нейрональных клеток, бета-клеток, гепатоцитов, кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток, клеток щитовидной железы, типов островковых клеток поджелудочной железы и/или клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), а вторая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, содержит Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы первой популяции, является таким же, как и число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы второй популяции. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы первой популяции, является меньшим, чем число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы второй популяции. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы первой популяции, является большим, чем число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы второй популяции.

В некоторых вариантах осуществления первая популяция содержит Т-клетки, полученные из гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC,

и представляющие собой смесь CD4+ и CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления первая популяция содержит Т-клетки, полученные из гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и представляющие собой CD4+ клетки. В некоторых вариантах осуществления первая популяция содержит Т-клетки, полученные из гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и представляющие собой CD8+ клетки. В некоторых вариантах осуществления первая популяция содержит Т-клетки, полученные из гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и представляющие собой неактивированные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления вторая популяция содержит Т-клетки, полученные из гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и представляющие собой смесь CD4+ и CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления вторая популяция содержит Т-клетки, полученные из гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и представляющие собой CD4+ клетки. В некоторых вариантах осуществления вторая популяция содержит Т-клетки, полученные из гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и представляющие собой CD8+ клетки. В некоторых вариантах осуществления вторая популяция содержит Т-клетки, полученные из гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и представляющие собой неактивированные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая популяции содержат Т-клетки, полученные из гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и представляющие собой смесь CD4+ и/или CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая популяции содержат Т-клетки, полученные из гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и представляющие собой CD4+ клетки. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая популяции содержат Т-клетки, полученные из гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и представляющие собой CD8+ клетки. В некоторых вариантах осуществления первая популяция содержит Т-клетки, полученные из гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и представляющие собой CD4+ клетки, а вторая популяция содержит Т-клетки, полученные из гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и представляющие собой CD8+ клетки. В некоторых вариантах осуществления первая популяция содержит Т-клетки, полученные из гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и представляющие собой CD8+ клетки, а вторая популяция содержит Т-клетки, полученные из гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, и представляющие собой CD4+ клетки. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы первой популяции, является таким же, как и число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы второй

популяции. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы первой популяции, является меньшим, чем число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы второй популяции. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы первой популяции, является большим, чем число гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных iPSC, вводимых в рамках дозы второй популяции.

В некоторых вариантах осуществления первая популяция содержит гипоиммуногенные Т-клетки, полученные из первичных Т-клеток, и представляющие собой смесь CD4+ и CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления первая популяция содержит гипоиммуногенные Т-клетки, полученные из первичных Т-клеток, и представляющие собой CD4+ клетки. В некоторых вариантах осуществления первая популяция содержит гипоиммуногенные Т-клетки, полученные из первичных Т-клеток, и представляющие собой CD8+ клетки. В некоторых вариантах осуществления первая популяция содержит гипоиммуногенные Т-клетки, полученные из первичных Т-клеток, и представляющие собой неактивированные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления вторая популяция содержит гипоиммуногенные Т-клетки, полученные из первичных Т-клеток, и представляющие собой смесь CD4+ и CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления вторая популяция содержит гипоиммуногенные Т-клетки, полученные из первичных Т-клеток, и представляющие собой CD4+ клетки. В некоторых вариантах осуществления вторая популяция содержит гипоиммуногенные Т-клетки, полученные из первичных Т-клеток, и представляющие собой CD8+ клетки. В некоторых вариантах осуществления вторая популяция содержит гипоиммуногенные Т-клетки, полученные из первичных Т-клеток, и представляющие собой неактивированные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая популяции содержат гипоиммуногенные Т-клетки, полученные из первичных Т-клеток, и представляющие собой смесь CD4+ и CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая популяции содержат гипоиммуногенные Т-клетки, полученные из первичных Т-клеток, и представляющие собой CD4+ клетки. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая популяции содержат гипоиммуногенные Т-клетки, полученные из первичных Т-клеток, и представляющие собой CD8+ клетки. В некоторых вариантах осуществления вторая популяция содержит гипоиммуногенные Т-клетки, полученные из первичных Т-клеток, и представляющие собой CD4+ клетки, а вторая популяция содержит гипоиммуногенные Т-клетки, полученные из первичных Т-клеток, и представляющие собой CD8+ клетки. В некоторых вариантах осуществления вторая популяция содержит гипоиммуногенные Т-клетки, полученные из первичных Т-клеток, и представляющие собой CD8+ клетки, а вторая популяция содержит гипоиммуногенные Т-клетки, полученные из первичных Т-клеток, и представляющие собой CD4+ клетки. В некоторых

вариантах осуществления число гипоиммуногенных Т-клеток, полученных из первичных Т-клеток, вводимых в рамках дозы первой популяции, является таким же, как и число гипоиммуногенных Т-клеток, полученных из первичных Т-клеток, вводимых в рамках дозы второй популяции. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных Т-клеток, полученных из первичных Т-клеток, вводимых в рамках дозы первой популяции, является меньшим, чем число гипоиммуногенных Т-клеток, полученных из первичных Т-клеток, вводимых в рамках дозы второй популяции. В некоторых вариантах осуществления число гипоиммуногенных Т-клеток, полученных из первичных Т-клеток, вводимых в рамках дозы первой популяции, является большим, чем число гипоиммуногенных Т-клеток, полученных из первичных Т-клеток, вводимых в рамках дозы второй популяции.

В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, вызывает сниженный или меньший уровень иммунной активации у пациента. В некоторых случаях уровень иммунной активации, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем иммунной активации, получаемым при введении иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), не способна вызывать иммунную активацию у пациента.

В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), вызывает сниженный или меньший уровень системной активации TH1 у пациента. В некоторых случаях уровень системной активации TH1, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем системной активации TH1, получаемым при введении иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), не способна вызывать системную активацию TH1 у пациента.

В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, вызывает сниженный или меньший уровень иммунной активации мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) у пациента. В некоторых случаях уровень иммунной активации МКПК, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем иммунной активации МКПК, получаемым при введении иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), не способна вызывать иммунную активацию МКПК у пациента.

В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, вызывает появление сниженного или меньшего уровня донор-специфических антител IgG у пациента. В некоторых случаях уровень донор-специфических антител IgG, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем донор-специфических антител IgG, получаемым при введении иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая

популяция гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), не способна вызывать появление донор-специфических антител IgG у пациента.

В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, вызывает сниженный или меньший уровень выработки антител IgM и IgG у пациента. В некоторых случаях уровень выработки антител IgM и IgG, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем выработки антител IgM и IgG, получаемым при введении иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), не способна вызывать выработку антител IgM и IgG у пациента.

В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, вызывает сниженный или меньший уровень уничтожения цитотоксическими Т-клетками у пациента. В некоторых случаях уровень уничтожения цитотоксическими Т-клетками, вызываемый клетками, является по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшим по сравнению с уровнем уничтожения цитотоксическими Т-клетками, получаемым при введении иммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки,

гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), не способна вызывать уничтожение цитотоксическими Т-клетками у пациента.

В. Химерные антигенные рецепторы

В данном документе предложены гипоиммуногенные клетки, включая гипоиммуногенные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, и гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления CAR выбран из группы, состоящей из CAR первого поколения, CAR второго поколения, CAR третьего поколения и CAR четвертого поколения.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой или содержит химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой или включает CAR первого поколения, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере один сигнальный домен (например, один, два или три сигнальных домена). В некоторых вариантах осуществления CAR включает CAR второго поколения, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена. В некоторых вариантах осуществления CAR включает CAR третьего поколения, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена. В некоторых вариантах осуществления CAR четвертого поколения, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой или включает антитело, фрагмент антитела, scFv или Fab.

1. Антигенсвязывающий домен (АСД) нацелен на антиген, характерный для неопластической или раковой клетки

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен (АСД) нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки. Другими словами, антигенсвязывающий домен нацелен на антиген, экспрессируемый неопластической или раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления АСД связывает опухолеассоциированный антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген, характерный длянеопластической клетки (например, антиген, ассоциированный с неопластической или раковой клеткой), или опухолеассоциированный антиген выбран из рецептора клеточной поверхности, рецептора, связанного с ионным каналом, рецептора,

связанного с ферментом, сопряженного с протеином G рецептора, рецепторной тирозинкиназы, рецептора, ассоциированного с тирозинкиназой, подобной рецептору тирозинфосфатазы, рецепторной серин/треонинкиназы, рецепторной гуанилатциклазы, рецептора, ассоциированного с гистидинкиназой, рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) (включая ErbB1/EGFR, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 и ErbB4/HER4), рецепторов фактора роста фибробластов (FGFR) (включая FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF18 и FGF21) рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) (включая VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и PIGF), семейства рецепторов RET и рецепторов Eph (включая EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA9, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4 и EphB6), CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CFTR, CIC-1, CIC-2, CIC-4, CIC-5, CIC-7, CIC-Ka, CIC-Kb, бестрофинов, TMEM16A, рецептора GABA, рецептора глицина, переносчиков ABC, NAV1.1, NAV1.2, NAV1.3, NAV1.4, NAV1.5, NAV1.6, NAV1.7, NAV1.8, NAV1.9, рецептора сфингозин-1-фосфата (S1P1R), канала NMDA, трансмембранного белка, многопролетного трансмембранного белка, мотивов Т-клеточного рецептора; альфа-цепей Т-клеток; β-цепей Т-клеток; γ-цепей Т-клеток; δ-цепей Т-клеток; CCR7; CD3; CD4; CD5; CD7; CD8; CD11b; CD11c; CD16; CD19; CD20; CD21 ; CD22; CD25; CD28; CD34; CD35; CD40; CD45RA; CD45RO; CD52; CD56; CD62L; CD68; CD80; CD95; CD117; CD127; CD133; CD137 (4-1 BB); CD163; F4/80; IL-4Ra; Sca-1 ; CTLA4; GITR; GARP; LAP; гранзима B; LFA-1; рецептора трансферрина; NKp46, перфорина, CD4+; Th1; Th2; Th17; Th40; Th22; Th9; Tfh, канонических Treg, FoxP3+; Tr1; Th3; Treg17; $T_{RE}G$; CDCP1, NT5E, EpCAM, CEA, gpA33, муцинов, TAG-72, угольной ангидразы IX, PSMA, фолат-связывающего белка, ганглиозидов (*например,* CD2, CD3, GM2), льюис- γ^2, VEGF, VEGFR 1/2/3, αVβ3, α5β1, ErbB1/EGFR, ErbB1/HER2, ErB3, c-MET, IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANKL, FAP, тенасцина, PDL-1, BAFF, HDAC, ABL, FLT3, KIT, MET, RET, IL-1β, ALK, RANKL, mTOR, CTLA4, IL-6, IL-6R, JAK3, BRAF, PTCH, Smoothened, PIGF, ANPEP, TIMP1, PLAUR, PTPRJ, LTBR или ANTXR1, фолатного рецептора альфа (FRa), ERBB2 (Her2/neu), EphA2, IL-13Ra2, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), мезотелина, TSHR, CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII , GD2, GD3, BCMA, MUC16 (CA125), L1CAM, LeY, MSLN, IL13Rα1, L1-CAM, Tn Ag, простат-специфического мембранного антигена (PSMA), ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, рецептора а интерлейкина-11 (IL-11Ra), PSCA, PRSS21, VEGFR2, льюис-Y, CD24, рецептора тромбоцитарного фактора роста бета (PDGFR-бета), SSEA-4, CD20, MUC1, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-1, CAIX, LMP2, gplOO, bcr-abl, тирозиназы, фукозил-GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-ацетил-GD2, фолатного рецептора бета, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLACl, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-la, MAGE-A1, легумаина, HPV E6, E7, ETV6-AML, белка спермиев 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, белка гена,

связанного с главным комплексом гистосовместимости класс I (MR1), рецептора активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR), Fos-связанного антигена 1, p53, мутантного p53, простеина, сурвивина, теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутантного Ras, hTERT, точек разрыва транслокаций при саркоме, ML-IAP, ERG (слитого белка TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, рецептора андрогена, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYPIB I, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы теломеразы человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5 , IGLL1, неоантигена, CD133, CD15, CD184, CD24, CD56, CD26, CD29, CD44, HLA-A, HLA-B, HLA-C, (HLA-A, B,C) CD49f, CD151 CD340, CD200, tkrA, trkB или trkC, или их антигенного фрагмента или антигенной части.

2. АСД нацелен на антиген, характерный для Т-клетки

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен нацелен на антиген, характерный для Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления АСД связывает антиген, ассоциированный с Т-клеткой. В некоторых случаях такой антиген экспрессируется Т-клеткой или расположен на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления антиген, характерный для Т-клетки или ассоциированный с Т-клеткой антиген выбран из рецептора клеточной поверхности, белка мембранного транспорта (например, белка активного или пассивного транспорта, такого как, например, белок ионного канала, порообразующий белок и т. д.), трансмембранного рецептора, мембранного фермента и/или белка клеточной адгезии, характерного для Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления антиген, характерный для Т-клетки, может представлять собой сопряженный с протеином G рецептор, рецепторную тирозинкиназу, рецептор, ассоциированный с тирозинкиназой, подобную рецептору тирозинфосфатазу, рецепторную серин/треонинкиназу, рецепторную гуанилатциклазу, рецептор, ассоциированный с гистидинкиназой, AKT1; AKT2; AKT3; ATF2; BCL10; CALM1; CD3D (CD3δ); CD3E (CD3ε); CD3G (CD3γ); CD4; CD8; CD28; CD45; CD80 (B7-1); CD86 (B7-2); CD247 (CD3ζ); CTLA4 (CD152); ELK1; ERK1 (MAPK3); ERK2; FOS; FYN; GRAP2 (GADS); GRB2; HLA-DRA; HLA-DRB1; HLA-DRB3; HLA-DRB4; HLA-DRB5; HRAS; IKBKA (CHUK); IKBKB; IKBKE; IKBKG (NEMO); IL2; ITPR1; ITK; JUN; KRAS2; LAT; LCK; MAP2K1 (MEK1); MAP2K2 (MEK2); MAP2K3 (MKK3); MAP2K4 (MKK4); MAP2K6 (MKK6); MAP2K7 (MKK7); MAP3K1 (MEKK1); MAP3K3; MAP3K4; MAP3K5; MAP3K8; MAP3K14 (NIK); MAPK8 (JNK1); MAPK9 (JNK2); MAPK10 (JNK3); MAPK11 (p38β); MAPK12 (p38γ); MAPK13 (p38δ); MAPK14 (p38α); NCK; NFAT1; NFAT2; NFKB1; NFKB2; NFKBIA; NRAS; PAK1; PAK2; PAK3; PAK4; PIK3C2B; PIK3C3 (VPS34); PIK3CA; PIK3CB; PIK3CD; PIK3R1; PKCA; PKCB; PKCM; PKCQ; PLCY1; PRF1 (перфорин); PTEN; RAC1; RAF1; RELA; SDF1; SHP2; SLP76; SOS; SRC; TBK1; TCRA; TEC; TRAF6; VAV1; VAV2; или ZAP70.

3. АСД нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства. В некоторых вариантах осуществления АСД связывает антиген, ассоциированный с аутоиммунный или воспалительный расстройством. В некоторых случаях антиген экспрессируется клеткой, связанной с аутоиммунным или воспалительным расстройством. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное или воспалительное расстройство выбрано из хронической болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), волчанки, артрита, иммунокомплексного гломерулонефрита, синдрома Гудпасчера, увеита, гепатита, системного склероза или склеродермии, диабета I типа, рассеянного склероза, болезни холодовых агглютининов, обыкновенной пузырчатки, болезни Грейвса, аутоиммунной гемолитической анемии, гемофилии А, первичного синдрома Шегрена, тромботической тромбоцитопенической пурпуры, оптиконевромиелита, синдрома Эвана, IgM-опосредованной нейропатии, криоглобулинемии, дерматомиозита, идиопатической тромбоцитопении, анкилозирующего спондилита, буллезного пемфигоида, приобретенного ангиоотека, хронической крапивницы, антифосфолипидной демиелинизирующей полинейропатии и аутоиммунной тромбоцитопении или нейтропении или истинной эритроцитарной аплазии, тогда как неограничивающий примеры аллоиммунных заболеваний включают аллосенсибилизацию (*смотрите*, например, Blazar et al., 2015, Am. J. Transplant, 15(4):931-41) или ксеносенсибилизацию при гемопоэтической или органной трансплантации, переливании крови, беременность с аллосенсибилизацией плода, неонатальную аллоиммунную тромбоцитопению, гемолитическое заболевание новорожденных, сенсибилизацию к чужеродным антигенам, которая может возникать при лечении врожденных или приобретенных дефицитных состояний фермент- или белок-заместительной терапией, продуктами крови и генной терапией. В некоторых вариантах осуществления антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства, выбран из рецептора клеточной поверхности, рецептора, связанного с ионным каналом, рецептора, связанного с ферментом, сопряженного с протеином G рецептора, рецепторной тирозинкиназы, рецептора, ассоциированного с тирозинкиназой, подобной рецептору тирозинфосфатазы, рецепторной серин/треонинкиназы, рецепторной гуанилатциклазы или рецептора, ассоциированного с гистидинкиназой.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR связывается с лигандом, экспрессируемым на В-клетках, плазматических клетках или плазмабластах. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR связывается с CD10, CD19, CD20, CD22, CD24, CD27, CD38, CD45R, CD138, CD319, BCMA, CD28, TNF, рецепторами интерферонов, GM-CSF, ZAP-70, LFA-1, CD3 гамма, CD5 или CD2. Смотрите US 2003/0077249; WO 2017/058753; WO 2017/058850, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

4. АСД нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен нацелен на

антиген, характерный для стареющих клеток, например, рецептор активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR). В некоторых вариантах осуществления АСД связывает антиген, ассоциированный со стареющей клеткой. В некоторых случаях антиген экспрессируется стареющей клеткой. В некоторых вариантах осуществления CAR можно использовать для лечения или профилактики расстройств, характеризуемых аберрантным накоплением стареющих клеток, например, фиброза печени и легких, атеросклероза, диабета и остеоартрита.

5. АСД нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания. В некоторых вариантах осуществления АСД связывает антиген, ассоциированный с инфекционным заболеванием. В некоторых случаях антиген экспрессируется клеткой, пораженной инфекционным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления, в которых инфекционное заболевание выбрано из ВИЧ, вируса гепатита B, вируса гепатита C, вируса герпеса человека, вируса герпеса человека 8 (HHV-8, вируса герпеса, связанного с саркомой Капоши (KSHV)), Т-лимфотрофического вируса-1 человека (HTLV-1), полиомавируса клеток Меркеля (MCV), вируса обезьян 40 (SV40), вируса Эпштейна - Барр, CMV, папилломавируса человека. В некоторых вариантах осуществления антиген, характерный для инфекционного заболевания, выбран из рецептора клеточной поверхности, рецептора, связанного с ионным каналом, рецептора, связанного с ферментом, сопряженного с протеином G рецептора, рецепторной тирозинкиназы, рецептора, ассоциированного с тирозинкиназой, подобной рецептору тирозинфосфатазы, рецепторной серин/треонинкиназы, рецепторной гуанилатциклазы рецептора, ассоциированного с гистидинкиназой, HIV Env, gpl20 или CD4-индуцированного эпитопа на HIV-1 Env.

6. АСД связывается с антигеном клеточной поверхности клетки

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с антигеном клеточной поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления антиген клеточной поверхности характерен для конкретного или определенного типа клетки (например, экспрессируется ею). В некоторых вариантах осуществления антиген клеточной поверхности характерен для более чем одного типа клеток.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR связывается с антигеном клеточной поверхности, характерным для Т-клетки, таким как антиген клеточной поверхности на Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления антиген, характерный для Т-клетки, может представлять собой рецептор клеточной поверхности, белок мембранного транспорта (например, белок активного или пассивного транспорта, такой как, например, белок ионного канала, порообразующий белок и т. д.), трансмембранный рецептор, мембранный фермент и/или белок клеточной адгезии, характерный для Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления антиген, характерный для Т-клетки, может представлять собой сопряженный с протеином G рецептор, рецепторную тирозинкиназу, рецептор, ассоциированный с тирозинкиназой, подобную

рецептору тирозинфосфатазу, рецепторную серин/треонинкиназу, рецепторную гуанилатциклазу или рецептор, ассоциированный с гистидинкиназой.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR связывает Т-клеточный рецептор. В некоторых вариантах осуществления Т-клеточный рецептор может представлять собой AKT1; AKT2; AKT3; ATF2; BCL10; CALM1; CD3D (CD3δ); CD3E (CD3ε); CD3G (CD3γ); CD4; CD8; CD28; CD45; CD80 (B7-1); CD86 (B7-2); CD247 (CD3ζ); CTLA4 (CD152); ELK1; ERK1 (MAPK3); ERK2; FOS; FYN; GRAP2 (GADS); GRB2; HLA-DRA; HLA-DRB1; HLA-DRB3; HLA-DRB4; HLA-DRB5; HRAS; IKBKA (CHUK); IKBKB; IKBKE; IKBKG (NEMO); IL2; ITPR1; ITK; JUN; KRAS2; LAT; LCK; MAP2K1 (MEK1); MAP2K2 (MEK2); MAP2K3 (MKK3); MAP2K4 (MKK4); MAP2K6 (MKK6); MAP2K7 (MKK7); MAP3K1 (MEKK1); MAP3K3; MAP3K4; MAP3K5; MAP3K8; MAP3K14 (NIK); MAPK8 (JNK1); MAPK9 (JNK2); MAPK10 (JNK3); MAPK11 (p38β); MAPK12 (p38γ); MAPK13 (p38δ); MAPK14 (p38α); NCK; NFAT1; NFAT2; NFKB1; NFKB2; NFKBIA; NRAS; PAK1; PAK2; PAK3; PAK4; PIK3C2B; PIK3C3 (VPS34); PIK3CA; PIK3CB; PIK3CD; PIK3R1; PKCA; PKCB; PKCM; PKCQ; PLCY1; PRF1 (перфорин); PTEN; RAC1; RAF1; RELA; SDF1; SHP2; SLP76; SOS; SRC; TBK1; TCRA; TEC; TRAF6; VAV1; VAV2; или ZAP70.

7. Трансмембранный домен

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит по меньшей мере трансмембранную область цепи альфа, бета или дзета Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, или ее функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит по меньшей мере трансмембранную(ые) область(и) CD8α, CD8β, 4-1BB/CD137, CD28, CD34, CD4, FcεRIγ, CD16, OX40/CD134, CD3ζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, TCRα, TCRβ, TCRζ, CD32, CD64, CD64, CD45, CD5, CD9, CD22, CD37, CD80, CD86, CD40, CD40L/CD154, VEGFR2, FAS и FGFR2B или их функциональный вариант.

8. Сигнальный домен или множество сигнальных доменов

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе CAR содержит один или по меньшей мере один сигнальный домен, выбранный из одного или более из B7-1/CD80; B7-2/CD86; B7-H1/PD-L1; B7-H2; B7-H3; B7-H4; B7-H6; B7-H7; BTLA/CD272; CD28; CTLA4; Gi24/VISTA/B7-H5; ICOS/CD278; PD1; PD-L2/B7-DC; PDCD6); 4-1BB/TNFSF9/CD137; лиганда 4-1BB/TNFSF9; BAFF/BLyS/TNFSF13B; BAFF R/TNFRSF13C; CD27/TNFRSF7; лиганда CD27/TNFSF7; CD30/TNFRSF8; лиганда CD30/TNFSF8; CD40/TNFRSF5; CD40/TNFSF5; лиганда CD40/TNFSF5; DR3/TNFRSF25; GITR/TNFRSF18; лиганда GITR/TNFSF18; HVEM/TNFRSF14; LIGHT/TNFSF14; лимфотоксина-альфа/TNF-бета; OX40/TNFRSF4; лиганда OX40/TNFSF4; RELT/TNFRSF19L; TACI/TNFRSF13B; TL1A/TNFSF15; TNF-альфа; TNF RII/TNFRSF1B); 2B4/CD244/SLAMF4; BLAME/SLAMF8; CD2; CD2F-10/SLAMF9; CD48/SLAMF2; CD58/LFA-3; CD84/SLAMF5; CD229/SLAMF3; CRACC/SLAMF7; NTB-A/SLAMF6;

SLAM/CD150); CD2; CD7; CD53; CD82/Kai-1; CD90/Thy1; CD96; CD160; CD200; CD300a/LMIR1; HLA класса I; HLA-DR; Ikaros; интегрина альфа 4/CD49d; интегрина альфа 4 бета 1; интегрина альфа 4 бета 7/LPAM-1; LAG-3; TCL1A; TCL1B; CRTAM; DAP12; дектина-1/CLEC7A; DPPIV/CD26; EphB6; TIM-1/KIM-1/HAVCR; TIM-4; TSLP; TSLP R; связанного с функцией лимфоцитов антигена 1 (LFA-1); NKG2C, домена CD3 дзета, иммунорецепторного тирозинового активирующего мотива (ITAM), CD27, CD28, 4-1BB, CD134/OX40, CD30, CD40, PD1, ICOS, связанного с функцией лимфоцитов антигена 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганда, который специфически связывается с CD83, или их функционального фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один сигнальный домен содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления по меньшей мере один сигнальный домен содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления по меньшей мере один сигнальный домен содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один сигнальный домен содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два сигнальных домена содержат домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления по меньшей мере два сигнальных домена содержат (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления по меньшей мере один сигнальный домен содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два сигнальных домена содержат (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере три сигнальных домена

содержат домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления по меньшей мере три сигнальных домена содержат (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант. В других вариантах осуществления по меньшей мере три сигнальных домена содержат (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере три сигнальных домена содержат (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант, и/или (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда.

9. Домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина

В некоторых вариантах осуществления CAR первого, второго, третьего или четвертого поколения дополнительно содержит домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина. В некоторых вариантах осуществления ген цитокина является эндогенным или экзогенным для клетки-мишени, содержащей CAR, который содержит домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина. В некоторых вариантах осуществления ген

цитокина кодирует провоспалительный цитокин. В некоторых вариантах осуществления ген цитокина кодирует IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF или IFN-гамма и их функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, представляет собой или включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, представляет собой или включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент представляет собой или включает ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT), NF-kB или их функциональный домен или фрагмент. *Смотрите*, *например*, Zhang. C. et al., Engineering CAR T cells. Biomarker Research. 5:22 (2017); WO 2016126608; Sha, H. et al. Chimaeric antigen receptor T-cell therapy for tumour immunotherapy. Bioscience Reports Jan 27, 2017, 37 (1).

В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит один или болееспейсеров, например, когда спейсер представляет собой первый спейсер между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления первый спейсер содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина или ее вариант или модифицированную версию. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой второй спейсер между трансмембранным доменом и сигнальным доменом. В некоторых вариантах осуществления второй спейсер представляет собой олигопептид, например, когда олигопептид содержит остатки глицина и серина, такие как, но не ограничиваясь этим, глицин-сериновые дублеты. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит два или болееспейсеров, например, спейсер между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом и спейсер между трансмембранным доменом и сигнальным доменом.

В некоторых вариантах осуществления любая из клеток, описанных в данном документе, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR или CAR первого поколения. В некоторых вариантах осуществления CAR первого поколения содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен опосредует последующую сигнализацию во время активации Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления любая из клеток, описанных в данном документе, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR или CAR второго поколения. В некоторых вариантах осуществления CAR второго поколения содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и два сигнальных домена. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен опосредует последующую сигнализацию во время активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен представляет собой костимулирующий домен. В некоторых вариантах

осуществления костимулирующий домен усиливает выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления любая из клеток, описанных в данном документе, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR или CAR третьего поколения. В некоторых вариантах осуществления CAR третьего поколения содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен опосредует последующую сигнализацию во время активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен представляет собой костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен усиливает выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления CAR третьего поколения содержит по меньшей мере два костимулирующих домена. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два костимулирующих домена не являются одинаковыми.

В некоторых вариантах осуществления любая из клеток, описанных в данном документе, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR или CAR четвертого поколения. В некоторых вариантах осуществления CAR четвертого поколения содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два, три или четыре сигнальных домена. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен опосредует последующую сигнализацию во время активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен представляет собой костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен усиливает выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток.

10. АСД, содержащий антитело или его антигенсвязывающую часть

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR представляет собой или включает антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR представляет собой или включает scFv или Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR включает scFv или Fab-фрагмент антитела к альфа-цепи Т-клетки; антитела к β-цепи Т-клетки; антитела к γ-цепи Т-клетки; антитела к δ-цепи Т-клетки; антитела к CCR7; антитела к CD3; антитела к CD4; антитела к CD5; антитела к CD7; антитела к CD8; антитела к CD11b; антитела к CD11c; антитела к CD16; антитела к CD19; антитела к CD20; антитела к CD21; антитела к CD22; антитела к CD25; антитела к CD28; антитела к CD34; антитела к CD35; антитела к CD40; антитела к CD45RA; антитела к CD45RO; антитела к CD52; антитела к CD56; антитела к CD62L; антитела к CD68; антитела к CD80; антитела к CD95; антитела к CD117; антитела к CD127; антитела к CD133; антитела к CD137 (4-1 BB); антитела к CD163; антитела к F4/80; антитела к IL-4Ra; антитела к Sca-1; антитела к CTLA4; антитела к GITR; антитела к GARP; антитела к

LAP; антитела к гранзиму B; антитела к LFA-1; антитела к MR1; антитела к uPAR; или антитела к рецептору трансферрина.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит сигнальный домен, который представляет собой костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит второй костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит по меньшей мере два костимулирующих домена. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит по меньшей мере три костимулирующих домена. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит костимулирующий домен, выбранный из одного или более из CD27, CD28, 4-1BB, CD134/OX40, CD30, CD40, PD1, ICOS, связанного с функцией лимфоцитов антигена 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганда, который специфически связывается с CD83. В некоторых случаях CAR содержит два или более костимулирующих доменов, причем два костимулирующих домена являются разными. В некоторых случаях CAR содержит два или более костимулирующих доменов, причем два костимулирующих домена являются одинаковыми.

Помимо CAR, описанных в данном документе, в данной области техники известны различные химерные антигенные рецепторы и нуклеотидные последовательности, кодирующие их, которые подошли бы для фузосомальной доставки и перепрограммирования клеток-мишеней in vivo и in vitro, как описано в данном документе. *Смотрите*, *например*, WO2013040557; WO2012079000; WO2016030414; Smith T, et al., Nature Nanotechnology. 2017. DOI: 10.1038/NNANO.2017.57, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

11. Биспецифические CAR

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающей части, scFv и Fab. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой биспецифический CAR, содержащий два антигенсвязывающих домена, которые связывают два разных антигена. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один антигенсвязывающий домен связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из CD19, CD22 и BCMA. В определенных вариантах осуществления биспецифический CAR связывается с CD19 и CD22.

В некоторых вариантах осуществления ген, кодирующий CAR, несет лентивирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления CAR выбран из группы, состоящей из CD19-специфического CAR, CD20-специфического CAR и CD22-специфического CAR. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой биспецифический CAR. В некоторых вариантах осуществления биспецифический CAR представляет собой CD19/CD20 биспецифический CAR. В некоторых вариантах осуществления биспецифический CAR представляет собой CD19/CD22 биспецифический CAR.

C. Терапевтические клетки, полученные из Т-клеток

В данном документе предложены гипоиммуногенные клетки, включая, но не ограничиваясь этим, первичные Т-клетки, которые ускользают от иммунного распознавания. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки получены (например, созданы, культивированы или получены) из Т-клеток, таких как первичные Т-клетки. В некоторых случаях первичные Т-клетки получены (например, собраны, выделены, удалены или взяты) от субъекта или индивида. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки получены из пула Т-клеток, в котором Т-клетки получены от одного или более субъектов (например, одного или более людей, включая одного или более здоровых людей). В некоторых случаях пул Т-клеток получен от 1-100, 1-50, 1-20, 1-10, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более субъектов. В некоторых вариантах осуществления субъект-донор отличается от пациента (например, реципиента, которому вводят терапевтические клетки). В некоторых вариантах осуществления пул Т-клеток не включает клетки от пациента. В некоторых вариантах осуществления один или более субъектов-доноров, от которых получен пул Т-клеток, отличаются от пациента. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки получены из пула первичных Т-клеток от одного или более субъектов-доноров, которые отличаются от субъекта-реципиента (например, пациента, которому вводят клетки). Первичные Т-клетки могут быть получены от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100 или более субъектов-доноров и объединены вместе. Первичные Т-клетки могут быть получены от 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10, или более 20 или более, 50 или более или 100 или более субъектов-доноров и объединены вместе. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки собирают от одного или множества индивидов, а в некоторых случаях первичные Т-клетки или пул первичных Т-клеток культивируют in vitro. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки или пул первичных Т-клеток конструируют для экзогенной экспрессии CD47 и культивируют in vitro. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки или пул первичных Т-клеток конструируют для экзогенной экспрессии CD24 и культивируют in vitro.

В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки включают, но не ограничиваются этим, 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 (Tcm), эффекторные Т-клетки памяти (Tem), эффекторные Т-клетки памяти, которые экспрессируют CD45RA (клетки TEMRA), тканевые резидентные клетки памяти (Trm), Т-клетки виртуальной памяти, Т-клетки врожденной памяти, стволовые клетки памяти (Tsc), γδТ-клетки и любые другие подтипы Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки не активируют иммунный ответ у пациента (например, реципиента после введения). В данном документе

предложены способы лечения расстройства, включающие повторное введение популяции гипоиммуногенных клеток нуждающемуся в этом субъекту (например, реципиенту) или пациенту. В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных клеток (например, гипоиммуногенных первичных Т-клеток) вводят пациенту-человеку по меньшей мере дважды (например, 2, 3, 4, 5 или более). В некоторых вариантах осуществления повторное введение основано на ответе на введение гипоиммуногенных клеток. В некоторых вариантах осуществления повторное введение может происходить через 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяца или 60 месяцев или более.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки включают Т-клетки, сконструированные (например, модифицированные) для экспрессии химерного антигенного рецептора, включая, но не ограничиваясь, химерный антигенный рецептор, описанный в данном документе. В некоторых случаях Т-клетки представляют собой популяции или субпопуляции первичных Т-клеток от одного или более индивидов. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе Т-клетки, такие как сконструированные или модифицированные Т-клетки, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе Т-клетки, такие как сконструированные или модифицированные Т-клетки, имеют сниженную экспрессию белка 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4). В других вариантах осуществления описанные в данном документе Т-клетки, такие как сконструированные или модифицированные Т-клетки, имеют сниженную экспрессию белка запрограммированной клеточной гибели (PD1). В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе Т-клетки, такие как сконструированные или модифицированные Т-клетки, имеют сниженную экспрессию CTLA4 и PD1.

а. Ответ на терапевтическое лечение при раке

В некоторых вариантах осуществления повторное введение основано на ответе на введение при лечении рака. В некоторых вариантах осуществления любое положительное терапевтическое показание может свидетельствовать об ответе на лечение и может свидетельствовать о пользе повторного введения. В некоторых вариантах осуществления повторное введение происходит при наличии по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или большего ответа после введения гипоиммунных Т-клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты,

эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)).

В некоторых вариантах осуществления повторное введение можно применять для введения меньшей, такой же или большей дозы гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)).

В некоторых вариантах осуществления ответ основан на общих изменениях размера опухоли. В некоторых вариантах осуществления ответ основан на показании по меньшей мере минимального уменьшения общего размера опухоли. В некоторых вариантах осуществления ответ уменьшения размера опухоли можно использовать как показание для повторного введения. В некоторых вариантах осуществления 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% уменьшение общего размера опухоли после введения гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения.

В некоторых вариантах осуществления ответ основан на изменениях скорости роста опухоли. В некоторых вариантах осуществления ответ основан на показании по меньшей мере минимального уменьшения скорости роста опухоли. В некоторых вариантах осуществления ответ уменьшения скорости роста опухоли можно использовать как показание для повторного введения. В некоторых вариантах осуществления уменьшение скорости роста опухоли по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% после введения гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления уменьшение скорости роста опухоли по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более можно использовать как показание для

дополнительного повторного введения.

В некоторых вариантах осуществления ответ основан на метастазировании и/или прогрессировании метастазирования. В некоторых вариантах осуществления ответ основан на показании по меньшей мере минимального уменьшения метастазирования и/или прогрессирования метастазирования. В некоторых вариантах осуществления ответ уменьшения числа метастазов и/или общего прогрессирования метастазирования можно использовать как показание для повторного введения. В некоторых вариантах осуществления уменьшение числа метастазов по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% после введения HIP-клеток можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления уменьшение числа метастазов по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более после введения гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления прогрессирование метастазирования можно определять, оценивая, например, наличие или число циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) и/или число новых метастазов. В некоторых вариантах осуществления уменьшение числа новых метастазов по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% после введения HIP-клеток можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления уменьшение числа новых метастазов по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления уменьшение числа ЦОК по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% после введения гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления уменьшение числа ЦОК по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более можно использовать как показание для дополнительного повторного введения.

В некоторых вариантах осуществления ответ основан на активации Т-клеток. В

некоторых вариантах осуществления ответ повышения активации Т-клеток можно использовать как показание для повторного введения. В некоторых вариантах осуществления ответ основан на показании по меньшей мере минимального повышения активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления повышение активации Т-клеток по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% после введения гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления повышение активации Т-клеток по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более после введения гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления повышение активации Т-клеток можно определять на основании анализов цитокинов, включая, например, секрецию IFNγ, которую можно измерять методами, хорошо известными специалистам в данной области техники, включая, например, анализы на основе проточной цитометрии или ELISA.

В некоторых вариантах осуществления ответ основан на персистенции Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления ответ повышения персистенции Т-клеток можно использовать как показание для повторного введения. В некоторых вариантах осуществления ответ основан на показании по меньшей мере минимального повышения персистенции Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления повышение персистенции Т-клеток по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% после введения гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых

вариантах осуществления повышение персистенции Т-клеток по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более после введения гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления персистенцию Т-клеток можно определять на основании числа Т-клеток, присутствующих до и после введения гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления персистенция Т-клеток включает число Т-клеток, остающееся неизменным до и после введения гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления персистенция Т-клеток включает число Т-клеток, возрастающее до и после введения гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)).

В некоторых вариантах осуществления ответ основан на пролиферации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления ответ повышения пролиферации Т-клеток можно использовать как показание для повторного введения. В некоторых вариантах осуществления ответ основан на показании по меньшей мере минимального повышения пролиферации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления повышение пролиферации Т-клеток по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% после введения HIP-клеток можно использовать как

показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления повышение пролиферации Т-клеток по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более после введения гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления пролиферацию Т-клеток можно определять на основании числа Т-клеток, присутствующих до и после введения гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления пролиферацию Т-клеток определяют как увеличение числа Т-клеток до и после введения гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления увеличение числа Т-клеток по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% после введения гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), указывает на повышение пролиферации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления увеличение числа Т-клеток по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более после введения гипоиммуногенных клеток, полученных из первичных Т-клеток, или гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки,

нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), указывает на повышение пролиферации Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления ответ основан на уменьшении использования «других» терапевтических средств и/или вариантов лечения для лечения, смягчения, облегчения, ослабления и т. д. рака, для лечения которого вводили гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммунные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления ответ основан на показании по меньшей мере минимального уменьшения использования «других» терапевтических средств и/или вариантов лечения для лечения, смягчения, облегчения, ослабления и т. д. рака, для лечения которого вводили гипоиммуногенные клетки, полученные из первичных Т-клеток, или гипоиммунные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления ответ основан на уменьшении использования «других» терапевтических средств и/или вариантов лечения в контексте числа, периода времени, длительности и/или дополнительного введению «других» терапевтических средств. Такие «другие» терапевтические средства могут включать, например, стандартные варианты лечения для конкретного ракового показания.

b. Ответ на терапевтическое лечение при отличных от рака показаниях

В некоторых вариантах осуществления ответ повышения приживления можно использовать как показание для повторного введения. В некоторых вариантах осуществления ответ основан на показании по меньшей мере минимального повышения приживления. В некоторых вариантах осуществления повышение приживления по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно

использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления повышение приживления по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления приживление сохраняется в течение более длительного периода времени после введения HIP-клеток. В некоторых вариантах осуществления приживление сохраняется в течение 1 дня, 3 дней, 7 дней, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4, месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяцев, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяцев или 60 месяцев или более после введения HIP-клеток.

В некоторых вариантах осуществления ответ на основании персистенции клеток (например, сохранении числа клеток), включая приживленные клетки, можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления ответ основан на показании по меньшей мере минимального повышения персистенции клеток (например, сохранении числа клеток), включая приживленные клетки. В некоторых вариантах осуществления повышение персистенции клеток по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления повышение персистенции клеток по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления повышение персистенции клеток определяют по сохранению числа клеток, включая число привитых клеток, после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных

плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления персистенция клеток сохраняется в течение более длительного периода времени после введения HIP-клеток. В некоторых вариантах осуществления число клеток, включая число привитых клеток, сохраняется в течение 1 дня, 3 дней, 7 дней, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4, месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяцев, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяцев или 60 месяцев или более после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)).

В некоторых вариантах осуществления ответ на основании сохранения нормальной функции клеток, включая привитые клетки, а также другие клетки в организме субъекта, такие как связанные с показанием, лечение которого проводят, можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления сохранение нормальной функции клеток на уровне по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% нормальной функции после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления сохранение нормальной функции клеток после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно определять на основании числа клеток, которые сохраняют нормальную функцию, или процента нормальной функции, сохраняемого одной или более клетками. В некоторых вариантах осуществления нормальная функция сохраняется на по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% уровня нормальной функции не пораженной заболеванием клетки дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления считается, что нормальная функция сохраняется, когда по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% наблюдаемых клеток сохраняют по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% уровня нормальной функции не пораженной заболеванием клетки дикого типа. В некоторых вариантах осуществления нормальная функция или процент нормальной функции сохраняются в течение более длительного периода времени после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления нормальная функция или процент нормальной функции сохраняются в течение 1 дня, 3 дней, 7 дней, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4, месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяцев, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяцев или 60 месяцев или более после введения HIP-клеток.

В некоторых вариантах осуществления ответ основан на уменьшении использования «других» терапевтических средств и/или вариантов лечения для лечения, смягчения, облегчения, ослабления, восстановления и т. д. болезненного состояния или болезненного показания, для лечения которого вводили гипоиммунные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления ответ основан на показании по меньшей мере минимального уменьшении использования «других» терапевтических средств и/или вариантов лечения для лечения, смягчения, облегчения, ослабления и т. д. болезненного состояния или болезненного показания, для лечения которого вводили гипоиммунные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления ответ основан на уменьшении использования «других» терапевтических средств и/или вариантов лечения в контексте числа, периода времени, длительности и/или дополнительного введению «других» терапевтических средств. Такие «другие» терапевтические средства могут включать, например, стандартные варианты лечения для конкретного болезненного состояния или болезненного показания.

В некоторых вариантах осуществления ответ основан на уменьшении использования «других» терапевтических средств и/или вариантов лечения для лечения, смягчения, облегчения, ослабления, восстановления и т. д. болезненного состояния или болезненного показания, для лечения которого вводили гипоиммунные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления ответ на основании восстановления потери функции в целом по организму, связанной с показанием, лечение которого проводят, можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления ответ основан на показании по меньшей мере минимального восстановления потери функции в целом по организму, связанной с показанием, лечение которого проводят. В некоторых вариантах осуществления восстановление потери функции в целом по организму по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления восстановление потери функции в целом по организму по меньшей мере до 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% нормальной общей функции после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления восстановление потери функции в целом по организму по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для

дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления восстановление потери функции в целом по организму сохраняется в течение 1 дня, 3 дней, 7 дней, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4, месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяцев, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяцев или 60 месяцев или более после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)).

В некоторых вариантах осуществления ответ основан на уменьшении использования «других» терапевтических средств и/или вариантов лечения для лечения, смягчения, облегчения, ослабления, восстановления и т. д. болезненного состояния или болезненного показания, для лечения которого вводили гипоиммунные клетки, дифференцированные из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)). В некоторых вариантах осуществления ответ на основании смягчения болезненного состояния, связанного с показанием, лечение которого проводят, можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления ответ основан на показании по меньшей мере минимального смягчения болезненного состояния, связанного с показанием, лечение которого проводят. В некоторых вариантах осуществления смягчение болезненного состояния по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления смягчение болезненного состояния по меньшей мере до 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% нормальной общей функции после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки

щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления смягчение болезненного состояния по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз или более после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)), можно использовать как показание для дополнительного повторного введения. В некоторых вариантах осуществления восстановление потери функции в целом по организму сохраняется в течение 1 дня, 3 дней, 7 дней, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4, месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяцев, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяцев или 60 месяцев или более после введения гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)).

D. Терапевтические клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток

В данном документе предложены гипоиммуногенные клетки, включая клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток, которые ускользают от иммунного распознавания. В некоторых вариантах осуществления эти клетки не активируют иммунный ответ у пациента или субъекта (например, реципиента после введения). Предложены способы лечения расстройства, включающие повторное введение популяции гипоиммуногенных клеток нуждающемуся в этом субъекту-реципиенту, включая, например, введение гипоиммунных клеток, дифференцированных из гипоиммунных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (причем такие дифференцированные клетки включают, например, но не ограничиваются этим, Т-клетки, нейральные/нейрональные клетки, бета-клетки, гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, клетки щитовидной железы, типы островковых клеток поджелудочной железы и/или клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС)).

В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку и любую клетку, дифференцированную из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируют так, чтобы она демонстрировала сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I. В других вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку и любую клетку, дифференцированную из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируют так, чтобы она демонстрировала сниженную

экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса II. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку и любую клетку, дифференцированную из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируют так, чтобы она демонстрировала сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и II. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку и любую клетку, дифференцированную из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируют так, чтобы она демонстрировала сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и демонстрировала сниженную экспрессию CD47. В некоторых случаях клетка сверхэкспрессирует CD47 за счет наличия в ней одного или более трансгенов CD47. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку и любую клетку, дифференцированную из такой плюрипотентной стволовой клетки, модифицируют так, чтобы она демонстрировала сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и демонстрировала сниженную экспрессию CD24. В некоторых случаях клетка сверхэкспрессирует CD24 за счет наличия в ней одного или более трансгенов CD24. Такие плюрипотентные стволовые клетки являются гипоиммуногенными плюрипотентными клетками. Такие дифференцированные клетки являются гипоиммуногенными клетками.

Любую из описанных в данном документе плюрипотентных стволовых клеток можно дифференцировать в любые клетки организма и ткани. В некоторых вариантах осуществления клетка демонстрирует сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II. В некоторых случаях экспрессия лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II снижена по сравнению с немодифицированной клеткой или клеткой дикого типа того же типа. В некоторых вариантах осуществления клетки демонстрируют повышенную экспрессию CD47 или CD24. В некоторых случаях экспрессия CD47 повышена в клетках, охватываемых представленной технологией, по сравнению с немодифицированными клетками или клетками дикого типа того же типа. Способы снижения уровней лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и повышения экспрессии CD47 и CD24 описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления клетки, используемые в описанных в данном документе способах, ускользают от иммунного распознавания при введении пациенту (например, субъекту-реципиенту). Эти клетки могут ускользать от уничтожения иммунными клетками in vitro и in vivo. В некоторых вариантах осуществления эти клетки ускользают от уничтожения макрофагами и NK-клетками. В некоторых вариантах осуществления эти клетки игнорируются иммунными клетками или иммунной системой субъекта. Другими словами, клетки, вводимые в соответствии с описанными в данном документе способами, не выявляются иммунными клетками иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления эти клетки замаскированы и, следовательно избегают иммунного отторжения.

Способы определения того, ускользает ли плюрипотентная стволовая клетка и любая клетка, дифференцированная из такой плюрипотентной стволовой клетки, от

иммунного распознавания, включают, но не ограничиваются этим, анализ Elispot IFN-γ, анализ уничтожения микроглией, животные модели прививания клеток, анализ высвобождения цитокинов, ELISA, анализы уничтожения с использованием биолюминесцентной визуализации или анализ высвобождения хрома, или анализ Xcelligence, реакцию смешанной культуры лимфоцитов, иммунофлуоресцентный анализ и т. д.

Терапевтические клетки, описанные в данном документе, применимы для лечения расстройства, такого как, но не ограничиваясь этим, рак, генетическое расстройство, хроническое инфекционное заболевание, аутоиммунное заболевание, неврологическое заболевание и т. п.

E. Гипоиммуногенные клетки

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе технология относится к дифференцированным клеткам, полученным из плюрипотентных стволовых клеток (например, плюрипотентных стволовых клеток и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs)), или первичным Т-клеткам, которые сверхэкспрессируют CD24 или CD47 и имеют сниженную экспрессию или отсутствие экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или ГКГС класса II. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки (включая гипоиммунные Т-клетки и первичные Т-клетки), полученные из плюрипотентных стволовых клеток, сверхэкспрессируют CD47 и содержат геномную модификацию гена B2M. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки (включая гипоиммунные Т-клетки и первичные Т-клетки), полученные из плюрипотентных стволовых клеток, сверхэкспрессируют CD47 и содержат геномную модификацию гена CIITA. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки (включая гипоиммунные Т-клетки и первичные Т-клетки), полученные из плюрипотентных стволовых клеток, сверхэкспрессируют CD47 и содержат геномную модификацию генов B2M и CIITA. Во многих вариантах осуществления дифференцированные клетки (включая гипоиммунные Т-клетки и первичные Т-клетки) представляют собой $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, CD47tg клетки.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки и первичные Т-клетки сверхэкспрессируют CD47 и содержат геномную модификацию гена B2M. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки и первичные Т-клетки сверхэкспрессируют CD47 и содержат геномную модификацию гена CIITA. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки получают путем дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток, таких как гипоиммуногенные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Во многих вариантах осуществления гипоиммунные Т-клетки и первичные Т-клетки представляют собой $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, CD47tg клетки.

Снижение экспрессии ГКГС I и/или ГКГС II можно осуществлять, например, одним или более из следующих способов: (1) нацеливание непосредственно на полиморфные аллели HLA (HLA-A, HLA-B, HLA-C) и гены ГКГС-II; (2) удаление B2M,

что предотвратит перенос всех молекул ГКГС-I на поверхность; и/или (3) удаление компонентов энхансеосом ГКГС, таких как LRC5, RFX-5, RFXANK, RFXAP, IRF1, NF-Y (включая NFY-A, NFY-B, NFY-C) и CIITA, которые являются критическими для экспрессии HLA.

В некоторых вариантах осуществления происходит нарушение экспрессии HLA. В некоторых вариантах осуществления происходит нарушение экспрессии HLA путем нацеливания на отдельные HLA (например, нокаутирования экспрессии HLA-A, HLA-B и/или HLA-C), нацеливания на транскрипционные регуляторы экспрессии HLA (например, нокаутирования экспрессии NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP, RFXANK, NFY-A, NFY-B, NFY-C и/или IRF-1), блокирования переноса молекул ГКГС класса I на поверхность (например, нокаутирования экспрессии B2M и/или TAP1) и/или нацеливания с помощью HLA-«лезвия» (*смотрите*, например, WO2016183041).

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе стволовые клетки не экспрессируют один или более лейкоцитарных антигенов человека (например, HLA-A, HLA-B и/или HLA-C), соответствующих ГКГС-I и/или ГКГС-II и, таким образом, характеризуются как гипоиммуногенные. Например, в некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе стволовые клетки были модифицированы таким образом, чтобы стволовые клетки или полученные из них дифференцированные стволовые клетки не экспрессировали или не демонстрировали сниженную экспрессию одной или более из следующих молекул ГКГС-I: HLA-A, HLA-B и HLA-C. В некоторых вариантах осуществления 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.

В некоторых вариантах осуществления гРНК, которые позволяют одновременно удалять все аллели ГКГС класса I путем нацеливания на консервативную область в генах HLA, определены как HLA-«лезвия». В некоторых вариантах осуществления гРНК являются частью системы CRISPR. В некоторых вариантах осуществления гРНК являются частью системы TALEN. В некоторых вариантах осуществления HLA-«лезвие», нацеленное на идентифицированную консервативную область в HLA, описано в WO2016183041. В некоторых вариантах осуществления используют несколько HLA-«лезвий», нацеленных на идентифицированные консервативные области. Общеизвестно, что любая нРНК, нацеленная на консервативную область в HLA, может действовать как HLA-«лезвие».

В определенных вариантах осуществления дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток, сверхэкспрессируют CD24 и содержат геномную модификацию гена B2M. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток, сверхэкспрессируют CD24 и содержат геномную модификацию гена CIITA. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных

стволовых клеток, сверхэкспрессируют CD24 и содержат геномные модификации генов B2M и CIITA.

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе технология относится к Т-клеткам, которые сверхэкспрессируют CD24 или CD47 и имеют сниженную экспрессию или отсутствие экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или ГКГС класса II. Клетки, описанные в данном документе, сверхэкспрессируют CD24 или CD47 и ускользают от иммунного распознавания. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки, плюрипотентные стволовые клетки и дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток, демонстрируют сниженные уровни или сниженную активность антигенов ГКГС класса I и/или антигенов ГКГС класса II. В определенных вариантах осуществления первичные Т-клетки сверхэкспрессируют CD47 и содержат геномную модификацию гена B2M. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки сверхэкспрессируют CD47 и содержат геномную модификацию гена CIITA. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки сверхэкспрессируют CD47 и содержат геномные модификации генов B2M и CIITA. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки сверхэкспрессируют CD24 и содержат геномную модификацию гена B2M. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки сверхэкспрессируют CD24 и содержат геномную модификацию гена CIITA. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки сверхэкспрессируют CD24 и содержат геномные модификации генов B2M и CIITA.

Типовые первичные Т-клетки по настоящему изобретению выбраны из группы, состоящей из цитотоксических Т-клеток, хелперных Т-клеток, Т-клеток памяти, регуляторных Т-клеток, инфильтрирующих ткани лимфоцитов и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки представляют собой модифицированные первичные Т-клетки. В некоторых случаях модифицированная Т-клетка содержит модификацию, приводящую к тому, что клетка экспрессирует по меньшей мере один химерный антигенный рецептор, который специфически связывается с представляющим интерес антигеном или эпитопом, экспрессируемым на поверхности по меньшей мере одной из поврежденной клетки, диспластической клетки, инфицированной клетки, иммуногенной клетки, воспаленной клетки, злокачественной клетки, метапластической клетки, мутантной клетки и их комбинаций. В других случаях модифицированная Т-клетка содержит модификацию, приводящую к тому, что клетка экспрессирует по меньшей мере один белок, который модулирует представляющий интерес биологический эффект в соседних клетке, ткани или органе, когда клетка находится вблизи с соседними клеткой, тканью или органом. Применимые модификации первичных Т-клеток подробно описаны в US2016/0348073 и WO2020/018620, описания которых в полном объеме включены в данный документ. Предложенные в данном документе способы применимы для активации или абляции экспрессии ГКГС класса I и/или экспрессии ГКГС класса II в клетках, таких как, но не ограничиваясь этим,

плюрипотентные стволовые и первичные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления также используют технологии редактирования генома спомощью редкощепящих эндонуклеаз (например, системы CRISPR/Cas, TALEN, цинк-пальцевой нуклеазы, мегануклеазы и хоминг эндонуклеазы) для снижения или устранения экспрессии критических иммунных генов (например, путем удаления геномной ДНК критических иммунных генов) в клетках. В определенных вариантах осуществления используют технологии редактирования генома или другие технологии модуляции генов для введения факторов, индуцирующих толерантность, в человеческие клетки, превращая их и полученные из них дифференцированные клетки в гипоиммуногенные клетки. Таким образом, гипоиммуногенные клетки снижают или устраняют экспрессию ГКГС I и экспрессию ГКГС II. В некоторых вариантах осуществления клетки являются неиммуногенными (например, не индуцируют иммунный ответ) у субъекта-реципиента.

Технологии редактирования генома позволяют создавать двухцепочечные разрывы ДНК в необходимых сайтах локуса. Эти контролируемые двухцепочечные разрывы способствуют гомологичной рекомбинации в конкретных сайтах локуса. Этот процесс сфокусирован на нацеливании на конкретные последовательности молекул нуклеиновых кислот, таких как хромосомы, с помощью эндонуклеаз, которые распознают и связывают последовательности и индуцируют двухцепочечный разрыв в молекуле нуклеиновой кислоты. Репарация двухцепочечного разрыва происходит посредством подверженного ошибкам негомологичного соединения концов (НГСК) или гомологичной рекомбинации (ГР).

При практической реализации некоторых вариантов осуществления можно применять, если специально не указано иное, традиционные методы химии, биохимии, органической химии, молекулярной биологии, микробиологии, технологии рекомбинантных ДНК, генетики, иммунологии и клеточной биологии, которые находятся в компетенции специалистов в данной области техники, многие из которых описаны ниже в иллюстративных целях. Такие технологии подробно описаны в литературе. *Смотрите*, 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, обновление от июля 2008 г.); 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.

В данном документе предложены клетки, содержащие модификацию одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию ГКГС I и/или ГКГС II. В некоторых вариантах осуществления модификация включает повышение экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления клетки содержат экзогенный или рекомбинантный полипептид CD47. Также в данном документе предложены клетки, содержащие модификацию одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию ГКГС I и/или ГКГС II. В некоторых вариантах осуществления модификация включает повышение экспрессии CD24. В некоторых вариантах осуществления клетки содержат экзогенный или рекомбинантный полипептид CD24. В некоторых вариантах осуществления клетка также содержит модификацию для повышения экспрессии одного белка, выбранного из группы, состоящей из CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CCl21 и Mfge8. В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит толерогенный фактор (например, иммуномодулирующую молекулу), выбранный из группы, состоящей из DUX4, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CCl21 и Mfge8.

В некоторых вариантах осуществления клетка содержит геномную модификацию одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию ГКГС I и/или ГКГС II. В некоторых вариантах осуществления используют систему генетического редактирования 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 и CIITA. В некоторых случаях целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой NLRC5. В определенных вариантах осуществления геном клетки был изменен для уменьшения количества или устранения критических компонентов экспрессии HLA.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка или популяция клеток, содержащих геном, в котором был отредактирован ген для удаления непрерывного участка геномной ДНК, что, таким образом, обеспечивает снижение или устранение поверхностной экспрессии молекул ГКГС класса I в клетке или популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка или популяция клеток, содержащих геном, в котором был отредактирован ген для удаления непрерывного участка геномной ДНК, что, таким образом, обеспечивает снижение или устранение поверхностной экспрессии молекул ГКГС класса II в клетке или популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка или популяция клеток, содержащих геном, в котором были отредактированы один или более генов для удаления непрерывного участка геномной ДНК, что, таким образом, обеспечивает снижение или устранение поверхностной экспрессии молекул ГКГС класса I и II в клетке или популяции клеток.

В определенных вариантах осуществления экспрессию ГКГС I или ГКГС II модулируют путем нацеливания на непрерывный участок геномной ДНК и его удаления с целью снижения или устранения экспрессии целевого гена, выбранного из группы, состоящей из B2M и CIITA. В других случаях целевой ген представляет собой NLRC5.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки и способы включают геномное редактирование человеческих клеток для расщепления последовательностей гена CIITA, а также редактирование генома таких клеток для изменения одной или более дополнительных целевых полинуклеотидных последовательностей, таких как, но не ограничиваясь этим, B2M и NLRC5. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки и способы включают геномное редактирование человеческих клеток 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 этим, CIITA и NLRC5. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки и способы включают геномное редактирование человеческих клеток 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 этим, B2M и CIITA.

F. CD47

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены клетка или популяция клеток, которые были модифицированы для экспрессии толерогенного фактора (например, иммуномодулирующего полипептида) CD47. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки для экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка экспрессирует экзогенный CD47. В некоторых случаях клетка экспрессирует экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий полипептид CD47. В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе гипоиммуногенные клетки генетически модифицируют для включения одного или более экзогенных полинуклеотидов, вставленных в один или более геномных локусов гипоиммуногенной клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид, вставленный в один или более геномных локусов гипоиммуногенной клетки, кодирует полипептиды CD47.

CD47 представляет собой лейкоцитарный поверхностный антиген и играет роль в клеточной адгезии и модуляции интегринов. Он экспрессируется на поверхности клетки и подает сигнал циркулирующим макрофагам «не есть» эту клетку.

В некоторых вариантах осуществления клетка, описанная в данном документе, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD47, который имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности (например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с аминокислотной последовательностью, приведенной в

эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001768.1 и NP_942088.1. В некоторых вариантах осуществления клетка, описанная в данном документе, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD47, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001768.1 и NP_942088.1. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность для CD47, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с последовательностью, приведенной в эталонных последовательностях NCBI №№ NM_001777.3 и NM_198793.2. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность для CD47, приведенную в эталонных последовательностях NCBI №№ NM_001777.3 и NM_198793.2.

В некоторых вариантах осуществления клетка содержит полипептид CD47, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности (например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с аминокислотной последовательностью, приведенной в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001768.1 и NP_942088.1. В некоторых вариантах осуществления клетка, описанная в данном документе, содержит полипептид CD47, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001768.1 и NP_942088.1.

В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка CD47 проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку CD47. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия мРНК экзогенного CD47 используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

G. CD24

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены клетка или популяция клеток, которые были модифицированы для экспрессии толерогенного фактора (например, иммуномодулирующего полипептида) CD24. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки для экспрессии CD24. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка экспрессирует экзогенный CD24. В некоторых случаях клетка экспрессирует экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий полипептид CD24. В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе гипоиммуногенные клетки генетически модифицируют для включения одного или более экзогенных полинуклеотидов, вставленных в один или более геномных локусов гипоиммуногенной клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенный полинуклеотид, вставленный в один или более геномных локусов гипоиммуногенной клетки, кодирует полипептиды CD24.

CD24, который также называется термостабильным антигеном или антигеном кластера 4 мелкоклеточного рака легкого, представляет собой гликозилированный гликозилфосфатидилинозитол-заякоренный поверхностный белок (Pirruccello et al., J Immunol, 1986, 136, 3779-3784; Chen et al., Glycobiology, 2017, 57, 800-806). Он

связывается с Siglec-10 на клетках врожденного иммунитета. Недавно было показано, что CD24 посредством Siglec-10 действуетк ак контрольная точка врожденного иммунитета (Barkal et al., Nature, 2019, 572, 392-396).

В некоторых вариантах осуществления клетка, описанная в данном документе, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD24, который имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности (например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с аминокислотной последовательностью, приведенной в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001278666.1, NP_001278667.1, NP_001278668.1 и NP_037362.1. В некоторых вариантах осуществления клетка, описанная в данном документе, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD24, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001278666.1, NP_001278667.1, NP_001278668.1 и NP_037362.1.

В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с последовательностью, приведенной в эталонных последовательностях NCBI №№ NM_00129737.1, NM_00129738.1, NM_001291739.1 и NM_013230.3. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в эталонных последовательностях NCBI №№ NM_00129737.1, NM_00129738.1, NM_001291739.1 и NM_013230.3.

В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка CD24 проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку CD24. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия мРНК экзогенного CD24 используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

H. CIITA

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе технология позволяет модулировать (например, снижать или устранять) экспрессию генов ГКГС II путем нацеливания и модуляции (например, снижения или устранения) экспрессии трансактиватора класса II (CIITA). В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с помощью системы CRISPR/Cas. CIITA является членом семейства белков богатых лейцином повторов (БЛП) ДП или нуклеотидсвязывающего домена (НСД) и регулирует транскрипцию ГКГС II путем связывания с энхансеосомой ГКГС.

В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящей технологии представляет собой вариант CIITA. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог CIITA. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог CIITA.

В некоторых вариантах осуществления сниженная или устраненная экспрессия CIITA снижает или устраняет экспрессию одного или более из следующих ГКГС класса II:

HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ и HLA-DR.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген CIITA. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеливающая на ген CIITA редкощепящую эндонуклеазу, включает белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген CIITA. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген CIITA выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:5184-36352 из таблицы 12 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать иммунный ответ у субъекта-реципиента.

Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген CIITA, известны и описаны в данном документе. В одном варианте осуществления результирующую генетическую модификацию гена CIITA с помощью ПЦР и снижение экспрессии HLA-II можно анализировать с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка CIITA проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку CIITA. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

I. B2M

В определенных вариантах осуществления описанная в данном документе технология позволяет модулировать (например, снижать или устранять) экспрессию генов ГКГС-I путем нацеливания и модуляции (например, снижения или устранения) экспрессии вспомогательной цепи B2M. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с помощью системы CRISPR/Cas. За счет модуляции (например, снижения или устранения) экспрессии B2M блокируется направленная миграция молекул ГКГС-I и клетка становится гипоиммуногенной. В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать иммунный ответ у субъекта-реципиента.

В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность по настоящей технологии представляет собой вариант B2M. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог B2M. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог B2M.

В некоторых вариантах осуществления снижение или устранение экспрессии B2M снижает или устраняет экспрессию одной или более из следующих молекул ГКГС I - HLA-A, HLA-B и HLA-C.

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, приведена в эталонных последовательностях № NM_004048.4 и Genbank № AB021288.1. В некоторых случаях локус гена B2M описан в NCBI Gene ID № 567. В определенных случаях аминокислотная последовательность B2M приведена как NCBI GenBank № BAA35182.1. Дополнительные описания белка и локуса гена B2M можно найти в Uniprot № P61769, HGNC Ref. No. 914 и OMIM Ref. № 109700.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген B2M. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеливающая на ген B2M редкощепящую эндонуклеазу, включает белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген B2M. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген B2M выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:81240-85644 из таблицы 15 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген B2M, известны и описаны в данном документе. В одном варианте осуществления результирующую генетическую модификацию гена B2M с помощью ПЦР и снижение экспрессии HLA-I можно анализировать с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка B2M проводят методом 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).

J. Дополнительные толерогенные факторы

В определенных вариантах осуществления в клетки с отредактированным геномом можно вставлять или повторно вставлять один или более толерогенных факторов для создания иммунно-привилегированных универсальных донорных клеток, таких как универсальные донорные стволовые клетки, универсальные донорные Т-клетки или универсальные донорные клетки. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки, описанные в данном документе, были дополнительно модифицированы для экспрессии одного или более толерогенных факторов. Типовые толерогенные факторы включают, без ограничения, один или более из DUX4, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CCl21 и Mfge8. В некоторых вариантах осуществления толерогенные факторы выбраны из группы, состоящей из CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CCl21 и Mfge8. В некоторых вариантах осуществления толерогенные факторы выбраны из группы,

состоящей из DUX4, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, C1-ингибитора и IL-35. В некоторых вариантах осуществления толерогенные факторы выбраны из группы, состоящей из HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, C1-ингибитора и IL-35.

В некоторых случаях используют систему редактирования генов, такую как система CRISPR/Cas, для облегчения вставки толерогенных факторов, например вставки толерогенных факторов в безопасный локус, такой как локус AAVS 1, для активного ингибирования иммунного отторжения. В некоторых случаях толерогенные факторы вставляют в безопасный локус, используя экспрессионный вектор.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (например, первичная Т-клетка и гипоиммуногенная стволовая клетка и ее производное) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном клетки был модифицирован для экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки для экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки CD47 в линию клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:200784-231885 из таблицы 29 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (например, первичная Т-клетка и гипоиммуногенная стволовая клетка и ее производное) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном клетки был модифицирован для экспрессии HLA-C. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки с целью экспрессии HLA-C. В некоторых вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки HLA-C в линию клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:3278-5183 из таблицы 10 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (например, первичная Т-клетка и гипоиммуногенная стволовая клетка и ее производное) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном клетки был модифицирован для экспрессии HLA-E. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки с целью экспрессии HLA-E. В некоторых вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки HLA-E в линию клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:189859-193183 из

таблицы 19 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (например, первичная Т-клетка и гипоиммуногенная стволовая клетка и ее производное) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном клетки был модифицирован для экспрессии HLA-F. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки с целью экспрессии HLA-F. В некоторых вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки HLA-F в линию клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:688808-399754 из таблицы 45 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (например, первичная Т-клетка и гипоиммуногенная стволовая клетка и ее производное) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном клетки был модифицирован для экспрессии HLA-G. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки с целью экспрессии HLA-G. В некоторых вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки HLA-G в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:188372-189858 из таблицы 18 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (например, первичная Т-клетка и гипоиммуногенная стволовая клетка и ее производное) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном клетки был модифицирован для экспрессии PD-L1. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки для экспрессии PD-L1. В определенных вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки PD-L1 в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:193184-200783 из таблицы 21 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (например, первичная Т-клетка и гипоиммуногенная стволовая клетка и ее производное) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном клетки был модифицирован для экспрессии CTLA4-Ig. В некоторых вариантах осуществления в

настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки с целью экспрессии CTLA4-Ig. В некоторых вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки CTLA4-Ig в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из любой из описанных в WO2016183041, включая перечень последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (например, первичная Т-клетка и гипоиммуногенная стволовая клетка и ее производное) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном клетки был модифицирован для экспрессии CI-ингибитора. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки с целью экспрессии CI-ингибитора. В некоторых вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки CI-ингибитора в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из любой из описанных в WO2016183041, включая перечень последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (например, первичная Т-клетка и гипоиммуногенная стволовая клетка и ее производное) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном клетки был модифицирован для экспрессии IL-35. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки для экспрессии IL-35. В определенных вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки IL-35 в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из любой из описанных в WO2016183041, включая перечень последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления толерогенные факторы экспрессируют в клетке, используя экспрессионный вектор. Например, экспрессионный вектор для экспрессии CD47 в клетке содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую CD47. Экспрессионный вектор может представлять собой индуцибельный экспрессионный вектор. Экспрессионный вектор может представлять собой вирусный вектор, такой как, но не ограничиваясь этим, лентивирусный вектор.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка (например, первичная Т-клетка и гипоиммуногенная стволовая клетка и ее производное) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном клетки был модифицирован для экспрессии любого из полипептидов, выбранных 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, HELIOS и IDO1. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома клетки с целью экспрессии любого из полипептидов, выбранных 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, HELIOS и IDO1. В некоторых вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки выбранного полипептида в линию стволовых клеток. В некоторых осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из любой из описанных в приложениях 1-47 и перечне последовательностей WO2016183041, описание которой включено в данный документ посредством ссылки.

K. Методы генетической модификации

В некоторых вариантах осуществления редкощепящую эндонуклеазу вносят в клетку, содержащую целевую полинуклеотидную последовательность, в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей редкощепящую эндонуклеазу. Процесс внесения нуклеиновых кислот в клетки можно осуществлять любым подходящим способом. Подходящие способы включают опосредованную фосфатом кальция или липидами трансфекцию, электропорацию и трансдукцию или инфицирование с помощью вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает модифицированную ДНК, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает мРНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает модифицированную мРНК, описанную в данном документе (например, синтетическую модифицированную мРНК).

Представленная технология предусматривает изменение целевых полинуклеотидных последовательностей любым способом, доступным специалисту в данной области техники, с использованием системы CRISPR/Cas. Можно использовать любую систему CRISPR/Cas, способную изменять целевую поинуклеотидную последовательность в клетке. В таких системах CRISPR-Cas можно использовать ряд белков Cas (Haft et al. PLoS Comput Biol. 2005; 1(6)e60). Молекулярная машиненрия таких белков Cas, которая 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.

Системы CRISPR/Cas можно использовать для изменения любой целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. Специалистам в данной области техники будет понятно, что необходимые целевые полинуклеотидные последовательности, подлежащие изменению в любой конкретной клетке, могут соответствовать любой геномной последовательности, в случае которой экспрессия геномной последовательности связана с расстройством или иным образом способствует проникновению патогена в клетку. Например, необходимая целевая полинуклеотидная последовательность для изменения в клетке может представлять собой полинуклеотидную последовательность, соответствующую геномной последовательности, которая содержит связанный с заболеванием единичный полинуклеотидный полиморфизм. В таком примере системы CRISPR/Cas можно использовать для коррекции ОНП, связанного с заболеванием, в клетке путем замены его аллелью дикого типа. В качестве другого примера, полинуклеотидная последовательность целевого гена, который отвечает за проникновение патогена в клетку или его пролиферацию, может быть подходящей мишенью для делеции или вставки с целью нарушения функции целевого гена для предотвращения проникновения патогена в клетку или его пролиферации внутри клетки.

В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой геномную последовательность. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой человеческую геномную последовательность. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой геномную последовательность млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой геномную последовательность позвоночного.

В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas содержит белок Cas и по меньшей мере одну или две рибонуклеиновые кислоты, которые способны направлять белок Cas и гибридизоваться с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности. В контексте данного документа термины «белок» и «полипептид» используются взаимозаменяемо для обозначения ряда аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями (т. е. полимера из аминокислот), и включают модифицированные аминокислоты (например, фосфорилированные, гликированные, гликозилированные, др.) и аминокислотные аналоги. Типовые полипептиды или белки включают генные продукты, встречающиеся в природе белки, гомологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги вышеперечисленного.

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 снижать протеолитическую деградацию и/или увеличивать период полужизни полипептида в

клетке. В некоторых вариантах осуществления белок Cas может содержать замещение пептидной связи (например, мочевину, тиомочевину, 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 для включения фрагмента (например, ПЭГилирование, гликозилирование, липидирование, ацетилирование, кэпирование концов и т. д.).

В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает коровый белок Cas. Типовые коровые белки Cas включают, но не ограничиваются этим, 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). Типовые белки Cas подтипа E. Coli включают, но не ограничиваются этим, Cse1, Cse2, Cse3, Cse4 и Cas5e. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа Ypest (также известный как CASS3). Типовые белки Cas подтипа Ypest включают, но не ограничиваются этим, Csy1, Csy2, Csy3 и Csy4. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа Nmeni (также известный как CASS4). Типовые белки Cas подтипа Nmeni включают, но не ограничиваются этим, Csn1 и Csn2. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа Dvulg (также известный как CASS1). Типовые белки Cas подтипа Dvulg включают, но не ограничиваются этим, Csd1, Csd2 и Cas5d. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа Tneap (также известный как CASS7). Типовые белки Cas подтипа Tneap включают, но не ограничиваются этим, Cst1, Cst2, Cas5t. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа Hmari. Типовые белки Cas подтипа Hmari включают, но не ограничиваются этим, Csh1, Csh2 и Cas5h. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа Apern (также известный как CASS5). Типовые белки Cas подтипа Apern включают, но не ограничиваются этим, Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5 и Cas5a. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа Mtube (также известный как CASS6). Типовые белки Cas подтипа Mtube включают, но не ограничиваются этим, Csm1, Csm2, Csm3, Csm4 и Csm5. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas модуля RAMP. Типовые белки Cas модуля RAMP включают, но не ограничиваются этим, Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5 и Cmr6. *Смотрите*, *например*, Klompe et al., Nature 571, 219-225 (2019); Strecker et al., Science 365, 48-53 (2019).

В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает любой из белков Cas, описанных в данном документе, или его функциональную часть. В контексте данного документа термин «функциональная часть» относится к части пептида, которая сохраняет свою способность образовывать комплекс по меньшей мере с одной рибонуклеиновой кислотой (например, гидовая РНК (гРНК)) 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 (также известного Cpf1), 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.

В некоторых вариантах осуществления экзогенный белок Cas можно вносить в клетку в форме полипептида. В некоторых вариантах осуществления белки Cas можно конъюгировать или сливать с проникающим в клетки полипептидом или проникающим в клетки пептидом. В контексте данного документа термины «проникающий в клетку полипептид» и «проникающий в клетку пептид» относятся к полипептиду или пептиду, соответственно, которые облегчают поглощение молекулы клеткой. Проникающие в клетки полипептиды могут содержать выявляемую метку.

В некоторых вариантах осуществления белки Cas можно конъюгировать или сливать с заряженным белком (например, который несет положительный, отрицательный или в целом нейтральный электрический заряд). Такая связь может быть ковалентной. В некоторых вариантах осуществления белок Cas можно сливать с суперположительно заряженным ЗФБ для существенного повышения способности белка Cas проникать в клетку (Cronican et al. ACS Chem Biol. 2010; 5(8):747-52). В некоторых вариантах осуществления белок Cas можно сливать с доменом белковой трансдукции (ДБТ) с целью облегчения его проникновение в клетку. Типовые ДБТ 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 ДБТ. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с доменом tat. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с доменом олигоаргинина. 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 ЗФБ. 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 ДБТ. В некоторых вариантах осуществления белок

Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с доменом tat. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с доменом олигоаргинина. 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 ЗФБ.

В некоторых вариантах осуществления белок Cas можно вносить в клетку, содержащую целевую полинуклеотидную последовательность, в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas. Процесс внесения нуклеиновых кислот в клетки можно осуществлять любым подходящим способом. Подходящие способы включают опосредованную фосфатом кальция или липидами трансфекцию, электропорацию и трансдукцию или инфицирование с помощью вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает модифицированную ДНК, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает мРНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает модифицированную мРНК, описанную в данном документе (например, синтетическую модифицированную мРНК).

В некоторых вариантах осуществления белок Cas образует комплекс с одной или 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, описанной в данном документе, (например, синтетической модифицированной мРНК).

Способы по представленной 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 tracrРНК. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из рибонуклеиновых кислот содержит CRISPR РНК (crРНК). В некоторых вариантах осуществления одна рибонуклеиновая кислота содержит гидовую РНК, которая направляет белок Cas и гибридизируются с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота содержит гидовую РНК, которая направляет белок Cas и гибридизируются с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. В некоторых вариантах осуществления обе из одной или двух рибонуклеиновых кислот содержат гидовую РНК, которая направляет белок Cas и гибридизируются с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. Рибонуклеиновые кислоты можно выбирать так, чтобы они гибридизировались с рядом

разных целевых мотивов, в зависимости от конкретной используемой системы CRISPR/Cas и последовательности целевого полинуклеотида, как понятно специалистам в данной области техники. Чтобы минимизировать гибридизацию с последовательностями нуклеиновых кислот, отличными от целевой полинуклеотидной последовательности, также можно выбрать одну или две рибонуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты гибридизируются 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 осуществления каждая из одной или двух рибонуклеиновых кислот сконструирована для гибридизации с целевыми мотивами, непосредственно примыкающим к мотивам дезоксирибонуклеиновой кислоты, распознаваемым белком Cas, фланкирующим мутантную аллель, расположенную между целевыми мотивами.

В некоторых вариантах осуществления каждая из одной или двух рибонуклеиновых кислот содержит гидовые РНК, которые направляют белок Cas и гибридизируются с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности в клетке.

В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, гидовые РНК) комплементарны и/или гибридизируются с последовательностями в одной и той же цепи целевой полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, гидовые РНК) комплементарны и/или гибридизируются с последовательностями из противоположных цепей целевой полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, гидовые РНК) не комплементарны и/или не гибридизируются с последовательностями из противоположных цепей целевой полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, гидовые РНК) комплементарны и/или гибридизируются с перекрывающимися целевыми мотивами целевой полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, гидовые РНК) комплементарны и/или гибридизируются с выступающими целевыми мотивами целевой полинуклеотидной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие белок Cas, и нуклеиновые кислоты, кодирующие по меньшей мере одну или две

рибонуклеиновые кислоты, вносят 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, описанной в данном документе, (например, синтетической модифицированной мРНК).

Типовые последовательности гРНК, применимые для нацеливания на гены с помощью CRISPR/Cas, описанного в данном документе, приведены в таблице 1. Эти последовательности можно найти в WO2016183041, поданной 9 мая 2016 г., раскрытие которой, включая таблицы, приложения и перечень последовательностей, в полном объеме 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

В некоторых вариантах осуществления клетки по представленной технологии

создают, используя методологии с использованием нуклеаз на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN).

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 TALE-нуклеаза представляет собой TALE-нуклеазу, для димеризации которой не требуется специфическое распознавание и расщепление, такую как слияния сконструированных повторов TAL с каталитическим доменом I-TevI, описанные в WO2012138927. Эффектор, подобный активатору транскрипции (TALE), представляет собой белки бактериального вида Xanthomonas, содержащие множество повторяющихся последовательностей, причем каждый повтор содержит два остатка в позициях 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 можно получать из новых модульных белков, недавно открытых заявителем в другом виде бактерий. Преимущество новых модульных белков заключается в том, что они демонстрируют большую изменчивость последовательностей, чем повторы TAL. Предпочтительно RVD, связанные с распознаванием разных 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 можно заменять другими аминокислотными остатками, 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.

В некоторых вариантах осуществления клетки подвергают манипуляциям с помощью цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN). «Цинк-пальцевой связывающий белок» представляет собой белок или полипептид, который связывает ДНК, РНК и/или белок, предпочтительно специфичным в отношении последовательности образом, в результате стабилизации структуры белка посредством координации ионом цинка. Термин цинк-

пальцевой связывающий белок часто сокращенно называют цинк-пальцевым белком или ZFP. Отдельные ДНК-связывающие домены, как правило, 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, как правило, три или четыре пары оснований ДНК. ZFP связывается с последовательностью нуклеиновой кислоты, называемой целевым сайтом или целевым сегментом. Каждый палец, как правило, содержит приблизительно 30 аминокислот, цинк-хелатирующий, ДНК-связывающий субдомен. Исследования показали, что один цинковый палец этого класса состоит из альфа-спирали, содержащей два инвариантных гистидиновых остатка, координационно связанных с цинком, наряду с двумя цистеиновыми остатками одного бета-изгиба (смотрите, например, Berg & Shi, Science 271:1081-1085 (1996)).

В некоторых вариантах осуществления клетки получают, используя 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, распознавая целевые сайты ДНК длиной от 12 до 45 пар оснований (п. о.), обычно в диапазоне от 14 до 40 п. о. Хоминг-эндонуклеаза может например соответствовать эндонуклеазе LAGLIDADG, эндонуклеазе HNH или эндонуклеазе GIY-YIG. Предпочтительная хоминг-эндонуклеаза может представлять собой вариант I-CreI.

В некоторых вариантах осуществления клетки получают, используя мегануклеазу. Мегануклеазы по определению представляют собой специфические в отношении 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; Choulika 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).

В некоторых вариантах осуществления клетки получают, используя РНК-сайленсинг или РНК-интерференцию (РНКи) для нокдауна (например, снижения, устранения или ингибирования) экспрессии полипептида, такого как толерогенный фактор. Применимые методы РНКи включают те, в которых используют синтетические молекулы РНКи, короткие интерферирующие РНК (киРНК), PIWI-взаимодействующие NRAs (piРНК), короткие шпилечные РНК (кшРНК), микроРНК (микро-РНК) и другие способы осуществления временного нокдауна, известные специалистам в данной области техники. Реагенты для РНК-интерференции, включая специфические в отношении последовательности кшРНК, киРНК, микроРНК и т. п., являются коммерчески доступными. Например, нокдаун CIITA в плюрипотентной стволовой клетке можно

осуществлять посредством внесения киРНК CIITA или трансдукции вируса экспрессирующего кшРНК CIITA, в клетку. В некоторых вариантах осуществления РНК-интерференцию используют для снижения или ингибирования экспрессии по меньшей мере одного белка, выбранного из группы, состоящей из CIITA, B2M и NLRC5.

L. Сверхэкспрессия толерогенных факторов

В случае всех этих технологий используют хорошо известные рекомбинантные технологии для создания рекомбинантных нуклеиновых кислот, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие толерогенный фактор, могут быть функционально связаны с одной или более регуляторными нуклеотидными последовательностями в экспрессионной конструкции. Регуляторные нуклеотидные последовательности, как правило, подходят для клетки-хозяина и субъекта-реципиента, подлежащих лечению. В данной области техники известны многочисленные типы соответствующих экспрессионных векторов и подходящих регуляторных последовательностей для различных клеток-хозяев. Как правило, одна или более регуляторных нуклеотидных последовательностей могут содержать, но не ограничиваются этим, 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 предусмотрены конститутивные или индуцибельные промоторы, известные в данной области техники. Промоторы могут быть встречающимися в природе промоторами или гибридными промоторами, в которых объединены элементы более чем одного промотора. Экспрессионная конструкция может присутствовать в клетке в эписоме, такой как плазмида, или экспрессионная конструкция может быть вставлена в хромосому. В конкретном варианте осуществления экспрессионный вектор содержит ген селективного маркера, позволяющий осуществлять отбор трансформированных клеток-хозяев. Определенные варианты осуществления включают экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариантный полипептид, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью. Регуляторные последовательности для применения в данном документе включают промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии. В некоторых вариантах осуществления экспрессионный вектор предназначен для отбора трансформируемой клетки-хозяина, конкретного варианта полипептида, который необходимо экспрессировать, числа копий вектора, способности контролировать это число копий или экспрессии любого другого белка, кодируемого вектором, например, антибиотических маркеров.

Примеры подходящих промоторов млекопитающих включают, например, промоторы из следующих генов: промотор убиквитина/S27a хомяка (WO 97/15664), ранний промотор вакуолизирующего вируса обезьян 40 (SV40), главный поздний промотор аденовируса, промотор металлотионеина-I мыши, область длинных концевых

повторов вируса саркомы Рауса (RSV), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), область длинных концевых повторов вируса лейкоза мышей 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-хозяевах млекопитающих можно получать 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 вирус обезьян 40 (SV40). В дополнительных вариантах осуществления используют гетерологичные промоторы млекопитающих. Примеры включают промотор актина, промотор иммуноглобулина и промоторы теплового шока. 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)). Немедленно ранний промотор цитомегаловируса человека удобно получать в виде фрагмента рестрикционного фермента HindIII E (Greenaway et al., Gene 18: 355-360 (1982)). Вышеприведенные ссылки в полном объеме включены посредством ссылки.

Процесс внесения описанных в данном документе полинуклеотидов в клетки можно осуществлять любым подходящим способом. Подходящие способы включают опосредованную фосфатом кальция или липидами трансфекцию, электропорацию и трансдукцию или инфицирование с помощью вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды вносят в клетку посредством вирусной трансдукции (например, лентивирусной трансдукции).

После изменения наличие экспрессии любой молекулы, описанной в данном документе, можно анализировать, используя известные методики, такие как вестерн-блот, анализ ELISA, анализ FACS и т. п.

В некоторых вариантах осуществления представленная технология предлагает гипоиммунногенные плюрипотентные клетки, которые содержат «суицидальный ген» или «суицидальный переключатель». Они включены, чтобы функционировать как «защитный переключатель», который может вызвать гибель гипоиммуногенных плюрипотентных клеток, если они будут расти и делиться нежелательным образом. Подход абляции 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 преобразующий нетоксичное соединение в высокотоксичные метаболиты. Результатом является специфическое удаление клеток, экспрессирующих этот фермент. В некоторых вариантах осуществления суицидальный ген представляет собой ген тимидинкиназы вируса гермеса (HSV-tk), а триггером является ганцикловир. В других вариантах осуществления суицидальный ген представляет собой ген цитозиндезаминазы Escherichia coli (EC-CD), а триггером является 5-фторцитозин (5-FC) (Barese et al., Mol.Therap. 20(10): 1932-1943 (2012), Xu et al., Cell Res. 8:73-8 (1998), обе в полном объеме включены в

данный документ посредством ссылки).

В других вариантах осуществления суицидальный ген представляет собой индуцибельный белок каспазы. Индуцибельный белок каспазы содержит по меньшей мере часть белка каспазы, способную индуцировать апоптоз. В предпочтительных вариантах осуществления индуцибельный белок каспазы представляет собой iCasp9. Он содержит последовательность белка, связывающего FK506 человека, FKBP12, с мутацией F36V, связанного рядом аминокислот с геном, кодирующим каспазу 9 человека. FKBP12-F36V с высокой аффинностью связывается с низкомолекулярным димеризующим агентом, AP1903. Таким образом, суицидальную функцию iCasp9 инициируют введением химического индуктора димеризации (ХИД). В некоторых вариантах осуществления ХИД представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство API 903. Димеризация вызывает быструю индукцию апоптоза. (Смотрите WO2011146862; Stasi et al., N. Engl. J. Med 365;18 (2011); Tey et al., Biol. Blood Marrow Transplant. 13:913-924 (2007), каждая из которых в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки).

M. Создание гипоиммуногенных плюрипотентных стволовых клеток

В настоящей технологии предложены способы получения гипоиммуногенных плюрипотентных клеток. В некоторых вариантах осуществления способ включает создание плюрипотентных стволовых клеток. Создание мышиных и человеческих плюрипотентных стволовых клеток (обычно называемых iPSC; miPSC в случае мышиных клеток или hiPSC в случае человеческих клеток) в общем случае известно в данной области техники. Какпонятно специалистам в данной области техники, существует множество разных способов создания iPSC. Первоначальную индукцию проводили из эмбриональных или взрослых фибробластов мышей, используя вирусное внесение четырех факторов транскрипции: Oct3/4, Sox2, c-Myc и Klf4; смотрите Takahashi and Yamanaka Cell 126:663-676 (2006), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки, в частности, в отношении описанных в ней методик. С тех пор был разработан ряд методов; смотрите обзор в Seki et al., World J. Stem Cells 7(1): 116-125 (2015), и Lakshmipathy and Vermuri, editors, Methods in Molecular Biology: Pluripotent Stem Cells, Methods and Protocols, Springer 2013, содержание которых явным образом в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки, в частности, в отношении методов создания hiPSC (смотрите, например, главу 3 последней ссылки).

В общем случае iPSC создают посредством временной экспрессии одного или более перепрограммирующих факторов в клетке-хозяине, обычно вносимых с помощью эписомальных векторов. В этих условиях происходит индукция небольшого количества клеток, которые становятся iPSC (в целом, эффективность этого этапа является низкой, поскольку на нем не используют селекционные маркеры). Как только клетки «перепрограммированы», и становятся плюрипотентными, они утрачивают эписомальный(е) вектор(ы) и вырабатывают факторы, используя эндогенные гены.

Как также понятно специалистам в данной области техники, количество перепрограммирующих факторов, которые можно использовать или используют, может

варьироваться. Обычно при использовании меньшего количества перепрограммирующих факторов снижается эффективность трансформации клеток в плюрипотентное состояние, а также «плюрипотентность», например, меньшее количество перепрограммирующих факторов может приводить к тому, что клетки не становятся полностью плюрипотентными и могут быть способны дифференцироваться только в меньшее количество типов клеток.

В некоторых вариантах осуществления используют один перепрограммирующий фактор, OCT4. В других вариантах осуществления используют два перепрограммирующих фактора, OCT4 и KLF4. В других вариантах осуществления используют три перепрограммирующих фактора, OCT4, KLF4 и SOX2. В других вариантах осуществления используют четыре перепрограммирующих фактора, OCT4, KLF4, SOX2 и c-Myc. В других вариантах осуществления можно использовать 5, 6 или 7 факторов перепрограммирования, выбранных из SOKMNLT; SOX2, OCT4 (POU5F1), KLF4, MYC, NANOG, LIN28 и Т-антигена SV40L. В общем случае гены этих перепрограммирующих факторов предоставлены в эписомальных векторах, таких как известные в данной области техники и коммерчески доступные.

В общем случае, как известно в данной области техники, iPSC получают из неплюрипотентных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, клетки крови, фибробласты и т. д., посредством временной экспрессии перепрограммирующих факторов, как описано в данном документе.

N. Анализы фенотипов гипоиммуногенности и сохранения плюрипотентности

После получения гипоиммуногенных клеток их можно анализировать в отношении их гипоиммуногенности и/или сохранения плюрипотентности, как описано в WO 2016183041 и WO 2018132783.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенность анализируют, используя ряд методик, проиллюстрированных на Фиг. 13 и Фиг. 15 в WO2018132783. Эти методики включают трансплантацию аллогенным хозяевам и наблюдение за ростом гипоиммуногенных плюрипотентных клеток (например, тератом), которые ускользнули от иммунной системы хозяина. В некоторых случаях производные гипоиммуногенных плюрипотентных клеток трансдуцируют для экспрессии люциферазы, после чего их можно исследовать, используя биолюминесцентную визуализацию. Аналогично исследуют Т-клеточный и/или В-клеточный ответ животного-хозяина на такие клетки, чтобы подтвердить, что клетки не вызывают иммунную реакцию у животного-хозяина. Т-клеточные ответы можно оценивать методами Elispot, ELISA, FACS, ПЦР или масс-цитометрии (CYTOF). В-клеточные ответы или ответы антител оценивают, используя FACS или Luminex. В дополнительном или альтернативном варианте клетки можно анализировать в отношении их способности избегать ответов врожденного иммунитета, например, уничтожения NK-клетками, как в целом проиллюстрировано на Фиг. 14 и 15 в WO2018132783.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенность клеток оценивают,

используя иммуноанализы Т-клеток, такие 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.

Для оценки иммуногенности описанных в данном документе клеток можно проводить анализы in vivo. В некоторых вариантах осуществления выживаемость и иммуногенность гипоиммуногенных клеток определяют, используя в качестве модели аллогенных гуманизированных мышей с ослабленным иммунитетом. В некоторых случаях гипоиммуногенные плюрипотентные стволовые клетки трансплантируют аллогенным гуманизированным мышам NSG-SGM3 и анализируют в отношении отторжения клеток, выживаемости клеток и образования тератом. В некоторых случаях привитые гипоиммуногенные плюрипотентные стволовые клетки или их дифференцированные клетки демонстрируют долгосрочную выживаемость в мышиной модели.

Дополнительные методики определения иммуногенности, включая гипоиммуногенность клеток, описаны, 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, описания которых, включая фигуры, подписи к фигурам и описание способов, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

Аналогично, сохранение плюрипотентности исследуют рядом способов. В одном варианте осуществления плюрипотентность оценивают по экспрессии определенных факторов, специфических для плюрипотентности, как в целом описано в данном документе и показано на Фиг. 29 в WO2018132783. В дополнительном или альтернативном варианте плюрипотентные клетки дифференцируют в один или более типов клеток, что свидетельствует о плюрипотентности.

Как понятно специалистам в данной области техники, успешное снижение функции ГКГС I (HLA I, когда клетки получены из человеческих клеток) в плюрипотентных клетках можно определять, используя методики, известные в данной области техники и описанные ниже; например, методику FACS с использованием меченых антител, которые связывают комплекс HLA; например, используя коммерчески доступные антитела к HLA-A, B, C, которые связываются с альфа-цепью антигенов HLA класса I главного комплекса гистосовместимости человека.

Кроме того, клетки можно исследовать, чтобы подтвердить, что комплекс HLA I не экспрессируется на клеточной поверхности. Это можно анализировать с помощью анализа FACS, используя антитела к одному или более компонентам клеточной поверхности HLA,

как обсуждалось выше.

Успешное снижение функции ГКГС II (HLA II, когда клетки получены из человеческих клеток) в плюрипотентных клетках или их производных можно определять, используя методики, известные в данной области техники, такие как вестерн-блоттинг с использованием антител к белку, методики FACS, методики ОТ-ПЦР и т. д.

Кроме того, клетки можно исследовать, чтобы подтвердить, что комплекс HLA II не экспрессируется на клеточной поверхности. Опять же, этот анализ проводят так, как известно в данной области техники (смотрите, например, Фиг. 21 в WO2018132783), и в общем случае проводят, используя вестерн-блоттинг или анализ FACS на основе коммерческих антител, которые связываются с HLA-антигенами человека класса II, HLA-DR, DP и большинством DQ.

В дополнение к снижению уровня HLA I и II (или ГКГС I и II) гипоиммуногенные клетки по данной технологии обладают сниженной подверженностью фагоцитозу макрофагами и уничтожению NK-клетками. Полученные в результате гипоиммуногенные клетки «ускользают от» иммунных макрофагов и путей врожденного иммунитета из-за экспрессии одного или более трансгенов CD24.

O. Поддержание гипоиммуногенных плюрипотентных стволовых клеток

После образования гипоиммуногенных плюрипотентных стволовых клеток их можно поддерживать в недифференцированном состоянии, как известно для поддержания iPSC. Например, клетки можно культивировать на матригеле, используя питательную среду, предотвращающую дифференцировку и сохраняющую плюрипотентность. Кроме того, они могут находиться в культуральной среде в условиях, обеспечивающих сохранение плюрипотентности.

P. Введение гипоиммуногенных клеток, дифференцированных из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

В представленной технологии предложены HIP-клетки, которые дифференцируют в разные типы для последующей трансплантации субъектам-реципиентам. Дифференцировку можно анализировать, как это известно в данной области техники, обычно путем оценки наличия клеточно-специфических маркеров. Как понятно специалистам в данной области техники, производные дифференцированных гипоиммуногенных плюрипотентных клеток можно трансплантировать, используя методики, известные в данной области техники, которые зависят как от типа клеток, так и от конечного использования этих клеток. В некоторых вариантах осуществления Т-лимфоциты (Т-клетки) получены из гипоиммуногенных индуцированных плюрипотентных стволовых (HIP) клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, полученные из HIP-клеток, вводят в виде смеси CD4+ и CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимые Т-клетки, полученные из HIP-клеток, представляют собой CD4+ клетки. В некоторых вариантах осуществления вводимые Т-клетки, полученные из HIP-клеток, представляют собой CD8+ клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, полученные из HIP-клеток, вводят в виде

неактивированных Т-клеток.

1. Клетки сердца, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

В представленной технологии предложены гипоиммуногенные плюрипотентные клетки, которые дифференцируют в разные типы клеток сердца для последующих трансплантации или прививания субъектам (например, реципиентам). Как понятно специалистам в данной области техники, способы дифференцировки зависят от необходимого типа клеток с использованием известных технологий. Типовые клетки сердца включают, но не ограничиваются этим, кардиомиоцит, нодальный кардиомиоцит, проводящий кардиомиоцит, рабочий кардиомиоцит, клетку-предшественника кардиомиоцита, стволовую клетку сердца, атриальную стволовую клетку сердца, вентрикулярную стволовую клетку сердца, эпикардиальную клетку, гемопоэтическую клетку, клетку сосудистого эндотелия, эндокардиальную эндотелиальную клетку, интерстициальную клетку сердечного клапана, клетку кардиостимулятора и т. п.

В некоторых вариантах осуществления предшественник кардиомиоцита включает клетку, которая способна (без дедифференцировки или перепрограммирования) давать потомство, которое включает зрелые (на конечной стадии) кардиомиоциты. Клетки-предшественников кардиомиоцитов часто можно идентифицировать, используя один или более маркеров, выбранных из GATA-4, Nkx2.5 и семейства транскрипционных факторов MEF-2. В некоторых случаях кардиомиоциты относятся к незрелым кардиомиоцитам или зрелым кардиомиоцитам, которые экспрессируют один или более маркеров (иногда по меньшей мере 3 или 5 маркеров) из следующего перечня: сердечный тропонин I (cTnl), сердечный тропонин T (cTnT), тяжелая цепь саркомерного миозина (MHC), GATA-4, Nkx2.5, N-кадгерин, β2-адренорецептор (bI-AII), ANF, семейство транскрипционных факторов MEF-2, креатинкиназа MB (CK-MB), миоглобин или атриальный натрийуретический фактор (ANF). В некоторых вариантах осуществления клетки сердца демонстрируют спонтанную периодическую сократительную активность. В некоторых случаях, когда клетки сердца культивируют в подходящей тканевой культуральной среде с соответствующими концентрацией Ca^{2+} и электролитическим балансом, можно наблюдать, что клетки сокращаются периодическим образом вдоль одной оси клетки, а затем избавляются от сокращенного состояния без добавления каких-либо дополнительных компонентов в культуральную среду. В некоторых вариантах осуществления клетки сердца представляют собой гипоиммуногенные клетки сердца.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки сердца вводят субъекту-реципиенту для лечения заболевания сердца, выбранного из группы, состоящей из детской кардиомиопатии, возрастной кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии, гипертрофической кардиомиопатии, рестриктивной кардиомиопатии, хронической ишемической кардиомиопатии, околородовой кардиомиопатии, воспалительной кардиомиопатии, идиопатической кардиомиопатии, другой кардиомиопатии, миокардиального ишемического реперфузионного поражения,

дисфункции желудочка, сердечной недостаточности, застойной сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, конечной стадии заболевания сердца, атеросклероза, ишемии, гипертензии, рестеноза, грудной ангины, ревматического поражения сердца, артериального воспаления, сердечно-сосудистого заболевания, инфаркта миокарда, ишемии миокарда, застойной сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, ишемии миокарда, поражения сердца, ишемии миокарда, сосудистого заболевания, приобретенного заболевания сердца, врожденного заболевания сердца, атеросклероза, ишемической болезни сердца, дисфункции проводящей системы, дисфункции коронарных артерий, легочной гипертензии, сердечной аритмии, мышечной дистрофии, аномалии мышечной массы, мышечной дегенерации, миокардита, инфекционного миокардита, вызванных лекарствами или токсинами мышечных аномалий, миокардита с гиперчувствительностью и аутоиммунного эндокардита.

Соответственно, в данном документе предложены способы лечения и предотвращения поражения сердца или заболевания или болезни сердца у нуждающегося в этом субъекта. Описанные в данном документе способы можно использовать для лечения, облегчения, предотвращения или замедления прогрессирования ряда заболеваний сердца или их симптомов, таких как те, которые приводят к патологическому повреждению структуры и/или функции сердца. Термины «заболевание сердца», «болезнь сердца» и «поражение сердца» взаимозаменяемо используются в данном документе и относятся к состоянию и/или расстройству, касающемуся сердца, включая клапаны, эндотелий, инфарктные зоны или другие компоненты или структуры сердца. Такие заболевания сердца и связанные с сердцем заболевания включают, но не ограничиваются этим, помимо прочего, инфаркт миокарда, сердечную недостаточность, кардиомиопатию, врожденный порок сердца, заболевание или дисфункцию сердечного клапана, эндокардит, ревматическую лихорадку, пролапс митрального клапана, инфекционный эндокардит, гипертрофическую кардиомиопатию, дилатационную кардиомиопатию, миокардит, кардиомегалию и/или митральную недостаточность.

В некоторых вариантах осуществления способ получения популяции гипоиммуногенных клеток сердца из популяции гипоиммуногенных плюрипотентных (HIP) клеток путем in vitro дифференцировки включает: (a) культивирование популяции HIP-клеток в культуральной среде, содержащей ингибитор GSK; (b) культивирование популяции HIP-клеток в культуральной среде, содержащей антагонист WNT, для получения популяции предшественников клеток сердца; и (c) культивирование популяции предшественников клеток сердца в культуральной среде, содержащей инсулин, для получения популяции гипоиммунных клеток сердца. В некоторых вариантах осуществления ингибитор GSK представляет собой CHIR-99021, его производное или его вариант. В некоторых случаях ингибитор GSK находится в концентрации в диапазоне от около 2 мМ до около 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления антагонист WNT представляет собой IWR1, его производное или его вариант. В некоторых случаях антагонист WNT находится в концентрации в диапазоне от около 2 мМ до около 10 мМ.

В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных клеток сердца выделяют из отличных от сердца клеток. В некоторых вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных клеток сердца размножают перед введением. В определенных вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных клеток сердца размножают и криоконсервируют перед введением.

Другие применимые способы дифференцировки индуцированных или эмбриональных плюрипотентных стволовых клеток в клетки сердца описаны, например, в US2017/0152485; US2017/0058263; US2017/0002325; US2016/0362661; US2016/0068814; US 9062289; US 7897389; и US 7452718. Дополнительные способы получения клеток сердца из индуцированных или эмбриональных плюрипотентных стволовых клеток описаны, например, в Xu et al., Stem Cells and Development, 2006, 15(5): 631-9, Burridge et al., Cell Stem Cell, 2012, 10: 16-28, и Chen et al., Stem Cell Res, 2015, 15(2):365-375.

В различных вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки сердца можно культивировать в культуральной среде, содержащей ингибитор пути BMP, активатор сигнализации WNT, ингибитор сигнализации WNT, агонист WNT, антагонист WNT, ингибитор Src, ингибитор EGFR, активатор PCK, цитокин, фактор роста, кардиотропный агент, соединение и т. п.

Активатор сигнализации WNT включает, но не ограничивается этим, CHIR99021. Активатор PCK включает, но не ограничивается этим, PMA. Ингибитор сигнализации WNT включает, но не ограничивается этим, соединение, выбранное из KY02111, SO3031 (KY01-I), SO2031 (KY02-I), SO3042 (KY03-I) и XAV939. Ингибитор Src включает, но не ограничивается этим, A419259. Ингибитор EGFR включает, но не ограничивается этим, AG1478.

Неограничивающие примеры агентов для создания клеток сердца из iPSC включают активин A, BMP -4, Wnt3a, VEGF, растворимый белок frizzled, циклоспорин A, ангиотензин II, фенилэфрин, аскорбиновую кислоту, диметилсульфоксид, 5-аза-2'-дезоксицитидин и т. п.

Клетки можно культивировать на поверхности, такой как синтетическая поверхность для поддержания и/или стимуляции дифференцировки гипоиммуногенных плюрипотентных клеток в клетки сердца. В некоторых вариантах осуществления поверхность содержит полимерный материал, включая, но не ограничиваясь этим, гомополимер или сополимер выбранных одного или более акрилатных мономеров. Неограничивающие примеры акрилатных мономеров и метакрилатных мономеров включают тетра(этиленгликоль)диакрилат, диметакрилат глицерина, диметакрилат 1,4-бутандиола, поли(этиленгликоль)диакрилат, ди(этиленгликоль)диметакрилат, тетра(этиленгликоль)диметакрилат, диакрилат 1,6-гександиола пропоксилата, диакрилат неопентилгликоля, диакрилат триметилолпропанбензоата, триметилолпропанэтоксилат (1 EO/QH) метил, трицикло[5.2.1.$0^{2,6}$]декан диметанола диакрилат, диакрилат этоксилата неопентилгликоля и триметилолпропантриакрилат. Акрилаты синтезируют, как известно в данной области техники, или получают от коммерческого поставщика, такого как

Polysciences, Inc., Sigma Aldrich, Inc. и Sartomer, Inc.

Полимерный материал может быть распределен по поверхности материала подложки. Применимые материалы подложек, подходящие для культивирования клеток, включают керамическое вещество, стекло, пластик, полимер или сополимер, любые их комбинации или покрытие из одного материала на другом. В некоторых случаях стекло включает силикатное стекло, стекло пирекс, стекло вайкор, кварцевое стекло, силикон или их производные и т. п.

В некоторых случаях пластики или полимеры, включая дендритные полимеры, включают поли(винилхлорид), поли(виниловый спирт), поли(метилметакрилат), поли(винилацетат - малеиновый ангидрид), поли(диметилсилоксан)монометакрилат, циклические олефиновые полимеры, фторуглеродные полимеры, полистиролы, полипропилен, полиэтиленимин или их производные и т. п. В некоторых случаях сополимеры включают поли(винилацетат и малеиновый ангидрид), поли(стирол и малеиновый ангидрид), поли(этилен и акриловая кислота) или их производные и т. п.

Эффективность клеток сердца, полученных, как описано в данном документе, можно оценивать в животных моделях криоповреждения сердца, которое без лечения приводит к рубцеванию 55% ткани стенки левого желудочка (Li et al., Ann. Thorac. Surg. 62:654, 1996; Sakai et al., Ann. Thorac. Surg. 8:2074, 1999, Sakai et al., Thorac. Cardiovasc. Surg. 118:715, 1999). Успешное лечение может уменьшать участок рубцевания, ограничивать распространение рубцевания и улучшать функцию сердца по определению по систолическому, диастолическому и развиваемому давлению. Поражение сердца также можно моделировать, используя эмболизационную спираль в дистальной части левой передней нисходящей артерии (Watanabe et al., Cell Transplant. 7:239, 1998), а эффективность лечения можно оценивать по гистологии и сердечной функции.

В некоторых вариантах осуществления введение включает имплантацию в сердечную ткань субъекта, внутривенную инъекцию, внутриартериальную инъекцию, интракоронарную инъекцию, внутримышечную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию, интрамиокардиальную инъекцию, трансэндокардиальную инъекцию, трансэпикардиальную инъекцию или инфузию.

В некоторых вариантах осуществления пациенту, которому вводят сконструированные клетки сердца, также вводят сердечный препарат. Иллюстративные примеры сердечных препаратов, которые подходят для применения в комбинированной терапии, включают, но не ограничиваются этим, факторы роста, полинуклеотиды, кодирующие факторы роста, ангиогенные агенты, блокаторы кальциевых каналов, антигипертензивные агенты, антимитотические агенты, инотропные агенты, антиатерогенные агенты, антикоагулянты, бета-блокаторы, антиаритмические агенты, противовоспалительные агенты, сосудорасширители, тромболитические агенты, сердечные гликозиды, антибиотики, противовирусные агенты, противогрибковые агенты, агенты, которые ингибируют простейших, нитраты, ингибиторы ангиотензин-конвертирующего фермента (ACE), антагонист рецептора ангиотензина II,

натрийуретический пептид головного мозга (BNP); антинеопластические агенты, стероиды и т. п.

Эффекты терапии в соответствии со способами можно отслеживать рядом способов. Например, можно использовать электрокардиограмму (ЭКГ) или холтеровский монитор для определения эффективности лечения. ЭКГ представляет собой измерение частоты сердцебиения и электрических импульсов и является очень эффективным и неинвазивным способом определения того, улучшила ли терапия или сохранила, предотвратила или замедлила деградацию электропроводности в сердце субъекта. Применение холтеровского монитора, портативного устройства ЭКГ, которое можно носить в течение длительных периодов времени для отслеживания сердечных аномалий, аритмических расстройств и т. п., также является надежным способом оценки эффективности терапии. Для определения улучшения функции желудочков можно использовать ЭКГ или ядерное исследование.

2. Нейральные клетки, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

В представленной технологии предложены гипоиммуногенные плюрипотентные клетки, которые дифференцируют в разные типы нейральных клеток для последующих трансплантации или прививания субъектам-реципиентам. Как понятно специалистам в данной области техники, способы дифференцировки зависят от необходимого типа клеток с использованием известных технологий. Типовые типы нейральных клеток включают, но не ограничиваются этим, церебральные эндотелиальные клетки, нейроны (например, дофаминергические нейроны), глиальные клетки и т. п.

В некоторых вариантах осуществления дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток осуществляют посредством воздействия на клетки или приведения клеток в контакт со специфическими факторами, которые, как известно, позволяют получать конкретные линии дифференцировки клеток, так, чтобы направить их дифференцировку на конкретные, необходимые линию и/или тип клеток, представляющие интерес. В некоторых вариантах осуществления окончательно дифференцированные клетки демонстрируют специализированные фенотипические характеристики или признаки. Во многих вариантах осуществления описанные в данном документе стволовые клетки дифференцируют в популяции нейроэктодермальных, нейрональных, нейроэндокринных, дофаминергических, холинергических, серотонинергических (5-HT), глутаматергических, GABAергических, адренергических, норадренергических, симпатических нейрональных, парасимпатических нейрональных, симпатических периферических нейрональных или глиальных клеток. В некоторых случаях популяция глиальных клеток включает популяцию микроглиальных (например, амебоидных, разветвленных, активированных фагоцитарных и активированных нефагоцитарных) клеток или популяцию макроглиальных клеток (клеток центральной нервной системы: астроцитов, олигодендроцитов, эпендимных клеток и радиальной глии; и клеток периферической нервной системы: шванновских клеток и сателлитных клеток), или

прекурсоров и предшественников любых из вышеперечисленных клеток.

Протоколы по созданию разных типов нейральных клеток описаны в заявке PCT № WO2010144696, патентах США №№ 9057053; 9376664; и 10233422. Дополнительные описания способов 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. Способы определения эффекта трансплантации нейральных клеток в животной модели неврологического расстройства или состояния описаны в следующих работах: для спинного мозга - Curtis et al., Cell Stem Cell, 2018, 22, 941-950; для болезни Паркинсона - Kikuchi et al., Nature, 2017, 548:592-596; для БАС - Izrael et al., Stem Cell Research, 2018, 9(1):152 и Izrael et al., IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.72862; для эпилепсии - Upadhya et al., PNAS, 2019, 116(1):287-296.

В некоторых вариантах осуществления нейральные клетки вводят субъекту для лечения болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, рассеянного склероза, других нейродегенеративных заболеваний или состояний, синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), синдрома Туретта (СТ), шизофрении, психоза, депрессии, других нейропсихиатрических расстройств. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе нейральные клетки вводят субъекту для лечения или нормализации инсульта. В некоторых вариантах осуществления нейроны и глиальные клетки вводят субъекту с боковым амиотрофическим склерозом (БАС). В некоторых вариантах осуществления церебральные эндотелиальные клетки вводят для облегчения симптомов или эффектов внутримозгового кровоизлияния. В некоторых вариантах осуществления дофаминергические нейроны вводят пациенту с болезнью Паркинсона. В некоторых вариантах осуществления норадренергические нейроны, GABAергические интернейроны вводят субъекту, который пережил эпилептический припадок. В некоторых вариантах осуществления двигательные нейроны, интернейроны, шванновские клетки, олигодендроциты и микроглию вводят пациенту, который пережил повреждение спинного мозга.

В некоторых вариантах осуществления церебральные эндотелиальные клетки (ЭК), их прекурсоров и предшественников дифференцируют из плюрипотентных стволовых клеток (например, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток) на поверхности путем культивирования клеток в среде, содержащей один или более факторов, которые способствуют созданию церебральных ЭК или нейральных клеток. В некоторых случаях среда содержит один или более из следующих факторов: CHIR-99021, VEGF, основной FGF и Y-27632. В некоторых случаях среда содержит добавку, предназначенную для стимуляции выживаемости и функциональности нейральных клеток.

i. Церебральные эндотелиальные клетки

В некоторых вариантах осуществления церебральные эндотелиальные клетки (ЭК), их прекурсоров и предшественников дифференцируют из плюрипотентных стволовых клеток на поверхности путем культивирования клеток в некондиционированной или кондиционированной среде. В некоторых случаях среда содержит факторы или малые

молекулы, которые стимулируют или облегчают дифференцировку. В некоторых вариантах осуществления среда содержит один или более из факторов или малых молекул, выбранных из группы, состоящей из VEGR, FGF, SDF-1, CHIR-99021, Y-27632, SB 431542, и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления поверхность для дифференцировки содержит один или более белков внеклеточного матрикса. Поверхность может быть покрыта одним или более белками внеклеточного матрикса. Клетки можно дифференцировать в суспензии, а затем помещать в форму гелевой матрицы, такой как матригель, желатин или фибрин/тромбин, чтобы способствовать выживаемости клеток. В некоторых случаях дифференцировку анализируют, как известно в данной области техники, в общем случае путем оценки присутствия клеточно-специфических маркеров.

В некоторых вариантах осуществления церебральные эндотелиальные клетки экспрессируют или секретируют фактор, выбранный из группы, состоящей из CD31, VE кадгерина и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления церебральные эндотелиальные клетки экспрессируют или секретируют один или более факторов, выбранных из группы, состоящей из CD31, CD34, CD45, CD117 (c-kit), CD146, CXCR4, VEGF, SDF-1, PDGF, GLUT-1, PECAM-1, eNOS, клаудина-5, окклюдина, ZO-1, p-гликопротеина, фактора фон Виллебранда, VE-кадгерина, рецептора липопротеинов низкой плотности LDLR, белка 1, связанного с рецептором липопротеинов низкой плотности LRP1, инсулинового рецептора INSR, лептинового рецептора LEPR, молекулы адгезии базальных клеток BCAM, рецептора трансферрина TFRC, рецептора, специфического к конечному продукту гликирования, AGER, рецептора поглощения ретинола STRA6, малой субъединицы 1 транспортера крупных нейтральных аминокислот SLC7A5, транспортера возбуждающих аминокислот 3 SLC1A1, натрий-сопряженного транспортера нейтральных аминокислот 5 SLC38A5, члена 1 семейства 16 транспортеров растворенных веществ SLC16A1, АТФ-зависимой транслоказы ABCB1, транспортера ATP-ABCC2-связывающей кассеты ABCG2, белка 1, связанного с множественной лекарственной резистентностью, ABCC1, канальчатого мультиспецифического транспортера органических анионов 1 ABCC2, белка 4, связанного с множественной лекарственной резистентностью, ABCC4, и белка 5, связанного с множественной лекарственной резистентностью, ABCC5.

В некоторых вариантах осуществления церебральные ЭК характеризуются одним или более признаками, выбранными из группы, состоящей из высокой экспрессии плотных соединений, высокого электрического сопротивления, низкой фенестрации, небольшого периваскулярного пространства, высокой распространенности рецепторов инсулина и трансферрина и большого числа митохондрий.

В некоторых вариантах осуществления церебральные ЭК отбирают или очищают, используя стратегию положительного отбора. В некоторых случаях церебральные ЭК сортируют против маркера эндотелиальных клеток, такого как, но не ограничиваясь этим, CD31. Другими словами, выделяют CD31-положительные церебральные ЭК. В некоторых

вариантах осуществления церебральные ЭК отбирают или очищают, используя стратегию отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки удаляют посредством отбора в отношении клеток, которые экспрессируют маркер плюрипотентности, включая, но не ограничиваясь этим, TRA-1-60 и SSEA-1.

ii. Дофаминергические нейроны

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные индуцированные плюрипотентные (HIP) клетки дифференцируют в дофаминергические нейроны, включая нейрональный стволовые клетки, нейрональные клетки-предшественники, незрелые дофаминергические нейроны и зрелые дофаминергические нейроны.

В некоторых случаях термин «дофаминергические нейроны» включает нейрональные клетки, которые экспрессируют тирозингидроксилазу (TH), ограничивающий скорость фермент для синтеза дофамина. В некоторых вариантах осуществления дофаминергические нейроны секретируют нейротрансмиттер дофамин и имеют низкую экспрессию или отсутствие экспрессии дофамингидроксилазы. Дофаминергический (DA) нейрон может экспрессировать один или более следующих маркеров: нейрон-специфическую энолазу (NSE), 1-ароматическую аминокислотную декарбоксилазу, везикулярный транспортер моноаминов 2, транспортер дофамина, Nurr-1 и рецептор дофамина-2 (D2-рецептор). В определенных случаях «нейральные стволовые клетки» включают популяцию плюрипотентных клеток, которые частично дифференцировались по пути нейральных клеток и экспрессируют один или более нейральных маркеров, включая, например, нестин. Нейральные стволовые клетки могут дифференцироваться в нейроны или глиальные клетки (например, астроциты или олигодендроциты). Термин «нейральные клетки-предшественники» включает культивируемые клетки, которые экспрессируют FOXA2 и низкие уровни b-тубулина, но не тирозингидроксилазу. Такие нейральные клетки-предшественники способны дифференцироваться в ряд нейрональных подтипов, в частности ряд подтипов дофаминергических нейронов, после культивирования соответствующих факторов, таких как описанные в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления DA нейроны, полученные из гипоиммуногенных индуцированных плюрипотентных стволовых (HIP) клеток, вводят пациенту, например пациенту-человеку, для лечения нейродегенеративного заболевания или состояния. В некоторых случаях нейродегенеративное заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из болезни Паркинсона, болезни Хантингтона и рассеянного склероза. В других вариантах осуществления DA нейроны использую для лечения или облегчения одного или более симптомов нейропсихического расстройства, такого как синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), синдром Туретта (СТ), шизофрения, психоз и депрессия. В других вариантах осуществления DA нейроны использую для лечения пациента с дефективными DA нейронами.

Чтобы охарактеризовать и пронаблюдать дифференцировку DA и оценить фенотип DA, можно оценивать экспрессию любого количества молекулярных и генетических маркеров. Например, наличие генетических маркеров можно определять различными методами, известными специалистам в данной области техники. Экспрессию молекулярных маркеров можно определять с помощью количественных методов, таких как, но не ограничиваясь этим, анализы на основе кПЦР, иммуноанализы, иммуногистохимические анализы, иммуноблоттинг и т. п. Типовые маркеры для DA нейронов включают, но не ограничиваются этим, TH, бета-тубулин, спаренный бокс-белок (Pax6), белок-энхансер гена инсулина (Isl1), нестин, диаминобензидин (DAB), активируемый протеином G внутренний выпрямляющий калиевый канал 2 (GIRK2), белок, ассоциированный с микротрубочками 2 (MAP-2), NURR1, транспортер дофамина (DAT), белок forkhead-бокса A2 (FOXA2), FOX3, даблкортин и транскрипционный фактор гомеобокса LIM 1-бета (LMX1B) и т. п. В некоторых вариантах осуществления DA нейроны экспрессируют один или более маркеров, выбранных из корина, FOXA2, TuJ1, NURR1 и любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления DA нейроны оценивают в соответствии с электрофизиологической активностью клеток. Электрофизиологию клеток можно оценивать, используя анализы, известные специалистам в данной области техники. Например, цельноклеточный и перфорированный пэтч-кламп, анализы для выявления электрофизиологической активности клеток, анализы для измерения величины и длительности потенциала действия клеток и функциональные анализы для выявления выработки дофамина DA клетками.

В некоторых вариантах осуществления дифференцировка DA нейронов характеризуется спонтанными ритмическими потенциалами действия и высокочастотными потенциалами действия с адаптацией частоты повторения пиков после подачи деполяризующего тока. В других вариантах осуществления дифференцировка DA характеризуется выработкой дофамина. Вырабатываемый уровень дофамина рассчитывают путем измерения ширины потенциала действия в точке, в которой он достигает половины максимальной амплитуды (пиковая полумаксимальная ширина).

В некоторых вариантах осуществления дифференцированные DA нейроны трансплантируют внутривенно или путем инъекции в определенные участки тела пациента. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные DA нейроны трансплантируют в черное вещество (в частности, в компактную область или вблизи нее), вентральную область покрышки (ВОП), хвостатое ядро, скорлупу, прилежащее ядро, субталамическое ядро или любую их комбинацию головного мозга для замещения DA нейронов, дегенерация которых привела к болезни Паркинсона. Дифференцированные DA клетки можно вводить в целевой участок в виде клеточной суспензии. В альтернативном варианте дифференцированные DA клетки можно заключать в поддерживающую матрицу или каркас, ели они содержаться в таком устройстве доставки. В некоторых вариантах осуществления каркас является биоразлагаемым. В других вариантах осуществления

каркас не является биоразлагаемым. Каркас может содержать природные или синтетические (искусственные) материалы.

Доставку DA нейронов можно осуществлять, используя подходящий носитель, такой как, но не ограничиваясь этим, липосомы, микрочастицы или микрокапсулы. В других вариантах осуществления дифференцированные DA нейроны вводят в фармацевтической композиции, содержащей изотонический эксципиент. Фармацевтическую композицию изготавливают в условиях, которые являются в достаточной степени стерильными для введения человеку. В некоторых вариантах осуществления DA нейроны, дифференцированные из клеток HIP предоставлены в форме фармацевтической композиции. Общие принципы терапевтических составов и композиций клеток можно найти в Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996, и Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки.

Помимо DA нейронов, другие нейрональные клетки, их прекурсоров и предшественников можно дифференцировать из HIP-клеток, описанных в данном документе, путем культивирования клеток в среде, содержащей один или более факторов или добавок. Неограничивающие примеры факторов и добавок включают GDNF, BDNF, GM-CSF, B27, основной FGF, основной EGF, NGF, CNTF, ингибитор SMAD, антагонист Wnt, активатор сигнализации SHH и любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления ингибитор SMAD выбран из группы, состоящей из SB431542, LDN-193189, ноггина PD169316, SB203580, LY364947, A77-01, A-83-01, BMP4, GW788388, GW6604, SB-505124, лерделимумаба, метелимумаба, GC-I008, AP-12009, AP-110I4, LY550410, LY580276, LY364947, LY2109761, SB-505124, E-616452 (ингибитора ALK RepSox), SD-208, SMI6, NPC-30345, K 26894, SB-203580, SD-093, активина-M108A, P144, растворимого TBR2-Fc, DMH-1, дорсоморфина дигидрохлорида и их производных. В некоторых вариантах осуществления антагонист Wnt выбран из группы, состоящей из XAV939, DKK1, DKK-2, DKK-3, Dkk-4, SFRP-1, SFRP-2, SFRP-5, SFRP-3, SFRP-4, WIF-1, Soggy, IWP-2, IWR1, ICG-001, KY0211, Wnt-059, LGK974, IWP-L6 и их производных. В некоторых вариантах осуществления активатор сигнализации SHH выбран из группы, состоящей из агониста Smoothened (SAG), аналога SAG, SHH, C25-SHH, C24-SHH, пурморфамина, Hg--Ag и их производных.

В некоторых вариантах осуществления нейроны экспрессируют один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из субъединицы 1 типа ионотропного рецептора глутамата NMDA GRIN1, глутаматдекарбоксилазы 1 GAD1, гамма-аминомасляной кислоты ГАМК или GABA, тирозингидроксилазы TH, транскрипционного фактора гомеобокса LIM 1-альфа LMX1A, белка Forkhead-бокса O1 FOXO1, белка Forkhead-бокса A2 FOXA2, белка Forkhead-бокса O4 FOXO4, FOXG1, 2',3'-циклический нуклеотид 3'-фосфодиэстеразы CNP, основного белка миелина MBP, бета-цепи тубулина 3 TUB3, бета-цепи тубулина 3 NEUN, члена 6 семейства 1 транспортеров растворенных

веществ SLC1A6, SST, PV, кальбиндина, RAX, LHX6, LHX8, DLX1, DLX2, DLX5, DLX6, SOX6, MAFB, NPAS1, ASCL1, SIX6, OLIG2, NKX2.1, NKX2.2, NKX6.2, VGLUT1, MAP2, CTIP2, SATB2, TBR1, DLX2, ASCL1, ChAT, NGFI-B, c-fos, CRF, RAX, POMC, гипокретина, NADPH, NGF, Ach, VAChT, PAX6, EMX2p75, CORIN, TUJ1, NURR1 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления дофаминергические нейроны экспрессируют один или более маркеров, выбранных из CORIN, FOXA2, TUJ1, NURR1 и любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе стволовые клетки дифференцируют в дофаминергические нейроны, включая дофаминергических предшественников. Стволовые клетки культивируют в среде для дифференцировки, содержащей добавку или присадку для индукции нейрональной дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в присутствии добавки или присадки для индукции клеток вентральной пластинки. В некоторых вариантах осуществления добавка или присадка включает ингибитор BMP LDN193189, ингибитор ALK-5 A83-01, агонист Smoothened пурморфамин, FGF8, ингибитор GSK3 CHIR99021, нейротрофический фактор линии глиальных клеток, GDNF, аскорбиновую кислоту, нейротрофический фактор головного мозга BDNF, дибутириладенозиновый циклический монофосфат dbcAMP, ингибитор ROCK Y-27632 и т. п.

В некоторых вариантах осуществления способ получения популяции гипоиммуногенных дофаминергических нейронов из популяции гипоиммуногенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (HIP-клеток) путем in vitro дифференцировки включает (a) культивирование популяции HIP-клеток в первой культуральной среде, содержащей один или более факторов, выбранных из группы, состоящей из белка sonic hedgehog (SHH), BDNF, EGF, bFGF, FGF8, WNT1, ретиноевой кислоты, ингибитора GSK3, ингибитора ALK и ингибитора ROCK, для получения популяции незрелых дофаминергических нейронов; и (b) культивирование популяции незрелых дофаминергических нейронов во второй культуральной среде, отличной от первой культуральной среды, для получения популяции дофаминергических нейронов. В некоторых вариантах осуществления ингибитор GSK представляет собой CHIR-99021, его производное или его вариант. В некоторых случаях ингибитор GSK находится в концентрации в диапазоне от около 2 мМ до около 10 пМ. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ALK представляет собой SB-431542, его производное или его вариант. В некоторых случаях ингибитор ALK находится в концентрации в диапазоне от около 1 мМ до около 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда и/или вторая культуральная среда не содержат животной сыворотки.

В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных дофаминергических нейронов выделяют из отличных от нейрональных клеток. В некоторых вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных дофаминергических нейронов размножают перед введением. В определенных вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных дофаминергических нейронов

размножают и криоконсервируют перед введением.

Способы дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток описаны, например, в Kikuchi et al., Nature, 2017, 548, 592-596; Kriks et al., Nature, 2011, 547-551; Doi et al., Stem Cell Reports, 2014, 2, 337-50; Perrier et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101, 12543-12548; Chambers et al., Nat Biotechnol, 2009, 27, 275-280; и Kirkeby et al., Cell Reports, 2012, 1, 703-714.

Полезные описания нейронов, полученных из стволовых клеток, и способов их создания можно найти, например, в Kirkeby et al., Cell Rep, 2012, 1:703-714; Kriks et al., Nature, 2011, 480:547-551; Wang et al., Stem Cell Reports, 2018, 11(1):171-182; Lorenz Studer, "Chapter 8 - Strategies for Bringing Stem Cell-Derived Dopamine Neurons to the clinic-The NYSTEM Trial" в Progress in Brain Research, 2017, том 230, пп. 191-212; Liu et al., Nat Protoc, 2013, 8:1670-1679; Upadhya et al., Curr Protoc Stem Cell Biol, 38, 2D.7.1-2D.7.47; публикации заявки США № 20160115448 и US8252586; US8273570; US9487752 и US10093897, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки, включая микроглию, астроциты, олигодендроциты, эпендимные клетки и шванновские клетки, глиальные прекурсоры и глиальные предшественники, получают посредством дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в терапевтически эффективные глиальные клетки и т. п. Дифференцировка гипоиммуногенных плюрипотентных стволовых клеток позволяет получать гипоиммуногенные нейральные клетки, такие как гипоиммуногенные глиальные клетки.

В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки, их прекурсоров и предшественников создают путем культивирования плюрипотентных стволовых клеток в среде, содержащей один или более агентов, выбранных из группы, состоящей из ретиноевой кислоты, IL-34, M-CSF, лиганда FLT3, GM-CSF, CCL2, ингибитора TGF-бета, ингибитора сигнализации BMP, активатора сигнализации SHH, FGF, тромбоцитарного фактора роста PDGF, PDGFR-альфа, HGF, IGF-1, ноггина, белка «ежик Соник» (SHH), дорсоморфина, ноггина и любой их комбинации. В определенных случаях ингибитор сигнализации BMP представляет собой LDN193189, SB431542 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки экспрессируют NKX2.2, PAX6, SOX10, нейротрофический фактор головного мозга BDNF, нейротрофин-3 NT-3, NT-4, эпидермальный фактор роста EGF, цилиарный нейротрофический фактор CNTF, фактор роста нервов NGF, FGF8, EGFR, OLIG1, OLIG2, миелиновый основной белок MBP, GAP-43, LNGFR, нестин, GFAP, CD11b, CD11c, CX3CR1, P2RY12, IBA-1, TMEM119, CD45 и любую их комбинацию. Типовая среда для дифференцировки может содержать любые специфические факторы и/или малые молекулы, которые могут облегчать или обеспечивать создание определенного типа глиальных клеток, как известно специалистам в данной области техники.

Чтобы определить, демонстрируют ли клетки, созданные в соответствии с

протоколом in vitro дифференцировки, характеристики и признаки глиальных клеток, клетки можно трансплантировать животной модели. В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки вводят мыши с ослабленным иммунитетом, например, мыши с ослабленным иммунитетом shiverer. Глиальные клетки вводят в головной мозг мыши, а привитые клетки оценивают через заданное количество времени. В некоторых случаях привитые клетки в головном мозге визуализируют, используя методы иммуноокрашивания и визуализации. В некоторых вариантах осуществления определяют, что глиальные клетки экспрессируют известные биомаркеры глиальных клеток.

Полезные способы для создания глиальных клеток, их прекурсоров и предшественников из стволовых клеток можно найти, например, в US7579188; US7595194; US8263402; US8206699; US8252586; US9193951; US9862925; US8227247; US9709553; US2018/0187148; US2017/0198255; US2017/0183627; US2017/0182097; US2017/253856; US2018/0236004; WO2017/172976; и WO2018/093681.

В некоторых вариантах осуществления дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток осуществляют посредством воздействия на клетки или приведения клеток в контакт со специфическими факторами, которые, как известно, позволяют получать конкретные линии дифференцировки клеток, так, чтобы направить их дифференцировку на конкретные, необходимые линию и/или тип клеток, представляющие интерес. В некоторых вариантах осуществления окончательно дифференцированные клетки демонстрируют специализированные фенотипические характеристики или признаки. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе стволовые клетки дифференцируют в популяции нейроэктодермальных, нейрональных, нейроэндокринных, дофаминергических, холинергических, серотонинергических (5-HT), глутаматергических, GABAергических, адренергических, норадренергических, симпатических нейрональных, парасимпатических нейрональных, симпатических периферических нейрональных или глиальных клеток. В некоторых случаях популяция глиальных клеток включает популяцию микроглиальных (например, амебоидных, разветвленных, активированных фагоцитарных и активированных нефагоцитарных) клеток или популяцию макроглиальных клеток (клеток центральной нервной системы: астроцитов, олигодендроцитов, эпендимных клеток и радиальной глии; и клеток периферической нервной системы: шванновских клеток и сателлитных клеток), или прекурсоров и предшественников любых из вышеперечисленных клеток.

Протоколы по созданию разных типов нейральных клеток описаны в заявке PCT № WO2010144696, патентах США №№ 9057053; 9376664; и 10233422. Дополнительные описания способов 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. Способы определения эффекта трансплантации нейральных клеток в животной модели неврологического расстройства или состояния описаны в следующих работах: для спинного мозга - Curtis et al., Cell Stem Cell, 2018, 22, 941-950; для болезни Паркинсона - Kikuchi et al., Nature, 2017, 548:592-596;

для БАС - Izrael et al., Stem Cell Research, 2018, 9(1):152 и Izrael et al., IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.72862; для эпилепсии - Upadhya et al., PNAS, 2019, 116(1):287-296.

Эффективность трансплантатов нейральных клеток в случае повреждения спинного мозга можно оценивать, например, в крысиной модели острого повреждения спинного мозга, как описано в McDonald et al., Nat. Med., 1999, 5:1410 и Kim et al ., Nature, 2002, 418:50. Например, успешные трансплантаты могут характеризоваться тем, что полученные из трансплантатов клетки присутствуют в пораженном участке через 2-5 недель, дифференцируются в астроциты, олигодендроциты и/или нейроны и мигрируют вдоль спинного мозга от пораженного конца, а также улучшением походки, координации и набором массы. Конкретные животные модели выбирают на основании типа нейральных клеток и неврологического заболевания или состояния, подлежащего лечению.

Нейральные клетки можно вводить способом, который подволяет им приживляться в соответствующем тканевом участке и восстанавливать или регенерировать область с нарушением функциональности. Например, нейральные клетки можно трансплантировать непосредственно в паренхимальные или интратекальные участки центральной нервной системы в соответствии с заболеванием, лечение которого проводят. В некоторых вариантах осуществления любые нейральные клетки, описанные в данном документе, включая церебральные эндотелиальные клетки, нейроны, дофаминергические нейроны, эпендимные клетки, астроциты, микроглиальные клетки, олигодендроциты и шванновские клетки, вводят пациенту путем внутривенной, интраспинальной, интрацеребровентрикулярной, интратекальной, внутриартериальной, внутримышечной, внутрибрюшинной, подкожной, внутримышечной, интраабдоминальной, внутриглазной, ретробульбарной инъекции и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят или депонируют в форме болюсной инъекции или непрерывной инфузии. В определенных вариантах осуществления нейральные клетки вводят путем инъекции в головной мозг, в подходящий участок головного мозга и их комбинации. Инъекцию можно проводить, например, через просверленное в черепе субъекта отверстие. Подходящие участки для введения нейральных клеток в головной мозг включают, но не ограничиваются этим, желудочек головного мозга, боковые желудочки, мозжечково-мозговую цистерну, скорлупу, базальное ядро, кору гиппокампа, полосатое тело, области хвостатого ядра головного мозга и их комбинации.

Дополнительные описания нейральных клеток, включая дофаминергические нейроны, для применения в представленной технологии можно найти в WO2020/018615, описание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

3. Эндотелиальные клетки, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

В представленной технологии предложены гипоиммуногенные плюрипотентные клетки, которые дифференцируют в различные типы эндотелиальных клеток для последующих трансплантации или прививания субъектам (например, реципиентам). Как

понятно специалистам в данной области техники, способы дифференцировки зависят от необходимого типа клеток с использованием известных технологий. Типовые типы эндотелиальных клеток включают, но не ограничиваются этим, эндотелиальные клетки капилляров, эндотелиальные клетки сосудов, эндотелиальные клетки аорты, эндотелиальные клетки артерий, эндотелиальные клетки вен, эндотелиальные клетки почек, эндотелиальные клетки головного мозга, эндотелиальные клетки печени и т. п.

Описанные в данном документе эндотелиальные клетки могут экспрессировать один или более маркеров эндотелиальных клеток. Неограничивающие примеры таких маркеров включают VE-кадгерин (CD 144), ACE (ангиотензин-конвертирующий фермент) (CD 143), BNH9/BNF13, CD31, CD34, CD54 (ICAM-l), CD62E (E-селектин), CD105 (эндоглин), CD146, эндокан (ESM-l), эндогликс-l, эндомуцин, эотаксин-3, EPAS1 (белок 1 домена эндотелиального PAS), антиген, связанный с фактором VIII, FLI-l, Flk-1 (KDR, VEGFR-2), FLT-1 (VEGFR-l), GATA2, GBP-l (гуанилат-связывающий белок-l), GRO-альфа, HEX, ICAM-2 (молекула межклеточной адгезии 2), LM02, LYVE-l, MRB (magic roundabout), нуклеолин, PAL-E (pathologische anatomie Leiden - endothelium), RTK, sVCAM-l, TALI, TEM1 (опухолевый эндотелиальный маркер 1), TEM5 (опухолевый эндотелиальный маркер 5), TEM7 (опухолевый эндотелиальный маркер 7), тромбомодулин (TM, CD141), VCAM-l (молекула адгезии сосудистого эндотелия 1) (CD106), VEGF (фактор роста сосудистого эндотелия), vWF (фактор фон Виллебранда), ZO-l, селективная в отношении эндотелиальных клеток молекула адгезии (ESAM), CD102, CD93, CD184, CD304 и DLL4.

В некоторых вариантах осуществления эндотелиальные клетки генетически модифицируют для экспрессии экзогенного гена, кодирующего представляющий интерес белок, такой как, но не ограничиваясь этим, фермент, гормон, рецептор, лиганд или лекарственный препарат, применимый для лечения расстройства/состояния или облегчения симптомов расстройства/состояния. Стандартные способы генетической модификации эндотелиальных клеток описаны, например, в US5674722.

Такие эндотелиальные клетки можно использовать для обеспечения конститутивного синтеза и доставки полипептидов или белков, которые применимы в предотвращении или лечении заболевания. В этом случае полипептид секретируется непосредственно в кровоток или другой участок организма (например, центральную нервную систему) индивида.В некоторых вариантах осуществления эндотелиальные клетки можно модифицировать для секреции инсулина, фактора свертывания крови (например, фактора VIII или фактора фон Виллебранда), альфа-l антитрипсина, аденозиндезаминазы, тканевого активатора плазминогена, интерлейкинов (например, IL-l, IL-2, IL-3) и т. п.

В определенных вариантах осуществления эндотелиальные клетки можно модифицировать способом, который улучшает их производительность в контексте имплантата. Неограничивающие примеры включают секрецию или экспрессию тромболитического агента для предотвращения внутрипросветного тромбообразования,

секрецию ингибитора пролиферации гладких мышц для предотвращения люминального стеноза вследствие гипертрофии гладких мышц и экспрессию и/или секрецию митогенов эндотелиальных клеток или аутокринного фактора для стимуляции пролиферации эндотелиальных клеток и улучшения степени и длительности выстилки просвета имплантата эндотелиальными клетками.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные эндотелиальные клетки используют для доставки терапевтических уровней секретируемого продукта в конкретный орган или член. Например, сосудистый имплантат, выстланный эндотелиальными клетками, сконструированными (трансдуцированными) in vitro, можно прививать в конкретный орган или член. Секретируемый продукт трансдуцированных эндотелиальных клеток будет доставляться в высоких концентрациях в перфузируемую ткань с достижением, таким образом, необходимого эффекта в целевой анатомической локации.

В других вариантах осуществления эндотелиальные клетки генетически модифицируют так, чтобы они содержали ген, который нарушает или ингибирует ангиогенез при экспрессии эндотелиальными клетками в васкуляризированной опухоли. В некоторых случаях эндотелиальные клетки также можно генетически модифицировать для экспрессии одного из селективных суицидальных генов, описанных в данном документе, что позволяет проводить негативную селекцию привитых эндотелиальных клеток после завершения лечения опухоли.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе эндотелиальные клетки вводят субъекту-реципиенту для лечения нарушения со стороны сосудов, выбранного из группы, состоящей из повреждения сосудов, сердечно-сосудистого заболевания, сосудистого заболевания, периферического сосудистого заболевания, ишемического заболевания, инфаркта миокарда, застойной сердечной недостаточности, обструктивного заболевания периферических сосудов, гипертензии, ишемического поражения тканей, реперфузионного повреждения, ишемии конечностей, инсульта, нейропатии (например, периферической нейропатии или диабетической нейропатии), органной недостаточности (например, печеночной недостаточности, почечной недостаточности и т. п.), диабета, ревматоидного артрита, остеопороза, цереброваскулярного заболевания, гипертензии, грудной ангины и инфаркта миокарда вследствие ишемической болезни сердца, вазоренальной гипертензии, почечной недостаточности вследствие стеноза почечной артерии, нарушения кровообращения в нижних конечностях, других сосудистых состояний или заболеваний.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные плюрипотентные клетки дифференцируют в эндотелиальные колониеобразующие клетки (ECFC) для образования новых кровеносных сосудов для лечения заболевания периферических артерий. Известны способы дифференцировки эндотелиальных клеток. *Смотрите*, например, Prasain et al., doi: 10.1038/nbt.3048, в полном объеме включенную в данный документ посредством ссылки и, в частности, 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 наличия ассоциированных с эндотелиальными клетками маркеров или специфических маркеров или путем оценки функциональности.

В некоторых вариантах осуществления способ получения популяции гипоиммуногенных эндотелиальных клеток из популяции гипоиммуногенных плюрипотентных клеток путем in vitro дифференцировки включает: (a) культивирование популяции HIP-клеток в культуральной среде, содержащей ингибитор GSK; (b) культивирование популяции HIP-клеток во второй культуральной среде, содержащей VEGF и bFGF, для получения популяции предшественников эндотелиальных клеток; и (c) культивирование популяции предшественников эндотелиальных клеток в третьей культуральной среде, содержащей ингибитор ROCK или ингибитор ALK, для получения популяции гипоиммунных эндотелиальных клеток.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор GSK представляет собой CHIR-99021, его производное или его вариант. В некоторых случаях ингибитор GSK находится в концентрации в диапазоне от около 1 мМ до около 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ROCK представляет собой Y-27632, его производное или его вариант. В некоторых случаях ингибитор ROCK находится в концентрации в диапазоне от около 1 пМ до около 20 пМ. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ALK представляет собой SB-431542, его производное или его вариант. В некоторых случаях ингибитор ALK находится в концентрации в диапазоне от около 0,5 пМ до около 10 пМ.

В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда содержит от 2 пМ до около 10 пМ CHIR-99021. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда содержит 50 нг/мл VEGF и 10 нг/мл bFGF. В других вариантах осуществления вторая культуральная среда дополнительно содержит Y-27632 и SB-431542. В различных вариантах осуществления третья культуральная среда содержит 10 пМ Y-27632 и 1 пМ SB-431542. В определенных вариантах осуществления третья культуральная среда дополнительно содержит VEGF и bFGF. В конкретных случаях первая культуральная среда и/или вторая культуральная среда не содержат инсулин.

Клетки можно культивировать на поверхности, такой как синтетическая поверхность для поддержания и/или стимуляции дифференцировки гипоиммуногенных плюрипотентных клеток в клетки сердца. В некоторых вариантах осуществления поверхность содержит полимерный материал, включая, но не ограничиваясь этим, гомополимер или сополимер выбранных одного или более акрилатных мономеров. Неограничивающие примеры акрилатных мономеров и метакрилатных мономеров включают тетра(этиленгликоль)диакрилат, диметакрилат глицерина, диметакрилат 1,4-бутандиола, поли(этиленгликоль)диакрилат, ди(этиленгликоль)диметакрилат, тетра(этиленгликоль)диметакрилат, диакрилат 1,6-гександиола пропоксилата, диакрилат неопентилгликоля, диакрилат триметилолпропанбензоата, триметилолпропанэтоксилат (1

EO/QH) метил, трицикло[5.2.1.$0^{2,6}$]декан диметанола диакрилат, диакрилат этоксилата неопентилгликоля и триметилолпропантриакрилат. Акрилаты синтезируют, как известно в данной области техники, или получают от коммерческого поставщика, такого как Polysciences, Inc., Sigma Aldrich, Inc. и Sartomer, Inc.

В некоторых вариантах осуществления эндотелиальные клетки можно высевать в полимерную матрицу. В некоторых случаях полимерная матрица является биоразлагаемой. Подходящие полимерные матрицы хорошо известны в данной области техники и включают коллаген-GAG, коллаген, фибрин, PLA, PGA и сополимеры PLA/PGA. Дополнительные биоразлагаемые материалы включают поли(ангидриды), поли(гидроксикислоты), поли(ортоэфиры), поли(пропилфумераты), поли(капролактоны), полиамиды, полиаминокислоты, полиацетали, биоразлагаемые полицианоакрилаты, биоразлагаемые полиуретаны и полисахариды.

Также можно использовать небиоразлагаемые полимеры. Другие небиоразлагаемые, но биосовместимые полимеры включают полипиррол, полиамины, политиофен, полистирол, полиэфиры, небиоразлагаемые полиуретаны, полимочевины, поли(этиленвинилацетат), полипропилен, полиметакрилат, полиэтилен, поликарбонаты и поли(этиленоксид). Полимерной матрице можно придавать любую форму, например, в виде частиц, губки, трубки, сферы, нити, спиральной нити, капиллярной сети, пленки, волокна, сетки или листа. Полимерную матрицу можно модифицировать для включения природных или синтетических материалов внеклеточного матрикса и факторов.

Полимерный материал может быть распределен по поверхности материала подложки. Применимые материалы подложек, подходящие для культивирования клеток, включают керамическое вещество, стекло, пластик, полимер или сополимер, любые их комбинации или покрытие из одного материала на другом. В некоторых случаях стекло включает силикатное стекло, стекло пирекс, стекло вайкор, кварцевое стекло, силикон или их производные и т. п.

В некоторых случаях пластики или полимеры, включая дендритные полимеры, включают поли(винилхлорид), поли(виниловый спирт), поли(метилметакрилат), поли(винилацетат - малеиновый ангидрид), поли(диметилсилоксан)монометакрилат, циклические олефиновые полимеры, фторуглеродные полимеры, полистиролы, полипропилен, полиэтиленимин или их производные и т. п. В некоторых случаях сополимеры включают поли(винилацетат и малеиновый ангидрид), поли(стирол и малеиновый ангидрид), поли(этилен и акриловая кислота) или их производные и т. п.

В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных эндотелиальных клеток выделяют из клеток, отличных от эндотелиальных. В некоторых вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных эндотелиальных клеток размножают перед введением. В определенных вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных эндотелиальных клеток размножают и криоконсервируют перед введением.

Дополнительные описания эндотелиальных клеток для применения в

представленной технологии можно найти в WO2020/018615, описание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

4. Клетки щитовидной железы, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные плюрипотентные клетки дифференцируют в предшественников клеток щитовидной железы и фолликулярные органоиды щитовидной железы, которые могут секретировать гормоны щитовидной железы для лечения аутоиммунного тиреоидита. Технологии для дифференцировки клеток щитовидной железы известны в данной области техники.Смотрите, например, Kurmann et al., Cell Stem Cell, 2015 Nov 5;17(5):527-42, в полном объеме включенную в данный документ посредством ссылки и, в частности, 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 наличия ассоциированных с клетками щитовидной железы маркеров или специфических маркеров или путем оценки функциональности.

5. Гепатоциты, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные плюрипотентные клетки дифференцируют в гепатоциты для решения проблемы потери функционирования гепатоцитов или цирроза печени. Существует ряд методов, которые можно использовать для дифференцировки HIP-клеток в гепатоциты; *смотрите*, 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 9:493- 504 (2013), которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении методологий и реагентов для дифференцировки. Дифференцировку анализируют, как известно в данной области техники, обычно путем оценки наличия ассоциированных с гепатоцитами маркеров и/или специфических маркеров, включая, но не ограничиваясь этим, альбумин, альфа-фетопротеин и фибриноген. Дифференцировку также можно измерять функционально, например, по метаболизации аммиака, хранению и поглощению ЛПНП, поглощению и высвобождению ICG и накоплению гликогена.

6. Островковые клетки поджелудочной железы, дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

В представленной технологии предложены гипоиммуногенные плюрипотентные клетки, которые дифференцируют в различные типы островковых клеток поджелудочной железы для последующих трансплантации или прививания субъектам (например, реципиентам). Как понятно специалистам в данной области техники, способы дифференцировки зависят от необходимого типа клеток с использованием известных технологий. Типовые типы островковых клеток поджелудочной железы включают, но не

ограничиваются этим, предшественников островковых клеток поджелудочной железы, незрелые островковые клетки поджелудочной железы, зрелые островковые клетки поджелудочной железы и т. п. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки поджелудочной железы вводят субъекту для лечения диабета.

В некоторых вариантах осуществления островковые клетки поджелудочной железы получены из гипоиммуногенных плюрипотентных стволовых клеток, описанных в данном документе. Применимые способы дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в островковые клетки поджелудочной железы описаны, например, в US9683215; US9157062; и US8927280.

В некоторых вариантах осуществления островковые клетки поджелудочной железы, полученные описанными в данном документе способами, секретируют инсулин. В некоторых вариантах осуществления островковая клетка поджелудочной железы демонстрирует по меньшей мере две характеристики эндогенной островковой клетки поджелудочной железы, например, но не ограничиваясь этим, секрецию инсулина в ответ на глюкозу и экспрессию маркеров бета-клеток.

Типовые маркеры бета-клеток или маркеры предшественников бета-клеток включают, но не ограничиваются этим, с-пептид, Pdxl, переносчик глюкозы 2 (Glut2), HNF6, VEGF, глюкокиназу (GCK), прогормон-конвертазу (PC 1/3), Cdcpl, NeuroD, Ngn3, Nkx2.2, Nkx6.l, Nkx6.2, Pax4, Pax6, Ptfla, Isll, Sox9, Soxl7 и FoxA2.

В некоторых вариантах осуществления выделенные островковые клетки поджелудочной железы вырабатывают инсулин в ответ на повышение уровня глюкозы. В различных вариантах осуществления выделенные островковые клетки поджелудочной железы секретируют инсулин в ответ на повышение уровня глюкозы. В некоторых вариантах осуществления эти клетки имеют отличную морфологию, такую как клеточная морфология типа брусчатки, и/или диаметр от около 17 пм до около 25 пм.

В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные плюрипотентные клетки дифференцируют в бета-подобные клетки или островковые органоиды для трансплантации с целью лечения сахарного диабета I типа (СД1). Клеточные системы являются перспективными для лечения СД1, *смотрите*, например, Ellis et al . (Nat Rev Gastroenterol Hepatol., 14(10):612-628 (2017), включенную в данный документ посредством ссылки. Дополнительно, в Pagliuca et al. (Cell, 159(2):428-39 (2014)) сообщается об успешной дифференцировке β-клеток из hiPSC, ее содержание в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении описанных методов и реагентов для крупномасштабного получения функциональных β-клеток человека из плюрипотентных стволовых клеток человека). Кроме того, в Vegas et al.показано получение β-клеток человека из плюрипотентных стволовых клеток человека с последующей инкапсуляцией для избежания иммунного отторжения хозяином; Vegas et al ., Nat Med, 2016, 22(3):306-11, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении описанных методов и реагентов для крупномасштабного получения функциональных β-клеток человека из плюрипотентных

стволовых клеток человека.

В некоторых вариантах осуществления способ получения популяции гипоиммуногенных островковых клеток поджелудочной железы из популяции гипоиммуногенных плюрипотентных стволовых клеток путем in vitro дифференцировки включает: (a) культивирование популяции HIP-клеток в первой культуральной среде, содержащей один или более факторов, выбранных из группы, состоящей из инсулин-подобного фактора роста (IGF), трансформирующего фактора роста (TGF), фактора роста фибробластов (EGF), эпидермального фактора роста (EGF), фактора роста гепатоцитов (HGF), белка sonic hedgehog (SHH) и фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), суперсемейства трансформирующего фактора роста-b (TORb), костного морфогенетического белка-2 (BMP2), костного морфогенетического белка-7 (BMP7), ингибитора GSK, ингибитора ALK, ингибитора рецептора BMP типа 1 и ретиноевой кислоты, для получения популяции незрелых островковых клеток поджелудочной железы; и (b) культивирование популяции незрелых островковых клеток поджелудочной железы во второй культуральной среде, которая отличается от первой культуральной среды, для получения популяции гипоиммунных островковых клеток поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления ингибитор GSK представляет собой CHIR-99021, его производное или его вариант. В некоторых случаях ингибитор GSK находится в концентрации в диапазоне от около 2 мМ до около 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ALK представляет собой SB-431542, его производное или его вариант. В некоторых случаях ингибитор ALK находится в концентрации в диапазоне от около 1 пМ до около 10 пМ. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда и/или вторая культуральная среда не содержат животной сыворотки.

В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных островковых клеток поджелудочной железы выделяют из клеток, отличных от островковых клеток поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных островковых клеток поджелудочной железы размножают перед введением. В определенных вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных островковых клеток поджелудочной железы размножают и криоконсервируют перед введением.

Дифференцировку анализируют, как известно в данной области техники, обычно путем оценки наличия ассоциированных с β-клетками маркеров или специфических маркеров, включая, но не ограничиваясь этим, инсулин. Дифференцировку также можно измерять функционально, например, путем измерения метаболизма глюкозы, в общем случае смотрите Muraro et al., Cell Syst. 3(4): 385-394.e3 (2016), в полном объеме включенную в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении описанных биомаркеров. После создания бета-клеток их можно трансплантировать (в виде клеточной суспензии или в гелевой матрице, как обсуждается в данном документе) в воротную вену/печень, сальник, желудочно-кишечную слизистую оболочку, костный мозг, мышцы или подкожное пространство.

Дополнительные описания островковых клеток поджелудочной железы, включая дофаминергические нейроны, для применения в представленной технологии можно найти в WO2020/018615, описание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

7. Клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), дифференцированные из гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

В представленной технологии предложены гипоиммуногенные плюрипотентные клетки, которые дифференцируют в различные типы клеток ПЭС для последующих трансплантации или прививания субъектам (например, реципиентам). Как понятно специалистам в данной области техники, способы дифференцировки зависят от необходимого типа клеток с использованием известных технологий. Типовые типы клеток ПЭС включают, но не ограничиваются этим, клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), предшественников клеток ПЭС, незрелые клетки ПЭС, зрелые клетки ПЭС, функциональные клетки ПЭС и т. п.

Применимые способы для дифференцировки эмбриональных плюрипотентных стволовых клеток в клетки ПЭС описаны, например, в US9458428 и US9850463, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки, включая описания. Дополнительные способы получения клеток ПЭС из человеческих эмбриональных или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток можно найти, например, в Lamba et al., PNAS, 2006, 103(34): 12769-12774; Mellough et al., Stem Cells, 2012, 30(4):673-686; Idelson et al., Cell Stem Cell, 2009, 5(4): 396-408; Rowland et al., Journal of Cellular Physiology, 2012, 227(2):457-466, Buchholz et al., Stem Cells Trans Med, 2013, 2(5): 384-393, и da Cruz et al., Nat Biotech, 2018, 36:328-337.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки ПЭС вводят субъекту для лечения офтальмологического расстройства, выбранного из группы, состоящей из влажной макулярной дегенерации, сухой макулярной дегенерации, ювенильной макулярной дегенерации (например, болезни Штаргардта, болезни Беста и ювенильного ретиношизиса), врожденного амавроза Лебера, пигментного ретинита, отслоения сетчатки, возрастной макулярной дегенерации (ВМД), ранней ВМД, промежуточной ВМД, поздней ВМД, не неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации и т. п.

Человеческие плюрипотентные стволовые клетки дифференцировали в клетки ПЭС, используя технологии, описанные в Kamao et al., Stem Cell Reports 2014:2:205-18, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении описанных методов и реагентов для технологий дифференцировки и реагентов; смотрите также Mandai et al., N Engl J Med, 2017, 376:1038-1046, содержание которой в полном объеме включено в данный документ в отношение технологий создания слоев клеток ПЭС и трансплантации пациентам. Дифференцировку можно анализировать, как это известно в данной области техники, обычно путем оценки наличия ассоциированных с ПЭС маркеров и/или специфических маркеров или путем

оценки функциональности. Смотрите, например, Kamao et al., Stem Cell Reports, 2014, 2(2):205-18, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении маркеров, описанных в первом параграфе раздела результатов.

В некоторых вариантах осуществления способ получения популяции гипоиммуногенных клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) из популяции гипоиммуногенных плюрипотентных клеток путем in vitro дифференцировки включает (a) культивирование популяции гипоиммуногенных плюрипотентных клеток в первой культуральной среде, содержащей один из факторов, выбранных из группы, состоящей из активина A, bFGF, BMP4/7, DKK1, IGF1, ноггина, ингибитора BMP, ингибитора ALK, ингибитора ROCK и ингибитора VEGFR, для получения популяции предшественников клеток ПЭС; и (b) культивирование популяции предшественников клеток ПЭС во второй культуральной среде, отличной от первой культуральной среды, для получения популяции гипоиммуногенных клеток ПЭС. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ALK представляет собой SB-431542, его производное или его вариант. В некоторых случаях ингибитор ALK находится в концентрации в диапазоне от около 2 мМ до около 10 пМ. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ROCK представляет собой Y-27632, его производное или его вариант. В некоторых случаях ингибитор ROCK находится в концентрации в диапазоне от около 1 пМ до около 10 пМ. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда и/или вторая культуральная среда не содержат животной сыворотки.

Дифференцировку можно анализировать, как это известно в данной области техники, обычно путем оценки наличия ассоциированных с ПЭС маркеров и/или специфических маркеров или путем оценки функциональности. Смотрите, например, Kamao et al., Stem Cell Reports, 2014, 2(2):205-18, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении раздела результатов.

Дополнительные описания клеток ПЭС для применения можно найти в WO2020/018615, описание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

Для терапевтических применений клетки, полученные в соответствии с раскрытыми способами, как правило, могут быть предоставлены в форме фармацевтической композиции, содержащей изотонический эксципиент, и получены в условиях, которые являются в достаточной степени стерильными для применения человеком. Общие принципы медицинских составов клеточных композиций смотрите в “Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy,” by Morstyn & Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; и “Hematopoietic Stem Cell Therapy,” E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000. Клетки могут быть упакованы в устройстве или контейнере, подходящих для распределения или клинического применения.

8. Т-лимфоциты

В данном документе предложены Т-лимфоциты (Т-клетки), которые получены из гипоиммуногенных индуцированных плюрипотентных стволовых (HIP) клеток. Способы создания Т-клеток, включая CAR Т-клетки, из плюрипотентных стволовых клеток (например, iPSCs) описаны, например, в Iriguchi et al., Nature Communications 12, 430 (2021); Themeli et al., Cell Stem Cell, 16(4):357-366 (2015); Themeli et al., Nature Biotechnology 31:928-933 (2013).

В некоторых вариантах осуществления Т-клетка, полученная из гипоиммуногенной индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, содержит химерный антигенный рецептор (CAR). Любой подходящий CAR может быть включен в Т-клетку, полученную из гипоиммуногенной индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, включая CAR, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка, полученная из гипоиммуногенной индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, содержит полинуклеотид, кодирующий CAR. Для вставки CAR в геномный локус гипоиммуногенной клетки можно использовать любой подходящий способ, включая способы редактирования генов, описанные в данном документе (например, систему CRISPR/Cas).

Полученные из HIP Т-клетки, предложенные в данном документе, применимы для лечения соответствующих видов рака, включая, но не ограничиваясь этим, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому, рак печени, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, колоректальный рак, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, острый миелоидный лимфоидный лейкоз, множественную миелому, рак желудка, аденокарциному желудка, аденокарциному поджелудочной железы, глиобластому, нейробластому, плоскоклеточную карциному легкого, гепатоцеллюлярную карциному и рак мочевого пузыря.

IV. Примеры

Пример 1: Эффекты B2M-/-CIITA-/- CD47 трансгенных человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, трансплантированных отличным от человека приматам

Для исследования эффектов снижения экспрессии ГКГС I и ГКГС II и повышения экспрессии CD47 человеческие $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}$ CD47 трансгенные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (HIP-клетки) трансплантировали реципиентным макакам-резус (отличным от человека приматам или ОЧП) (ксеногенная трансплантация).

Дизайн исследования и введение. Восемь ОЧП (самки/самцы, 2-3 кг, возраст 12-36 месяцев) рандомизировали в две группы (n=4) для слепого введения клеток дикого типа или HIP-клеток. Придерживаясь одобренного IACUC протокола, каждому ОЧП проводили четыре подкожные инъекции ~10^7 человеческих клеток дикого типа или HIP-клеток в спину. Кровь для анализа брали до инъекции (день 0) и в дни 7 и 13 после инъекции. Как клетки дикого типа, так и HIP-клетки также трансгенно экспрессировали люциферазу

светляков для биолюминесцентной визуализации (БЛВ), а выживаемость клеток отслеживали с помощью БЛВ.

У ОЧП, получавших ксеногенные HIP-клетки, не наблюдали никаких системных иммунных ответов после начальной инъекции, в отличие от ОЧП, которым вводили клетки дикого типа. Однако клетки не выживали в течение 13-дневного периода (БЛВ < 5% от начальной), вероятно из-за локальных ксеногенных ответов, а также ответов против носителя (матригель). Чтобы определить, можно ли HIP-клетки повторно вводить с аналогичным отсутствием иммунной активации, ОЧП повторно вводили тот же самый тип клеток (дикий тип или HIP), что и при начальной инъекции, в день 118 после начальных инъекций. Как и ранее, кровь для анализа брали до повторной инъекции и в дни 7 и 13 после нее (дни 125 и 131 после первой инъекции, соответственно), а выживаемость клеток отслеживали с помощью БЛВ. Следует отметить, что у животных, которым повторно вводили ксеногенные HIP-клетки, не наблюдали никакого системного иммунного ответа. Это свидетельствует о том, что HIP-клетки могут ускользать от иммунного распознавания и активации при многократном введении доз.

Активация Т-клеток. Активацию Т-клеток у животных, которым вводили клетки дикого типа и человеческие HIP iPSC, измеряли с помощью анализа Elispot. Для одностороннего анализа Elispot МКПК реципиентов выделяли у макаков-резус в дни 0, 7, 13 и 75 после первой инъекции и дни 7 и 13 после повторной инъекции. Т-клетки очищали из МКПК путем CD3 MACS-сортировки (Miltenyi) и использовали как демонстрирующие ответ клетки. Донорные клетки (дикого типа или HIP-клетки) обрабатывали митомицином (50 мкг/мл в течение 30 минут, Sigma) и использовали как стимулирующие клетки. 1×10^5стимулирующих клеток инкубировали с 5×10^5 реципиентных демонстрирующих ответ Т-клеток в течение 36 часов и количественно определяли частоту пятен IFN-γ, используя планшет-ридер Elispot. В случае животных, которым вводили клетки дикого типа, наблюдаемая активность Elispot была наибольшей в день 7 после инъекции и снижалась к дню 75. После повторной инъекции клеток дикого типа активность Elispot снова была наибольшей в день 7 и снижалась к дню 13 (Фиг. 1). Эти результаты свидетельствуют о системной активации TH1 и остром клеточном иммунном ответе после инъекции клеток дикого типа. В отличие от этого, животные, которым вводили HIP-клетки, имели невыявляемую активность Elispot как при первой, так и при повторной инъекции, что свидетельствует об отсутствии системной активации TH1 или острого клеточного иммунном ответа на модифицированные клетки (Фиг. 2).

Активация МКПК. Также определяли способность иммунных клеток уничтожать введенные клетки. МКПК выделяли у животных, которым повторно вводили клетки дикого типа и HIP-клетки, в день 7 и 13 после повторной инъекции, а анализ уничтожения проводили на платформе XCELLIGENCE MP (ACEA BioSciences, San Diego, CA.). 96-луночные E-планшеты (ACEA BioSciences) покрывали коллагеном (Sigma-Aldrich) и высевали 4×10^5 клеток дикого типа или HIP-клеток в 100 мкл клеточно-специфической среды. После того, как значение клеточного индекса достигало 0,7, добавляли МКПК

резусов от соответствующих животных при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней (Э:М) 1:1. В качестве контроля уничтожения клетки обрабатывали 2% ТРИТОН X100. В качестве контроля выживаемости клетки инкубировали только со средой. Данные стандартизировали и анализировали с помощью программного обеспечения RTCA (ACEA). МКПК, выделенные у животных, которым повторно вводили клетки дикого типа, быстро уничтожали клетки дикого типа in vitro (Фиг. 3). С другой стороны, для HIP-клеток, которые инкубировали с МКПК, выделенными у животных, которым повторно вводили HIP-клетки, уничтожение не наблюдали (Фиг. 4). Уничтожение и выживание клеток подтверждали методом проточной цитометрии, используя окрашивание в отношении живых/мертвых клеток.

Уничтожение цитотоксическими Т-клетками. Также анализировали способность цитотоксических Т-клеток уничтожать донорные клетки. Цитотоксические Т-клетки выделяли из МКПК обезьян посредством сортировки флуоресцентно-активированных клеток в отношении CD3+CD8+ клеток. Аналогично анализу МКПК, цитотоксические Т-клетки, выделенные у животных, которым повторно вводили клетки дикого типа, быстро уничтожали клетки дикого типа in vitro (Фиг. 5), тогда как в случае, когда цитотоксические Т-клетки, выделенные у животных, которым повторно вводили HIP-клетки, инкубировали с HIP-клетками, уничтожение не наблюдали (Фиг. 6). Уничтожение и выживание клеток, как и выше, также подтверждали методом проточной цитометрии. Эти результаты говорят в пользу вывода, что у животных, которым повторно вводили HIP-клетки, отсутствовала системная активация Т-клеток.

Уничтожение NK-клетками и макрофагами. Системный врожденный иммунитет, опосредованный NK-клетками и макрофагами, также анализировали у животных, которым повторно вводили клетки дикого типа или HIP. Анализ уничтожения NK-клетками и анализ уничтожения макрофагами проводили на платформе XCELLIGENCE MP (ACEA BioSciences). 96-луночные E-планшеты (ACEA BioSciences) покрывали коллагеном (Sigma-Aldrich) и высевали 4×10^5 клеток дикого типа или HIP-клеток в 100 мкл клеточно-специфической среды. После того, как значение клеточного индекса достигало 0,7, добавляли NK-клетки резусов или макрофаги резусов, выделенные у обработанных животных, при соотношении Э:М 1:1 с или без 1 нг/мл IL-2 резусов (MyBiosource, San Diego, CA). В качестве контроля уничтожения клетки обрабатывали 2% ТРИТОН X100. Не наблюдали никакого уничтожения стимулированными или нестимулированными NK-клетками и макрофагами клеток дикого типа или HIP-клеток, что свидетельствует о том, что экспрессия CD47 на HIP-клетках была эффективной для защиты от NK-клеток и макрофагов в отсутствие HLA I и HLA II (смотрите Deuse et al., 2019, Nat. Biotechnol., 37:252-258).

Активность донор-специфических антител. Также анализировали выработку донор-специфических антител животными после первой и повторной инъекции клеток дикого типа и HIP-клеток. Сыворотку от обезьян-реципиентов декомплементировали путем нагревания до 56 °C в течение 30 минут. Одинаковые количества сыворотки и

суспензий клеток дикого типа или HIP-клеток (5×10^6 клеток/мл) инкубировали в течение 45 минут при 4 °C. Клетки метили FITC-конъюгированным козьим антителом к IgM или IgG (BD Bioscience) и анализировали методом проточной цитометрии (BD Bioscience). Повышение донор-специфической реактивности наблюдали в дни 7 и 13 после первой инъекции клеток дикого типа и снова в дни 7 и 13 после повторной инъекции клеток дикого типа, со снижением IgM от дня 7 до дня 13 и повышением IgG в течение того же периода времени, что указывает на переключение изотипа (Фиг. 7-8). В отличие от этого, не наблюдали повышение донор-специфической реактивности IgM или IgG после первой инъекции или повторной инъекции HIP-клеток (Фиг. 9-10).

Общая выработка антител. Также анализировали общую выработку антител у животных, которым вводили клетки дикого типа или HIP-клетки, используя наборы ELISA для IgM и IgG (Abcam). После удаления несвязанных белков путем промывки добавляли антитела к IgM, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP). Эти меченные ферментом антитела образуют комплексы с предварительно связанным IgM или IgG. Фермент, связанный с иммуносорбентом, анализируют путем добавления хромогенного субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). У животных, которым вводили клетки дикого типа, наблюдали резкое повышение общего IgM и IgG как после первой, так и после повторной инъекции, при этом наибольшую выработку IgM наблюдали в день 7, а наибольшую выработку IgG наблюдали в день 13, что снова говорит о переключении изотипа (Фиг. 11-12). Что удивительно, у животных, которым вводили HIP-клетки, не наблюдали повышения общего IgM или IgG в любой момент времени (Фиг. 13-14). Вместе эти результаты свидетельствуют о практически полном отсутствии гуморального иммунного ответа на HIP-клетки.

Комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ) и антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ). Дополнительно проводили анализ уничтожения КЗЦ и АЗКЦ на платформе XCELLIGENCE MP (ACEA BioSciences). 96-луночные E-планшеты (ACEA BioSciences) покрывали коллагеном (Sigma-Aldrich) и высевали 4×10^5 клеток дикого типа или HIP-клеток в 100 мкл клеточно-специфической среды. После того, как значение клеточного индекса достигало 0,7, добавляли NK-сыворотку резусов; КЗЦ: цельная сыворотка. Для АЗКЦ: Сыворотку декомплементировали (как описано для DSA) и добавляли NK-клетки или макрофаги в соотношении Э:М 1:1. В качестве контроля уничтожения клетки обрабатывали 2% ТРИТОН X100. С сывороткой животных, которым вводили клетки дикого типа, наблюдали как КЗЦ, так и АЗКЦ уничтожение, тогда как с сывороткой животных, которым вводили HIP-клетки, уничтожения (КЗЦ или АЗКЦ) не наблюдали.

Секвенирование одиночных клеток. В дополнение проводили секвенирование одиночных клеток (10X Genomics), используя объединенные МКПК, полученные в дни 0, 7 и 13 (как после первой, так и после второй инъекции) от животных, которым вводили клетки дикого типа или HIP-клетки. Тогда как животные, которым вводили клетки дикого типа, демонстрировали заметное повышение количества цитотоксических Т-клеток и NK-

клеток после трансплантации, у животных, которым вводили HIP-клетки, никаких изменений в относительных популяциях B-клеток, T-клеток, NK-клеток или цитотоксических T-клеток вплоть до дня 13 не наблюдали.

Выживаемость трансплантированных клеток. Хотя у животных, которым вводили человеческие HIP-клетки, не наблюдали системного иммунного ответа, клетки не выживали из-за локальных ксеногенных ответов. Жизнеспособность клеток отслеживали посредством эксперимента методом биолюминесцентной визуализации (БЛВ). Для БЛВ калиевую соль D-люциферина светляков (375 мг/кг) (Biosynth AG), растворенную в стерильном ФСБ (pH 7,4) (Gibco, Invitrogen), в/в вводили анестезированным обезьянам. Визуализацию животных проводили, используя Largo (Spectral Instruments Imaging, Tucson, AZ). Область интереса (ОИ) биолюминесценции количественно оценивали в единицах максимального числа фотонов в секунду на квадратный сантиметр на стерадиан (ф/с/см^2/ср). Общая люминесценция донорных клеток дикого типа и HIP снижалась в течение 13 дней эксперимента после первой и повторной инъекции и падала ниже 5% от начальной люминесценции к дню 13. Гистопатологический анализ, проведенный на сгустках клеток, выделенных у животных, показал инфильтрацию нейтрофилов или фибрина (как показателя того, что нейтрофилы присутствовали в этом участке), а также признаки реакции на чужеродное тело и реакции гиперчувствительности типа IV против носителя, что указывает на ксеногенный ответ против человеческих клеток и аллергическую реакцию на носитель, соответственно. Аллергическая реакция и реакция на чужеродное тело против носителя были подтверждены с помощью дополнительной контрольной обезьяны, которой вводили только носитель (без клеток) и которая демонстрировала аналогичные гистопатологические признаки.

Обсуждение. Хотя HIP-клетки не выживали, очевидно из-за ксеногенных ответов, очевидное полное отсутствие клеточного или гуморального адаптивного иммунного ответа у животных после первой или повторной инъекции является поразительным и свидетельствует о возможности введения и повторного введения гипоиммунных аллогенных клеток людям.

Все заголовки и обозначения разделов используются лишь в целях ясности и отнесения и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие. Например, специалистам в данной области техники станет понятна полезность объединения различных аспектов из разных заголовков и разделов в соответствии с сущностью и объемом представленной технологии, описанной в данном документе.

Все ссылки, процитированные в данном документе, в полном объеме и во всех целях включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были специально и индивидуально указаны как в полном объеме и во всех целях включенные посредством ссылки.

Можно осуществлять многие модификации и вариации этой заявки без отклонения от ее сущности и объема, как очевидно для специалистов в данной области техники.

Конкретные варианты осуществления и примеры, описанные в данном документе, приведены лишь в качестве примера, а заявка ограничена только в терминах прилагаемой формулы изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, которые ею охвачены.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения расстройства у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II, причем ранее пациенту ввели начальную популяцию таких гипоиммуногенных клеток.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что гипоиммуногенные клетки имеют сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и класса II.

3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что гипоиммуногенные клетки экспрессируют экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что гипоиммуногенные клетки экспрессируют экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что гипоиммуногенные клетки представляют собой дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что плюрипотентные стволовые клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

7. Способ по п. 5 или п. 6, отличающийся тем, что дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из кардиомиоцитов, нейральных клеток, эндотелиальных клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы и Т-клеток.

8. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что гипоиммуногенные клетки включают клетки, полученные из первичных Т-клеток.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, получены из пула Т-клеток, содержащего первичные Т-клетки от одного или более, необязательно двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, десяти или более, двадцати или более, пятидесяти или более или ста или более субъектов, отличных от пациента.

10. Способ по п. 8 или п. 9, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что химерный антигенный рецептор (CAR) выбран из группы, состоящей из:

(a) CAR первого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен;

(b) CAR второго поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена;

(c) CAR третьего поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и

(d) CAR четвертого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из

(a) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки;

(b) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для Т-клетки;

(c) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства;

(d) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток;

(e) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и

(f) антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

13. Способ по п. 10 или п. 11, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающей части, scFv и Fab.

14. Способ по любому из пп. 11-13, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22 или BCMA.

15. Способ по любому из пп. 11-14, отличающийся тем, что трансмембранный домен включает домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранной области TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34, CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и их функционального варианта.

16. Способ по любому из пп. 11-15, отличающийся тем, что сигнальный(е) домен(ы) включает(ют) костимулирующий(е) домен(ы).

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что костимулирующие домены включают два костимулирующих домена, которые не являются одинаковыми.

18. Способ по п. 16 или п. 17, отличающийся тем, что костимулирующий(е) домен(ы) усиливает(ют) выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток.

19. Способ по любому из пп. 11-18, отличающийся тем, что ген цитокина представляет собой эндогенный или экзогенный для гипоиммуногенных клеток ген цитокина.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что провоспалительный цитокин выбран

из группы, состоящей из IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функционального фрагмента.

22. Способ по любому из пп. 11-21, отличающийся тем, что домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент.

23. Способ по любому из пп. 10-22, отличающийся тем, что CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант.

24. Способ по любому из пп. 10-23, отличающийся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант.

25. Способ по любому из пп. 10-24, отличающийся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант.

26. Способ по любому из пп. 10-25, отличающийся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда.

27. Способ по любому из пп. 10-24, отличающийся тем, что CAR содержит (i) анти-CD19 scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант.

28. Способ по любому из пп. 8-27, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

29. Способ по любому из пп. 8-28, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию белка 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4), и/или белка запрограммированной клеточной гибели (PD1).

30. Способ по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что популяцию гипоиммуногенных клеток вводят по меньшей мере через 3 дня или более после начального введения, необязательно по меньшей мере через 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяца или 60 месяцев или более.

31. Способ по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что популяцию

гипоиммуногенных клеток вводят по меньшей мере через 3-7 дней или более после начального введения.

32. Способ по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что популяцию гипоиммуногенных клеток вводят по меньшей мере через 1 месяц или более после начального введения.

33. Способ по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что популяцию гипоиммуногенных клеток вводят по меньшей мере через 2 месяца или более после начального введения.

34. Способ по любому из пп. 1-33, отличающийся тем, что после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень иммунной активации или не вызывает иммунную активацию у пациента.

35. Способ по любому из пп. 1-34, отличающийся тем, что после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень системной активации TH1 или не вызывает системную активацию TH1 у пациента.

36. Способ по любому из пп. 1-35, отличающийся тем, что после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень иммунной активации мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) или не вызывает иммунную активацию МКПК у пациента.

37. Способ по любому из пп. 1-36, отличающийся тем, что после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает появление сниженного уровня донор-специфических антител IgG или не вызывает появления донор-специфических антител IgG против гипоиммуногенных клеток у пациента.

38. Способ по любому из пп. 1-37, отличающийся тем, что после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень выработки антител IgM и IgG или не вызывает выработку антител IgM и IgG против гипоиммуногенных клеток у пациента.

39. Способ по любому из пп. 1-38, отличающийся тем, что после введения популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень уничтожения цитотоксическими Т-клетками или не вызывает уничтожения цитотоксическими Т-клетками гипоиммуногенных клеток у пациента.

40. Способ по любому из пп. 1-39, отличающийся тем, что популяция гипоиммуногенных клеток от начального введения более не присутствует в организме пациента при последующем введении.

41. Способ по любому из пп. 1-40, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный агент в интервале по меньшей мере 3 дней или более до или после начального ведения популяции гипоиммуногенных клеток.

42. Способ по любому из пп. 1-41, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный агент в интервале по меньшей мере 3 дней или более до или после последующего ведения популяции гипоиммуногенных клеток.

43. Способ по любому из пп. 1-42, отличающийся тем, что гипоиммуногенная клетка выбрана из группы, состоящей из плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, Т-клетки, дифференцированной из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, первичной Т-клетки и клетки, полученной из первичной Т-клетки, и гипоиммуногенная клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, содержащую экзогенные полипептиды CD47 и, необязательно, CAR.

44. Способ лечения расстройства у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективных количеств популяции гипоиммуногенных клеток в рамках схемы введения, включающей первое введение, период восстановления и второе введение, причем гипоиммуногенные клетки содержат экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II.

45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что гипоиммуногенные клетки дополнительно имеют сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и класса II.

46. Способ по п. 44 или п. 45, отличающийся тем, что гипоиммуногенные клетки экспрессируют экзогенный полипептид CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA.

47. Способ по любому из пп. 44-46, отличающийся тем, что гипоиммуногенные клетки экспрессируют экзогенный полипептид CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA.

48. Способ по любому из пп. 44-47, отличающийся тем, что гипоиммуногенные клетки представляют собой дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток.

49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что плюрипотентные стволовые клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

50. Способ по п. 48 или 49, отличающийся тем, что дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из кардиомиоцитов, нейральных клеток, эндотелиальных клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы и Т-клеток.

51. Способ по любому из пп. 44-47, отличающийся тем, что гипоиммуногенные клетки включают клетки, полученные из первичных Т-клеток.

52. Способ по п. 51, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, получены из пула Т-клеток, содержащего Т-клетки от одного или более субъектов, отличных от пациента.

53. Способ по п. 51 или п. 52, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор.

54. Способ по п. 53, отличающийся тем, что химерный антигенный рецептор (CAR) выбран из группы, состоящей из:

(a) CAR первого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен,

трансмембранный домен и сигнальный домен;

(b) CAR второго поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена;

(c) CAR третьего поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и

(d) CAR четвертого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из

(a) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки;

(b) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для Т-клетки;

(c) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства;

(d) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток;

(e) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и

(f) антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

56. Способ по п. 54 или п. 55, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающей части, scFv и Fab.

57. Способ по любому из пп. 54-56, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22 или BCMA.

58. Способ по любому из пп. 54-57, отличающийся тем, что трансмембранный домен включает домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранной области TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34, CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и их функционального варианта.

59. Способ по любому из пп. 54-58, отличающийся тем, что сигнальный(е) домен(ы) включает(ют) костимулирующий(е) домен(ы).

60. Способ по п. 59, отличающийся тем, что костимулирующие домены включают два костимулирующих домена, которые не являются одинаковыми.

61. Способ по п. 59 или п. 60, отличающийся тем, что костимулирующий(е) домен(ы) усиливает(ют) выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток.

62. Способ по любому из пп. 54-61, отличающийся тем, что ген цитокина

представляет собой эндогенный или экзогенный для гипоиммуногенных клеток ген цитокина.

63. Способ по п. 62, отличающийся тем, что ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин.

64. Способ по п. 63, отличающийся тем, что провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функционального фрагмента.

65. Способ по любому из пп. 54-64, отличающийся тем, что домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент.

66. Способ по любому из пп. 53-65, отличающийся тем, что CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант.

67. Способ по любому из пп. 53-66, отличающийся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант.

68. Способ по любому из пп. 53-67, отличающийся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант.

69. Способ по любому из пп. 53-68, отличающийся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда.

70. Способ по любому из пп. 53-67, отличающийся тем, что CAR содержит (i) анти-CD19 scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант.

71. Способ по любому из пп. 51-70, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

72. Способ по любому из пп. 51-71, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию белка 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4), и/или белка запрограммированной клеточной гибели (PD1).

73. Способ по любому из пп. 44-72, отличающийся тем, что период восстановления составляет по меньшей мере 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20

недель, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяца или 60 месяцев или более.

74. Способ по любому из пп. 44-72, отличающийся тем, что период восстановления составляет по меньшей мере 3-7 дней или более.

75. Способ по любому из пп. 44-72, отличающийся тем, что период восстановления составляет по меньшей мере 1 месяц или более.

76. Способ по любому из пп. 44-73, отличающийся тем, что период восстановления составляет по меньшей мере 2 месяца или более.

77. Способ по любому из пп. 44-76, отличающийся тем, что второе введение начинают, когда у пациента более не выявляется популяция гипоиммуногенных клеток от первого введения.

78. Способ по любому из пп. 44-77, отличающийся тем, что после первого и/или второго введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень иммунной активации или не вызывает иммунную активацию у пациента.

79. Способ по любому из пп. 44-78, отличающийся тем, что после первого и/или второго введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень системной активации TH1 или не вызывает системную активацию TH1 у пациента.

80. Способ по любому из пп. 44-79, отличающийся тем, что после первого и/или второго введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень иммунной активации мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) или не вызывает иммунную активацию МКПК у пациента.

81. Способ по любому из пп. 44-80, отличающийся тем, что после первого и/или второго введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает появление сниженного уровня донор-специфических антител IgG или не вызывает появления донор-специфических антител IgG против гипоиммуногенных клеток у пациента.

82. Способ по любому из пп. 44-81, отличающийся тем, что после первого и/или второго введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень выработки антител IgM и IgG или не вызывает выработку антител IgM и IgG против гипоиммуногенных клеток у пациента.

83. Способ по любому из пп. 44-82, отличающийся тем, что после первого и/или второго введений популяция гипоиммуногенных клеток вызывает сниженный уровень уничтожения цитотоксическими Т-клетками или не вызывает уничтожения цитотоксическими Т-клетками гипоиммуногенных клеток у пациента.

84. Способ по любому из пп. 44-83, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный агент в интервале по меньшей мере 3 дней или более до или после первого ведения популяции гипоиммуногенных клеток.

85. Способ по любому из пп. 44-84, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный агент в интервале по меньшей мере 3 дней или более до или после второго ведения популяции гипоиммуногенных клеток.

86. Способ по любому из пп. 44-85, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный агент во время периода восстановления.

87. Способ по любому из пп. 44-86, отличающийся тем, что гипоиммуногенная клетка выбрана из группы, состоящей из плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, Т-клетки, дифференцированной из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, первичной Т-клетки и клетки, полученной из первичной Т-клетки, и гипоиммуногенная клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, содержащую экзогенные полипептиды CD47 и, необязательно, CAR.

88. Способ лечения расстройства у пациента путем введения клеток, которые не вызывают системный острый клеточный иммунный ответ у пациента, при этом способ включает:

a) введение пациенту терапевтически эффективного количества первой популяции клеток; и

b) введение пациенту терапевтически эффективного количества второй популяции клеток после периода восстановления после этапа (a),

причем клетки первой и второй популяций содержат экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II, и при этом период восстановления составляет по меньшей мере 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяца или 60 месяцев или более.

89. Способ по п. 88, отличающийся тем, что клетки первой и второй популяций имеют сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и ГКГС класса II.

90. Способ по п. 88 или п. 89, отличающийся тем, что клетки первой и второй популяций содержат экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA.

91. Способ по любому из пп. 88-90, отличающийся тем, что клетки первой и второй популяций содержат экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA.

92. Способ по любому из пп. 88-91, отличающийся тем, что первая и вторая популяции клеток содержат дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток.

93. Способ по п. 92, отличающийся тем, что плюрипотентные стволовые клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

94. Способ по п. 92 или 93, отличающийся тем, что дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из кардиомиоцитов, нейральных клеток, эндотелиальных

клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы и Т-клеток.

95. Способ по любому из пп. 88-91, отличающийся тем, что первая и вторая популяции клеток содержат клетки, полученные из первичных Т-клеток.

96. Способ по п. 95, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, получены из пула Т-клеток, содержащего первичные Т-клетки от одного или более, необязательно двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, десяти или более, двадцати или более, пятидесяти или более или ста или более субъектов, отличных от пациента.

97. Способ по п. 95 или п. 96, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор.

98. Способ по п. 97, отличающийся тем, что химерный антигенный рецептор (CAR) выбран из группы, состоящей из

(a) CAR первого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен;

(b) CAR второго поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена;

(c) CAR третьего поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и

(d) CAR четвертого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

99. Способ по п. 98, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из:

(a) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки;

(b) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для Т-клетки;

(c) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства;

(d) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток;

(e) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и

(f) антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

100. Способ по п. 98 или п. 99, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающей части, scFv и Fab.

101. Способ по любому из пп. 98-100, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22 или BCMA.

102. Способ по любому из пп. 98-101, отличающийся тем, что трансмембранный домен включает домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранной области TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34, CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и их функционального варианта.

103. Способ по любому из пп. 98-102, отличающийся тем, что сигнальный(е) домен(ы) включает(ют) костимулирующий(е) домен(ы).

104. Способ по п. 103, отличающийся тем, что костимулирующие домены включают два костимулирующих домена, которые не являются одинаковыми.

105. Способ по п. 103 или п. 104, отличающийся тем, что костимулирующий(е) домен(ы) усиливает(ют) выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток.

106. Способ по любому из пп. 97-105, отличающийся тем, что ген цитокина представляет собой эндогенный или экзогенный для гипоиммуногенных клеток ген цитокина.

107. Способ по п. 106, отличающийся тем, что ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин.

108. Способ по п. 107, отличающийся тем, что провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функционального фрагмента.

109. Способ по любому из пп. 97-108, отличающийся тем, что домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент.

110. Способ по любому из пп. 96-109, отличающийся тем, что CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант.

111. Способ по любому из пп. 96-110, отличающийся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант.

112. Способ по любому из пп. 96-111, отличающийся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант.

113. Способ по любому из пп. 96-112, отличающийся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда.

114. Способ по любому из пп. 96-111, отличающийся тем, что CAR содержит (i) анти-CD19 scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант.

115. Способ по любому из пп. 95-114, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

116. Способ по любому из пп. 95-115, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию белка 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4), и/или белка запрограммированной клеточной гибели (PD1).

117. Способ по любому из пп. 88-116, отличающийся тем, что период восстановления составляет по меньшей мере 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяца или 60 месяцев или более.

118. Способ по любому из пп. 88-117, отличающийся тем, что этап (b) проводят, когда у пациента более не выявляется первая популяция клеток.

119. Способ по любому из пп. 88-118, отличающийся тем, что первая и/или вторая популяция клеток вызывает сниженный уровень иммунной активации или не вызывает иммунную активацию у пациента.

120. Способ по любому из пп. 88-119, отличающийся тем, что первая и/или вторая популяция клеток вызывает сниженный уровень системной активации TH1 или не вызывает системную активацию TH1 у пациента.

121. Способ по любому из пп. 88-120, отличающийся тем, что первая и/или вторая популяция клеток вызывает сниженный уровень иммунной активации мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) или не вызывает иммунную активацию МКПК у пациента.

122. Способ по любому из пп. 88-121, отличающийся тем, что первая и/или вторая популяция клеток вызывает появление сниженного уровня донор-специфических антител IgG или не вызывает появления донор-специфических антител IgG против вводимых клеток у пациента.

123. Способ по любому из пп. 88-122, отличающийся тем, что первая и/или вторая популяция клеток вызывает сниженный уровень выработки антител IgM и IgG или не вызывает выработку антител IgM и IgG против вводимых клеток у пациента.

124. Способ по любому из пп. 88-123, отличающийся тем, что первая и/или вторая популяция клеток вызывает сниженный уровень уничтожения цитотоксическими Т-клетками или не вызывает уничтожения цитотоксическими Т-клетками вводимых клеток

у пациента.

125. Способ по любому из пп. 88-124, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный агент в интервале по меньшей мере 3 дней или более до или после ведения первой популяции клеток.

126. Способ по любому из пп. 88-125, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный агент в интервале по меньшей мере 3 дней или более до или после ведения второй популяции клеток.

127. Способ по любому из пп. 88-126, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный агент во время периода восстановления.

128. Способ по любому из пп. 88-127, отличающийся тем, что гипоиммуногенная клетка выбрана из группы, состоящей из плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, Т-клетки, дифференцированной из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, первичной Т-клетки и клетки, полученной из первичной Т-клетки, и гипоиммуногенная клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, содержащую экзогенные полипептиды CD47 и, необязательно, CAR.

129. Применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II, для лечения расстройства у пациента, при этом пациент ранее получил начальную популяцию таких гипоиммуногенных клеток.

130. Применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и класса II, для лечения расстройства у пациента, при этом пациент ранее получил начальную популяцию таких гипоиммуногенных клеток.

131. Применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженные уровни полипептидов B2M и CIITA, для лечения расстройства у пациента, при этом пациент ранее получил начальную популяцию таких гипоиммуногенных клеток.

132. Применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47, геномную модификацию гена B2M и геномную модификацию гена CIITA, для лечения расстройства у пациента, при этом пациент ранее получил начальную популяцию таких гипоиммуногенных клеток.

133. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 129-132, отличающееся тем, что популяция гипоиммуногенных клеток содержит дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток.

134. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 133, отличающееся тем, что плюрипотентные стволовые клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

135. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 133 или п. 134, отличающееся тем, что дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из

кардиомиоцитов, нейральных клеток, эндотелиальных клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы и Т-клеток.

136. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 129-132, отличающееся тем, что популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

137. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 136, отличающееся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, получены из пула Т-клеток, содержащего Т-клетки от одного или более субъектов, отличных от пациента.

138. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 136 или п. 137, отличающееся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор (CAR).

139. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 138, отличающееся тем, что химерный антигенный рецептор (CAR) выбран из группы, состоящей из:

(a) CAR первого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен;

(b) CAR второго поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена;

(c) CAR третьего поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и

(d) CAR четвертого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

140. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 139, отличающееся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из:

(a) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки;

(b) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для Т-клетки;

(c) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства;

(d) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток;

(e) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и

(f) антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

141. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 139 или п. 140, отличающееся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающей части, scFv и Fab.

142. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 139-141, отличающееся тем, что антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22 или BCMA.

143. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 139-142, отличающееся тем, что трансмембранный домен включает домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранной области TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34, CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и их функционального варианта.

144. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 139-143, отличающееся тем, что сигнальный(е) домен(ы) включает(ют) костимулирующий(е) домен(ы).

145. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 144, отличающееся тем, что костимулирующие домены включают два костимулирующих домена, которые не являются одинаковыми.

146. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 144 или п. 145, отличающееся тем, что костимулирующий(е) домен(ы) усиливает(ют) выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток.

147. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 139-146, отличающееся тем, что ген цитокина представляет собой эндогенный или экзогенный для гипоиммуногенных клеток ген цитокина.

148. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 147, отличающееся тем, что ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин.

149. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 148, отличающееся тем, что провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функционального фрагмента.

150. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 139-149, отличающееся тем, что домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент.

151. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 138-150, отличающееся тем, что CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант.

152. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 138-151, отличающееся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант.

153. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 138-152, отличающееся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный

тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант.

154. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 138-153, отличающееся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда.

155. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 96-152, отличающееся тем, что CAR содержит (i) анти-CD19 scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант.

156. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 136-138, отличающееся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

157. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 136-156, отличающееся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию белка 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4), и/или белка запрограммированной клеточной гибели (PD1).

158. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 138-157, отличающееся тем, что химерный антигенный рецептор (CAR) выбран из группы, состоящей из:

(a) CAR первого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен;

(b) CAR второго поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена;

(c) CAR третьего поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и

(d) CAR четвертого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

159. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 158, отличающееся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из:

(a) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки;

(b) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для Т-клетки;

(c) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства;

(d) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток;

(e) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и

(f) антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

160. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 159, отличающееся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающей части, scFv и Fab.

161. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 159 или п. 160, отличающееся тем, что антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22 или BCMA.

162. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 158-161, отличающееся тем, что трансмембранный домен включает домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранной области TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34, CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и их функционального варианта.

163. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 158-162, отличающееся тем, что сигнальный(е) домен(ы) включает(ют) костимулирующий(е) домен(ы).

164. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 163, отличающееся тем, что костимулирующие домены включают два костимулирующих домена, которые не являются одинаковыми.

165. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 163 или п. 164, отличающееся тем, что костимулирующий(е) домен(ы) усиливает(ют) выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток.

166. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 158-165, отличающееся тем, что ген цитокина представляет собой эндогенный или экзогенный для гипоиммуногенных клеток ген цитокина.

167. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 166, отличающееся тем, что ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин.

168. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 167, отличающееся тем, что провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функционального фрагмента.

169. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 158-168, отличающееся тем, что домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент.

170. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 138-169, отличающееся тем, что CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант.

171. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 138-170, отличающееся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант.

172. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 138-171, отличающееся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант.

173. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 138-172, отличающееся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда.

174. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 138-171, отличающееся тем, что CAR содержит (i) анти-CD19 scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант.

175. Применение по любому из пп. 138-171, отличающееся тем, что гипоиммуногенная клетка выбрана из группы, состоящей из плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, Т-клетки, дифференцированной из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, первичной Т-клетки и клетки, полученной из первичной Т-клетки, и гипоиммуногенная клетка содержит экзогенный CD47 и/или, необязательно, CAR, и при этом гипоиммуногенная клетка необязательно представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$ и/или необязательно клетку $CIITA^{индел/индел}$.

176. Популяция гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

177. Популяция гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и класса II, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

178. Популяция гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженные уровни полипептидов B2M и CIITA, при этом популяция

гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

179. Популяция гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47, геномную модификацию гена B2M и геномную модификацию гена CIITA, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

180. Популяция гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 176-179, отличающаяся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, получены из пула Т-клеток, содержащего первичные Т-клетки от одного или более, необязательно двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, десяти или более, двадцати или более, пятидесяти или более или ста или более субъектов, отличных от пациента.

181. Популяция гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 176-180, отличающаяся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор (CAR).

182. Популяция гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 176-181, отличающаяся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

183. Популяция гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 176-182, отличающаяся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию белка 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4), и/или белка запрограммированной клеточной гибели (PD1).

184. Популяция гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 181-183, отличающаяся тем, что химерный антигенный рецептор (CAR) выбран из группы, состоящей из:

(a) CAR первого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен;

(b) CAR второго поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена;

(c) CAR третьего поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и

(d) CAR четвертого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

185. Популяция гипоиммуногенных клеток по п. 184, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из:

(a) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки;

(b) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для Т-клетки;

(c) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства;

(d) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток;

(e) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и

(f) антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

186. Популяция гипоиммуногенных клеток по п. 185, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающей части, scFv и Fab.

187. Популяция гипоиммуногенных клеток по п. 185 или п. 186, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22 или BCMA.

188. Популяция гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 184-187, отличающаяся тем, что трансмембранный домен включает домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранной области TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34, CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и их функционального варианта.

189. Популяция гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 184-188, отличающаяся тем, что сигнальный(е) домен(ы) включает(ют) костимулирующий(е) домен(ы).

190. Популяция гипоиммуногенных клеток по п. 189, отличающаяся тем, что костимулирующие домены включают два костимулирующих домена, которые не являются одинаковыми.

191. Популяция гипоиммуногенных клеток по п. 189 или п. 190, отличающаяся тем, что костимулирующий(е) домен(ы) усиливает(ют) выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток.

192. Популяция гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 184-191, отличающаяся тем, что ген цитокина представляет собой эндогенный или экзогенный для гипоиммуногенных клеток ген цитокина.

193. Популяция гипоиммуногенных клеток по п. 192, отличающаяся тем, что ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин.

194. Популяция гипоиммуногенных клеток по п. 193, отличающаяся тем, что провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функционального фрагмента.

195. Популяция гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 184-194, отличающаяся тем, что домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент.

196. Популяция гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 181-195, отличающаяся тем, что CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный

тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант.

197. Популяция гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 181-196, отличающаяся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант.

198. Популяция гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 181-197, отличающаяся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант.

199. Популяция гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 181-198, отличающаяся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда.

200. Популяция гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 181-197, отличающаяся тем, что CAR содержит (i) анти-CD19 scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант.

201. Популяция гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 176-200 для применения в лечении расстройства у пациента, причем пациент ранее получил начальную популяцию таких гипоиммуногенных клеток.

202. Популяция гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 176-201, отличающаяся тем, что гипоиммуногенная клетка выбрана из группы, состоящей из плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, Т-клетки, дифференцированной из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, первичной Т-клетки и клетки, полученной из первичной Т-клетки, и гипоиммуногенная клетка содержит экзогенный CD47 и/или, необязательно, CAR, и при этом гипоиммуногенная клетка необязательно представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$ и/или необязательно клетку $CIITA^{индел/индел}$.

203. Применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

204. Применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и класса II, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

205. Применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные

полипептиды CD47 и имеющих сниженные уровни полипептидов B2M и CIITA, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

206. Применение популяции гипоиммуногенных клеток, содержащих экзогенные полипептиды CD47, геномную модификацию гена B2M и геномную модификацию гена CIITA, при этом популяция гипоиммуногенных клеток содержит клетки, полученные из первичных Т-клеток.

207. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 203-206, отличающееся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, получены из пула Т-клеток, содержащего Т-клетки от одного или более субъектов, отличных от пациента.

208. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 203-207, отличающееся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор (CAR).

209. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 203-208, отличающееся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

210. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 203-209, отличающееся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию белка 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4), и/или белка запрограммированной клеточной гибели (PD1).

211. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 208-210, отличающееся тем, что химерный антигенный рецептор (CAR) выбран из группы, состоящей из:

(a) CAR первого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен;

(b) CAR второго поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена;

(c) CAR третьего поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и

(d) CAR четвертого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

212. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 211, отличающееся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из:

(a) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки;

(b) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для Т-клетки;

(c) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства;

(d) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток;

(e) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и

(f) антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

213. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 212, отличающееся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающей части, scFv и Fab.

214. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 212 или п. 213, отличающееся тем, что антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22 или BCMA.

215. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 211-214, отличающееся тем, что трансмембранный домен включает домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранной области TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34, CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и их функционального варианта.

216. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 211-215, отличающееся тем, что сигнальный(е) домен(ы) включает(ют) костимулирующий(е) домен(ы).

217. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 216, отличающееся тем, что костимулирующие домены включают два костимулирующих домена, которые не являются одинаковыми.

218. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 216 или п. 217, отличающееся тем, что костимулирующий(е) домен(ы) усиливает(ют) выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток.

219. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 211-218, отличающееся тем, что ген цитокина представляет собой эндогенный или экзогенный для гипоиммуногенных клеток ген цитокина.

220. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 219, отличающееся тем, что ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин.

221. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по п. 220, отличающееся тем, что провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функционального фрагмента.

222. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 211-221, отличающееся тем, что домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент.

223. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 208-222, отличающееся тем, что CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант.

224. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 208-223, отличающееся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант.

225. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 208-224, отличающееся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант.

226. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 208-225, отличающееся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда.

227. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 203-224, отличающееся тем, что CAR содержит (i) анти-CD19 scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант.

228. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 203-227 для применения в лечении расстройства у пациента, причем пациент ранее получил начальную популяцию таких гипоиммуногенных клеток.

229. Применение популяции гипоиммуногенных клеток по любому из пп. 176-228, отличающееся тем, что гипоиммуногенная клетка выбрана из группы, состоящей из плюрипотентной стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, Т-клетки, дифференцированной из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, первичной Т-клетки и клетки, полученной из первичной Т-клетки, и гипоиммуногенная клетка содержит экзогенный CD47 и/или, необязательно, CAR, и при этом гипоиммуногенная клетка необязательно представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$ и/или необязательно клетку $CIITA^{индел/индел}$.

230. Способ лечения расстройства у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества популяции гипоиммуногенных Т-клеток, полученных из первичных Т-клеток, которые содержат экзогенные полипептиды CD47 и демонстрируют сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II, причем ранее пациенту ввели начальную популяцию таких гипоиммуногенных Т-клеток.

231. Способ по п. 230, отличающийся тем, что гипоиммуногенные Т-клетки имеют

сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и класса II.

232. Способ по п. 230 или п. 231, отличающийся тем, что гипоиммуногенные Т-клетки экспрессируют экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA.

233. Способ по любому из пп. 230-232, отличающийся тем, что гипоиммуногенные Т-клетки экспрессируют экзогенные полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA.

234. Способ по пп. 230-233, отличающийся тем, что гипоиммуногенные Т-клетки содержат химерный антигенный рецептор.

235. Способ по п. 234, отличающийся тем, что химерный антигенный рецептор (CAR) выбран из группы, состоящей из:

(a) CAR первого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен;

(b) CAR второго поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере два сигнальных домена;

(c) CAR третьего поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере три сигнальных домена; и

(d) CAR четвертого поколения, содержащего антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, три или четыре сигнальных домена и домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина.

236. Способ по п. 235, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из:

(a) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для неопластической клетки;

(b) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для Т-клетки;

(c) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для аутоиммунного или воспалительного расстройства;

(d) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для стареющих клеток;

(e) антигенсвязывающего домена, который нацелен на антиген, характерный для инфекционного заболевания; и

(f) антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном клеточной поверхности клетки.

237. Способ по п. 234 или п. 235, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающей части, scFv и Fab.

238. Способ по любому из пп. 234-237, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен связывается с CD19, CD20, CD22 или BCMA.

239. Способ по любому из пп. 234-238, отличающийся тем, что трансмембранный

домен включает домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранной области TCRα, TCRβ, TCRζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD9, CD16, CD28, CD45, CD22, CD33, CD34, CD37, CD40, CD40L/CD154, CD45, CD64, CD80, CD86, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, CD154, FcεRIγ, VEGFR2, FAS, FGFR2B и их функционального варианта.

240. Способ по любому из пп. 234-239, отличающийся тем, что сигнальный(е) домен(ы) включает(ют) костимулирующий(е) домен(ы).

241. Способ по п. 240, отличающийся тем, что костимулирующие домены включают два костимулирующих домена, которые не являются одинаковыми.

242. Способ по п. 240 или п. 241, отличающийся тем, что костимулирующий(е) домен(ы) усиливает(ют) выработку цитокинов, пролиферацию CAR Т-клеток и/или персистенцию CAR Т-клеток во время активации Т-клеток.

243. Способ по любому из пп. 235-242, отличающийся тем, что ген цитокина представляет собой эндогенный или экзогенный для гипоиммуногенных клеток ген цитокина.

244. Способ по п. 243, отличающийся тем, что ген цитокина кодирует провоспалительный цитокин.

245. Способ по п. 244, отличающийся тем, что провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, IFN-гамма и их функционального фрагмента.

246. Способ по любому из пп. 233-245, отличающийся тем, что домен, который после успешной сигнализации CAR индуцирует экспрессию гена цитокина, включает транскрипционный фактор или его функциональный домен или фрагмент.

247. Способ по любому из пп. 233-246, отличающийся тем, что CAR содержит домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант.

248. Способ по любому из пп. 233-247, отличающийся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; и (ii) домен CD28 или домен 4-1BB, или их функциональный вариант.

249. Способ по любому из пп. 233-248, отличающийся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; и (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант.

250. Способ по любому из пп. 233-249, отличающийся тем, что CAR содержит (i) домен CD3 дзета или иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), или их функциональный вариант; (ii) домен CD28 или его функциональный вариант; (iii) домен 4-1BB или домен CD134, или их функциональный вариант; и (iv) трансген цитокина или костимулирующего лиганда.

251. Способ по любому из пп. 233-250, отличающийся тем, что CAR содержит (i)

анти-CD19 scFv; (ii) шарнирный и трансмембранный домен CD8α или их функциональный вариант; (iii) костимулирующий домен 4-1BB или его функциональный вариант; и (iv) сигнальный домен CD3ζ или его функциональный вариант.

252. Способ по любому из пп. 230-251, отличающийся тем, что гипоиммуногенные Т-клетки имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

253. Способ по любому из пп. 230-252, отличающийся тем, что гипоиммуногенные Т-клетки имеют сниженную экспрессию белка 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4), и/или белка запрограммированной клеточной гибели (PD1).

254. Способ по любому из пп. 230-253, отличающийся тем, что популяцию гипоиммуногенных Т-клеток вводят по меньшей мере через 3 дня или более после начального введения, необязательно по меньшей мере через 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев, 36 месяцев, 48 месяцев, 54 месяца или 60 месяцев или более.

255. Способ по любому из пп. 230-254, отличающийся тем, что популяцию гипоиммуногенных Т-клеток вводят по меньшей мере через 3-7 дней или более после начального введения.

256. Способ по любому из пп. 230-255, отличающийся тем, что популяцию гипоиммуногенных Т-клеток вводят по меньшей мере через 1 месяц или более после начального введения.

257. Способ по любому из пп. 230-256, отличающийся тем, что популяцию гипоиммуногенных Т-клеток вводят по меньшей мере через 2 месяца или более после начального введения.

258. Способ по любому из пп. 230-257, отличающийся тем, что после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных Т-клеток вызывает сниженный уровень иммунной активации или не вызывает иммунную активацию у пациента.

259. Способ по любому из пп. 230-258, отличающийся тем, что после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных Т-клеток вызывает сниженный уровень системной активации TH1 или не вызывает системную активацию TH1 у пациента.

260. Способ по любому из пп. 230-259, отличающийся тем, что после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных Т-клеток вызывает сниженный уровень иммунной активации мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) или не вызывает иммунную активацию МКПК у пациента.

261. Способ по любому из пп. 230-260, отличающийся тем, что после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных Т-клеток вызывает появление сниженного уровня донор-специфических антител IgG или не вызывает

появления донор-специфических антител IgG против гипоиммуногенных клеток у пациента.

262. Способ по любому из пп. 230-261, отличающийся тем, что после начального и/или последующего введений популяция гипоиммуногенных Т-клеток вызывает сниженный уровень выработки антител IgM и IgG или не вызывает выработку антител IgM и IgG против гипоиммуногенных клеток у пациента.

263. Способ по любому из пп. 230-262, отличающийся тем, что после введения популяция гипоиммуногенных Т-клеток вызывает сниженный уровень уничтожения цитотоксическими Т-клетками или не вызывает уничтожения цитотоксическими Т-клетками гипоиммуногенных Т-клеток у пациента.

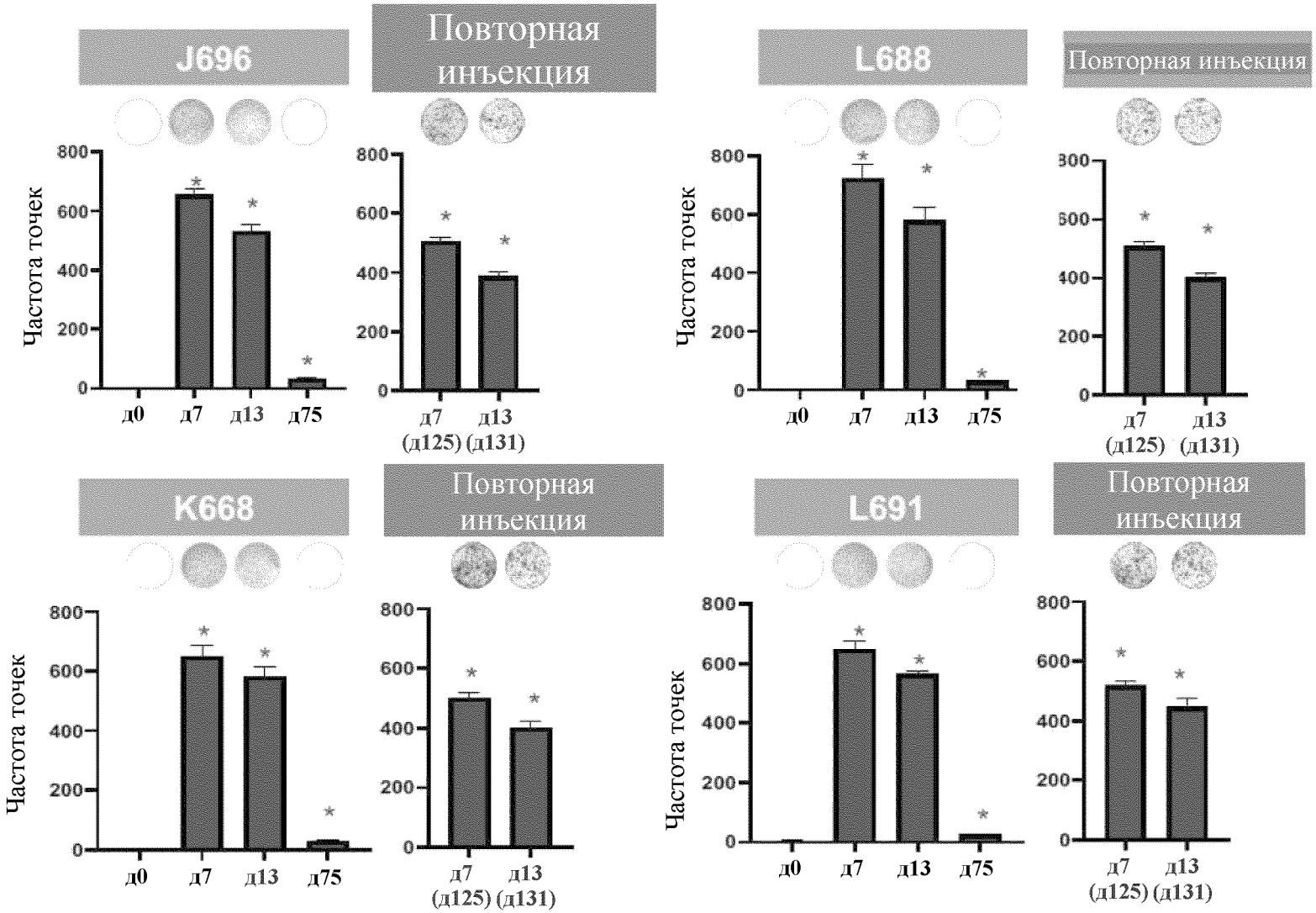
264. Способ по любому из пп. 230-263, отличающийся тем, что популяция гипоиммуногенных Т-клеток от начального введения более не присутствует в организме пациента при последующем введении.

265. Способ по любому из пп. 230-264, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный агент в интервале по меньшей мере 3 дней или более до или после начального ведения популяции гипоиммуногенных Т-клеток.

266. Способ по любому из пп. 230-265, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный агент в интервале по меньшей мере 3 дней или более до или после последующего ведения популяции гипоиммуногенных Т-клеток.

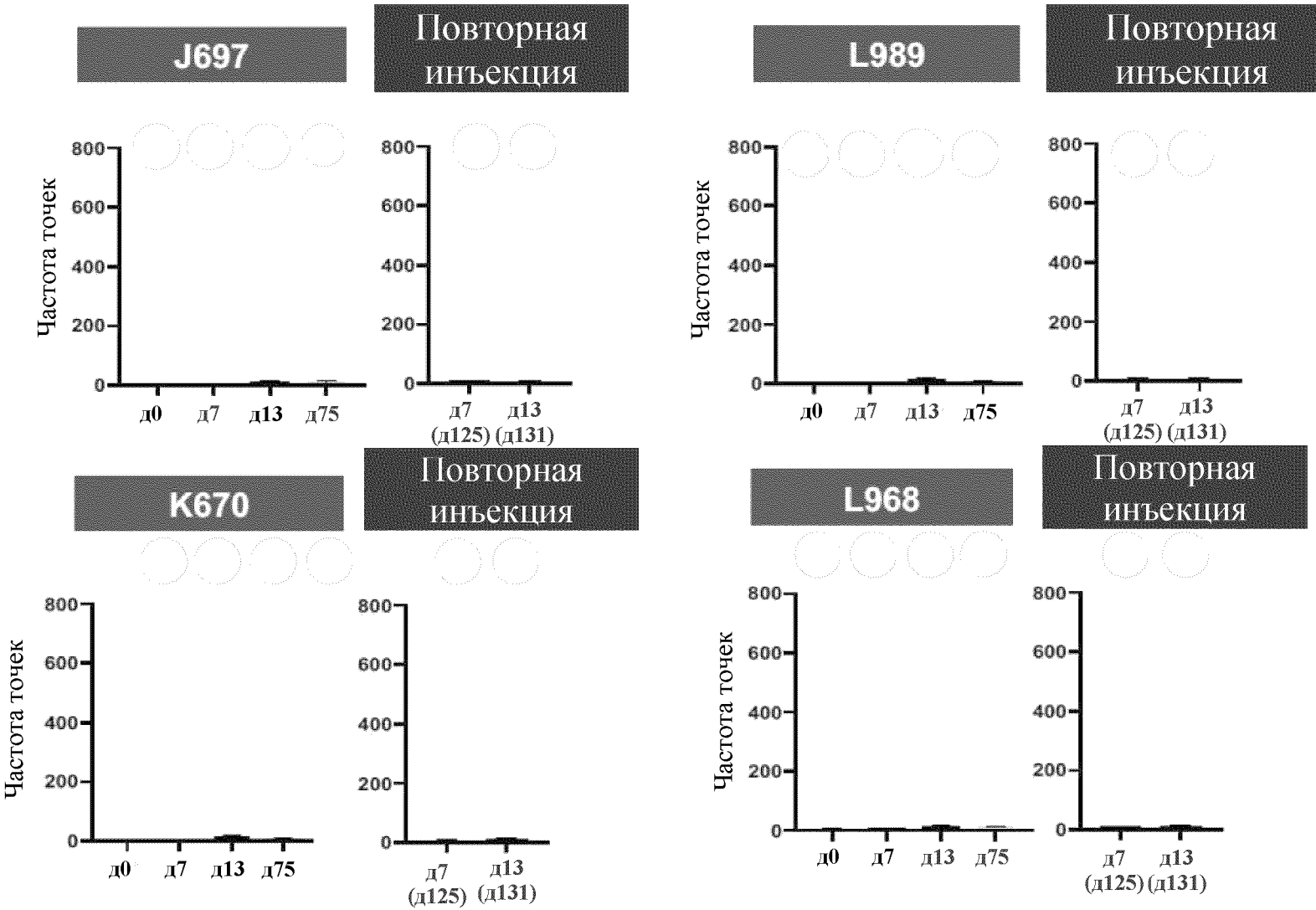
267. Способ по любому из пп. 230-266, отличающийся тем, что гипоиммуногенная клетка представляет собой клетку $B2M^{индел/индел}$, $CIITA^{индел/индел}$, содержащую экзогенные полипептиды CD47 и, необязательно, CAR.

По доверенности

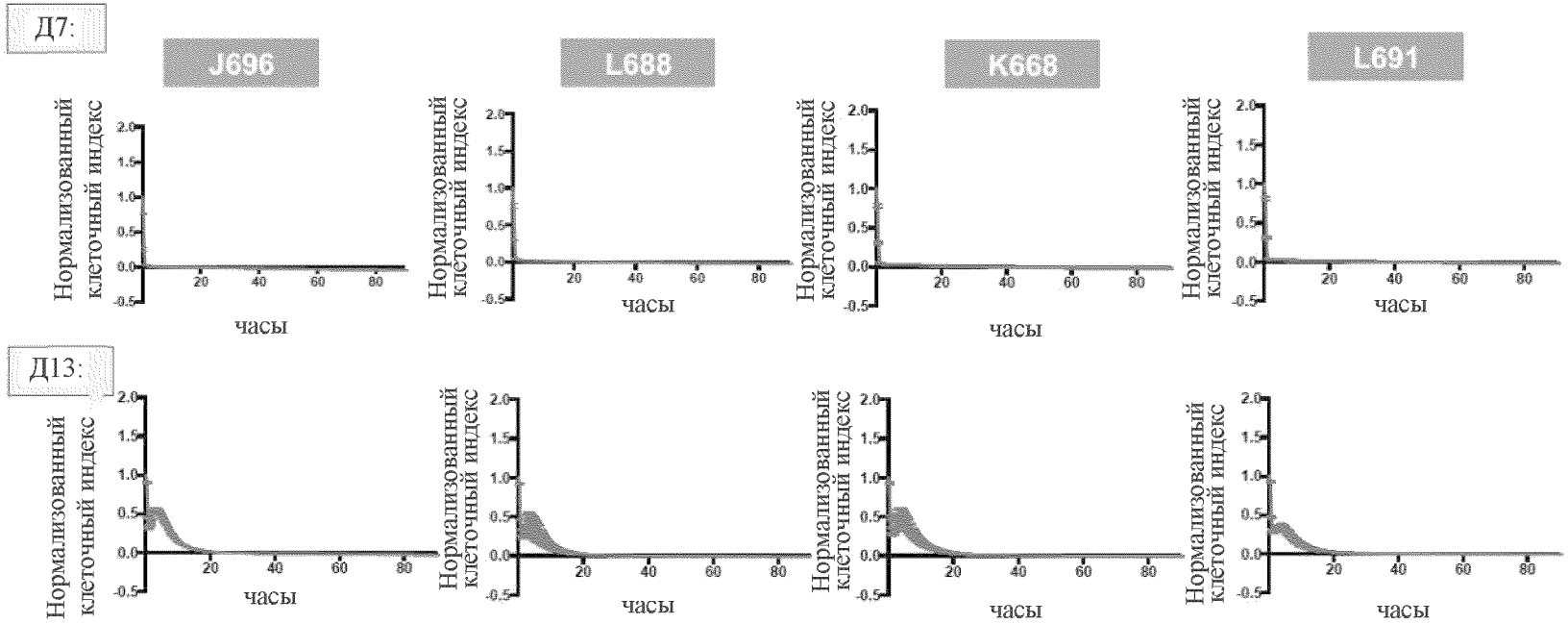

J696
Повторная инъекция
L688
Повторная инъекция
K668
Повторная инъекция
L691
Повторная инъекция
Частота точек
800
600
400
200
0
д0
д7
д13
д75
д7 (д125)
д13 (д131)
300
500

Фиг. 1

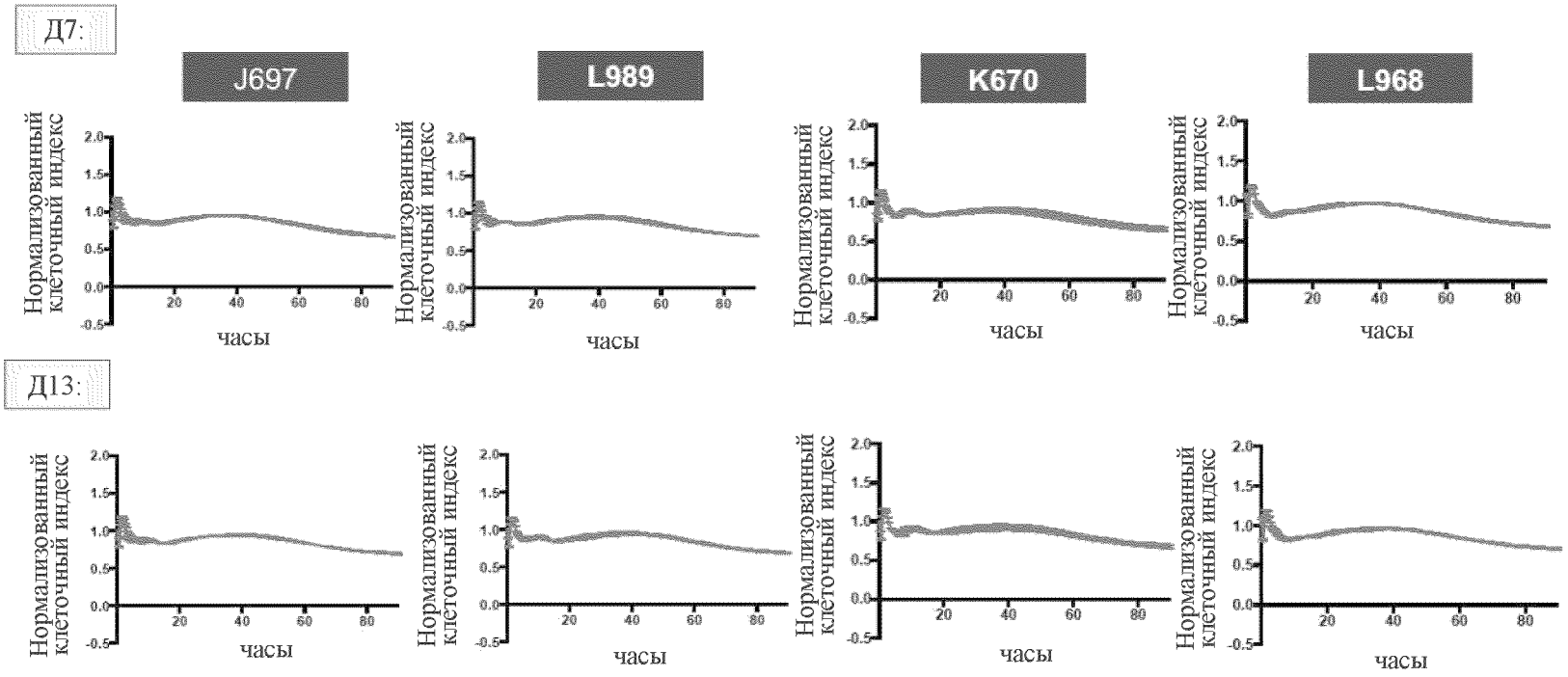
576298


J697
Повторная инъекция
L989
Повторная инъекция
K670
Повторная инъекция
L968
Повторная инъекция
Частота точек
800
600
400
200
0
д0
д7
д13
д75
д7 (д125)
д13 (д131)

Фиг. 2


Д7:
J696
L688
K668
L691
Нормализованный клеточный индекс
часы
Д13:
Нормализованный клеточный индекс
часы

Фиг. 3


Д7:
J697
L989
K670
L968
Нормализованный клеточный индекс
часы
Д13:

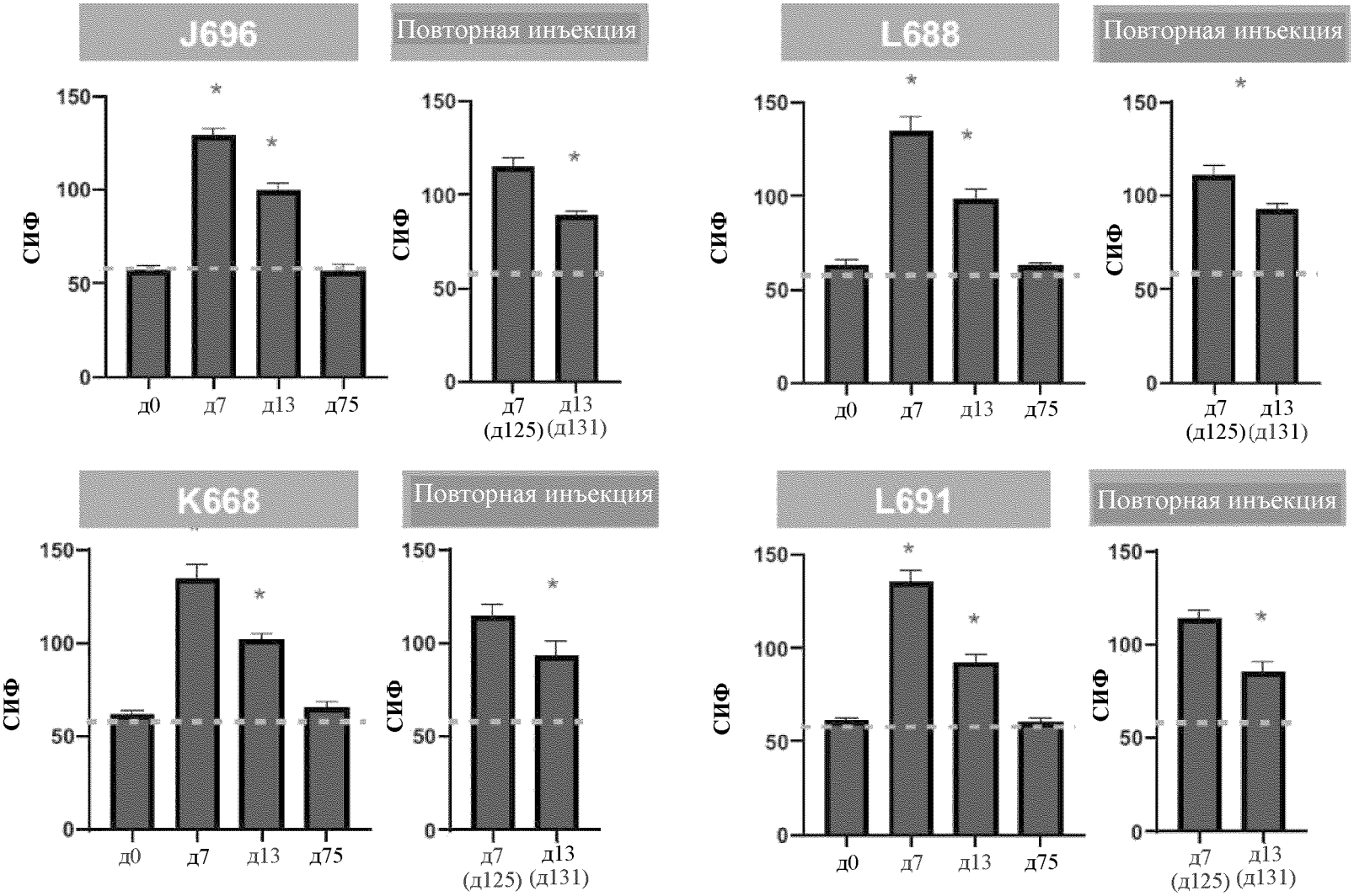
Фиг. 4

J696
J688
K668
L691
Д7:
Д13:
Нормализованный клеточный индекс
часы

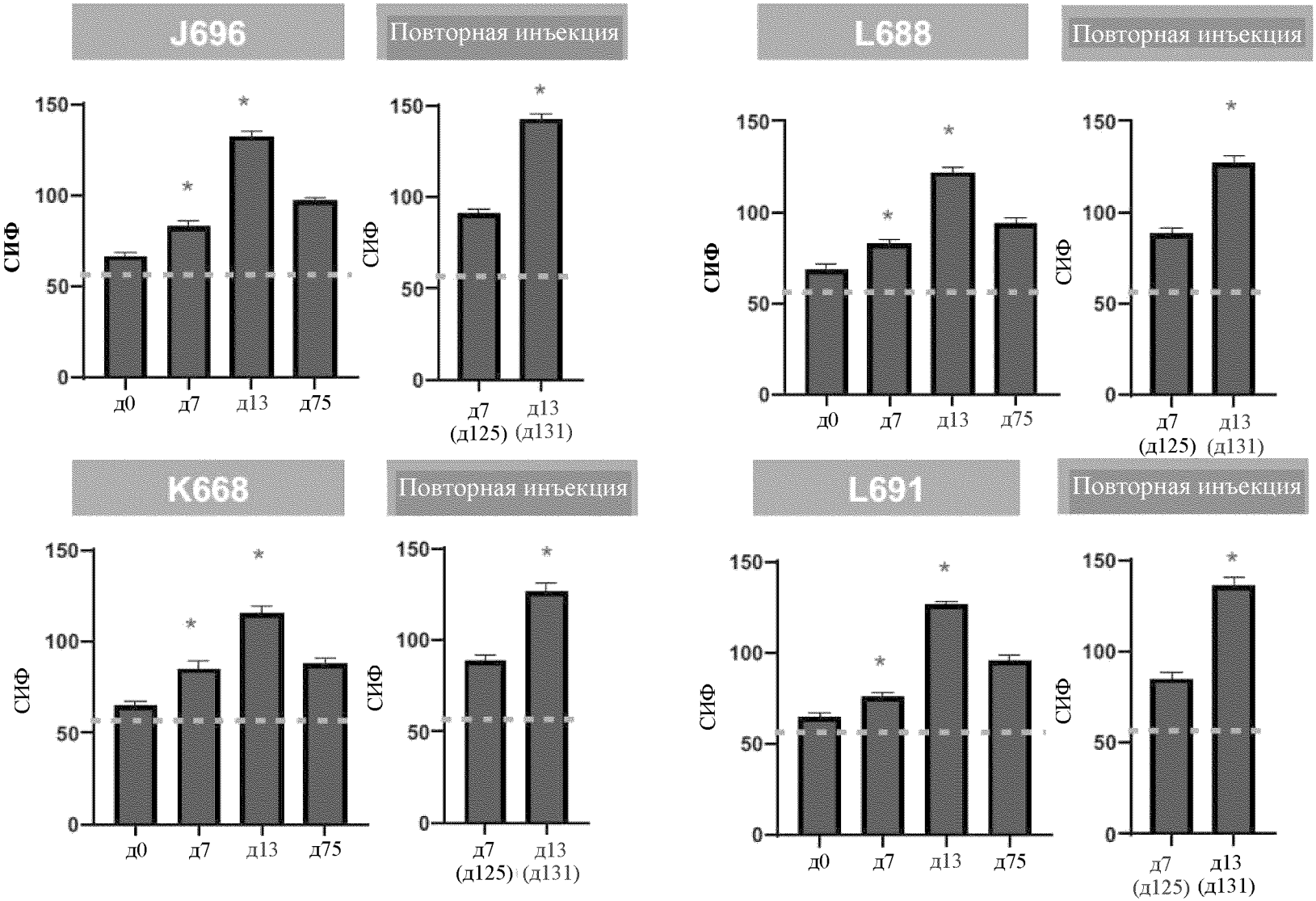
Фиг. 5

Д7:
Д13:
J697
L989
K670
L968
Нормализованный клеточный индекс
часы
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
20
40
60
80

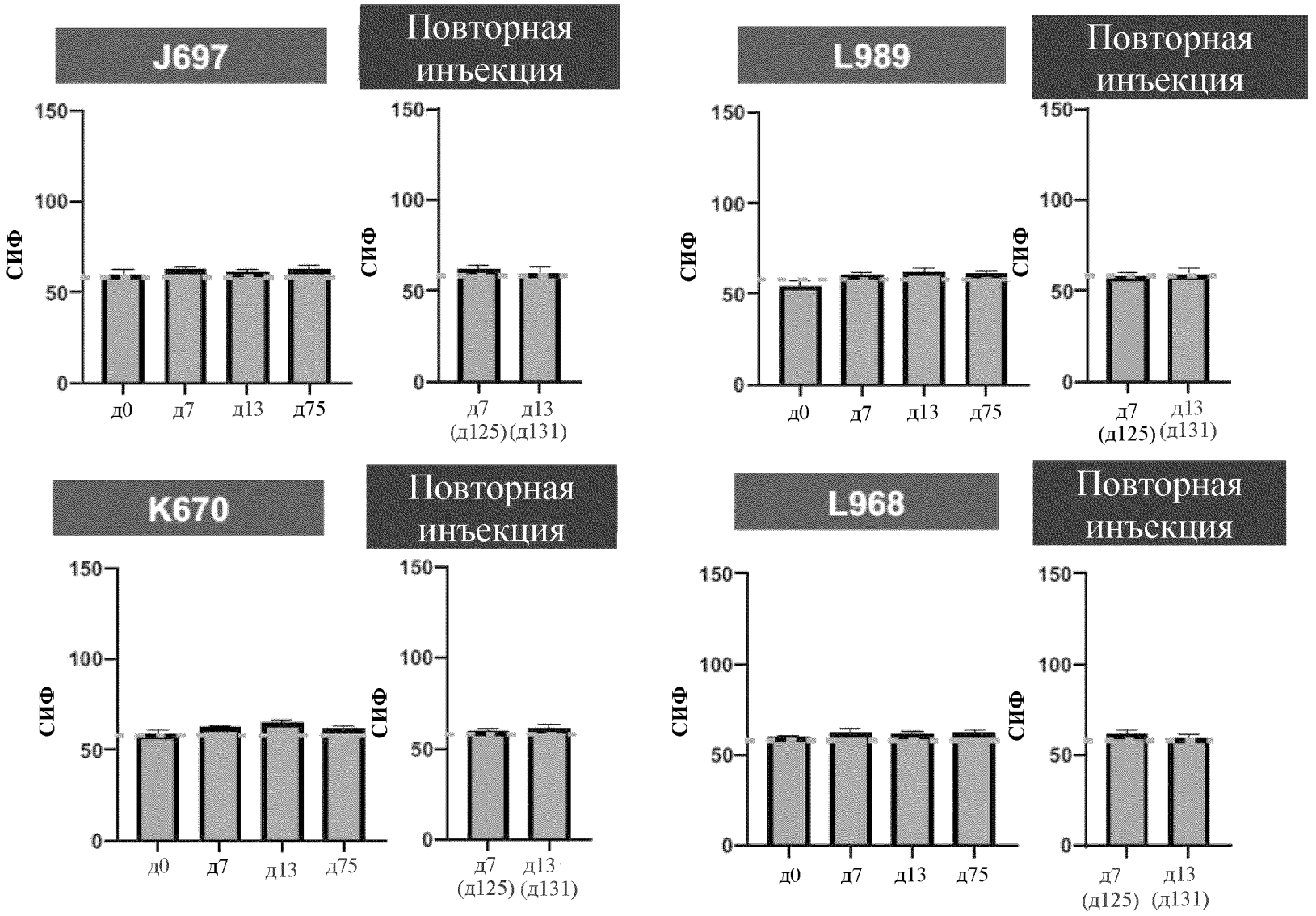
Фиг. 6


J696
Повторная инъекция
L688
Повторная инъекция
K668
Повторная инъекция
L691
Повторная инъекция
СИФ
150
100
50
0
*
д0
д7
д13
д75
д7 (д125)
д13 (д131)

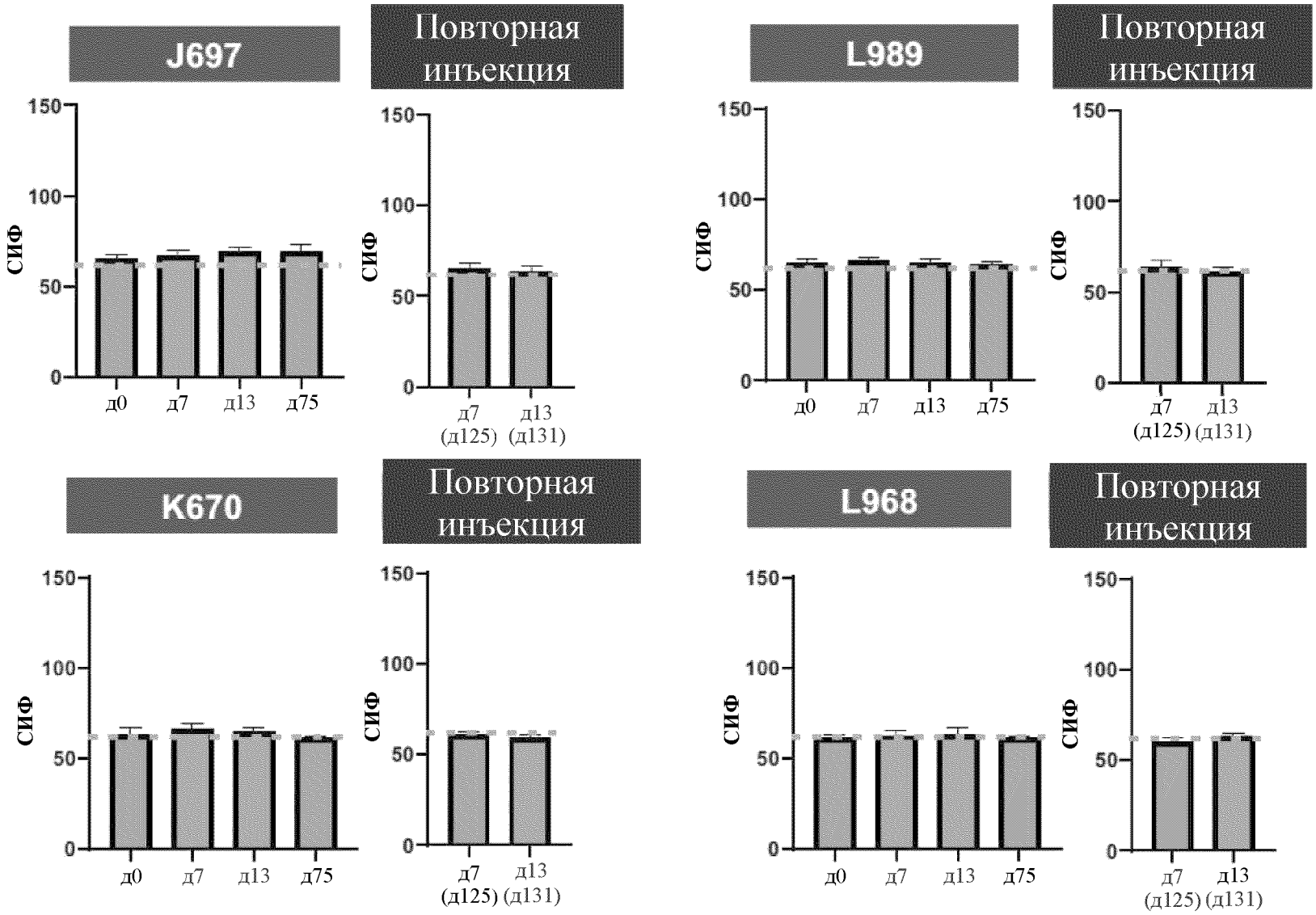
Фиг. 7


J696
Повторная инъекция
L688
Повторная инъекция
K668
Повторная инъекция
L691
Повторная инъекция
СИФ
150
100
50
0
д0
д7
д13
д75
д7 (д125)
д13 (д131)

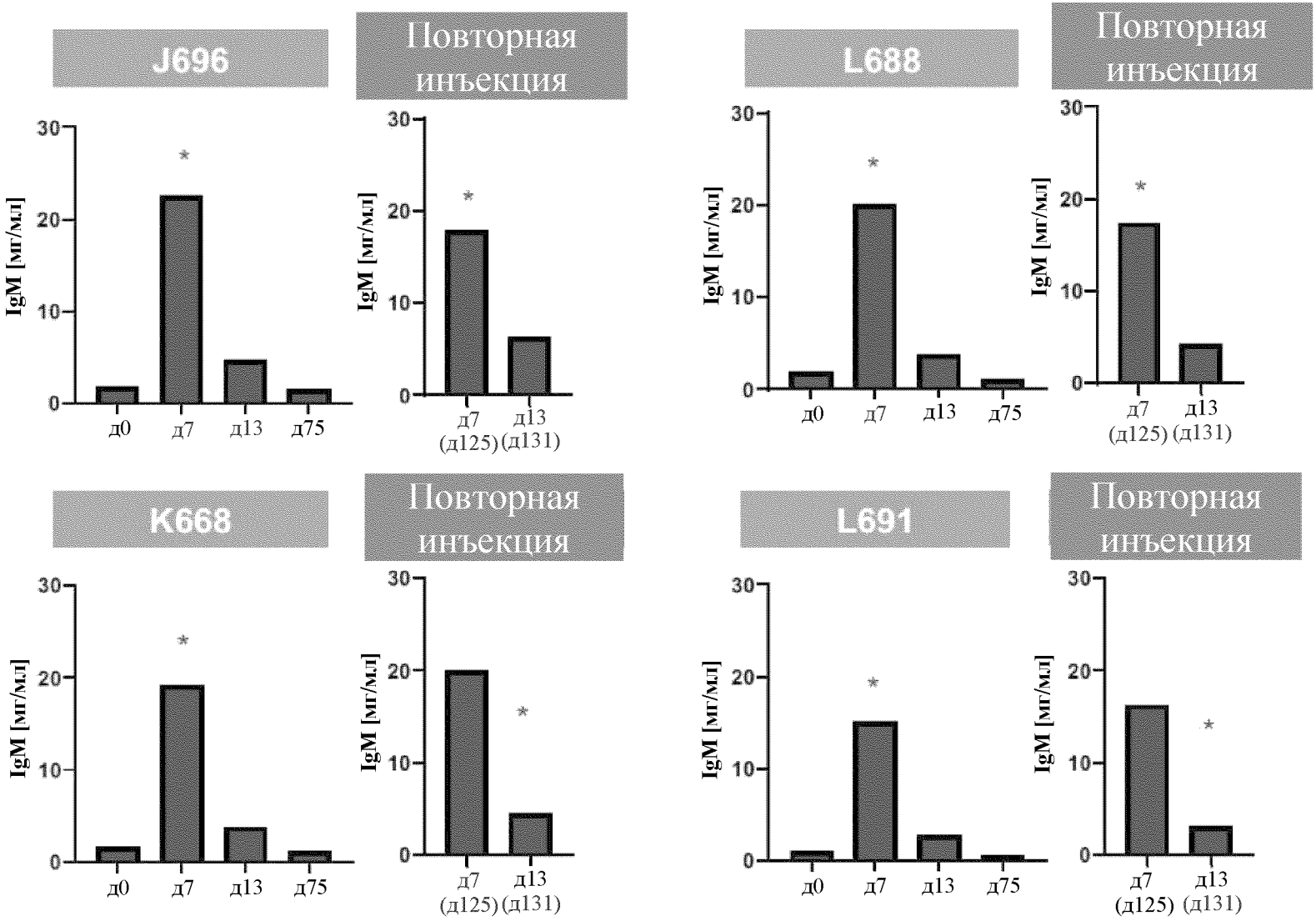
Фиг. 8


J697
Повторная инъекция
L989
Повторная инъекция
K670
Повторная инъекция
L968
Повторная инъекция
СИФ
150
100
50
0
д0
д7
д13
д75
д7 (д125)
д13 (д131)

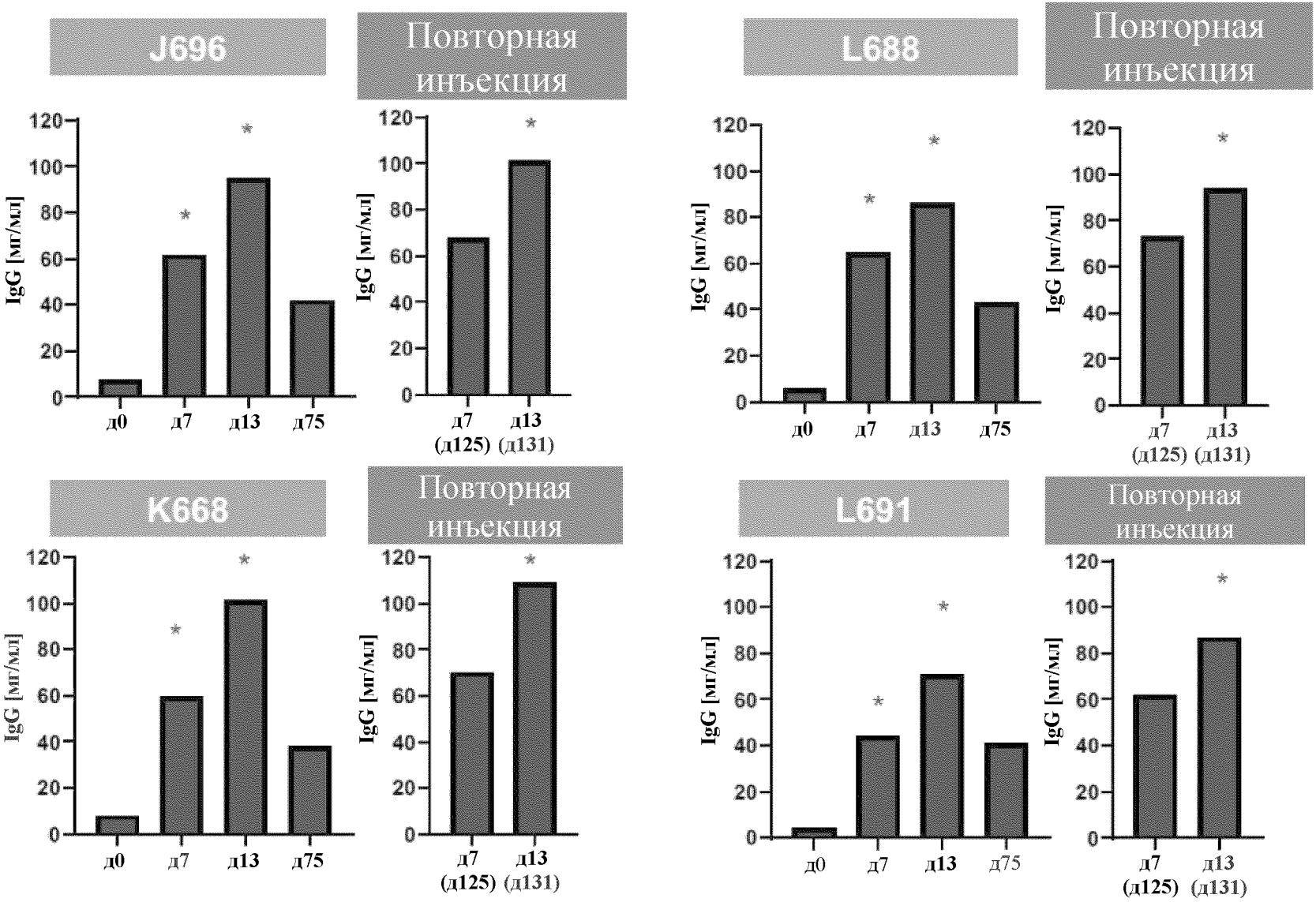
Фиг. 9


J697
Повторная инъекция
L989
Повторная инъекция
K670
Повторная инъекция
L968
Повторная инъекция
СИФ
150
100
50
0
д0
д7
д13
д75
д7 (д125)
д13 (д131)

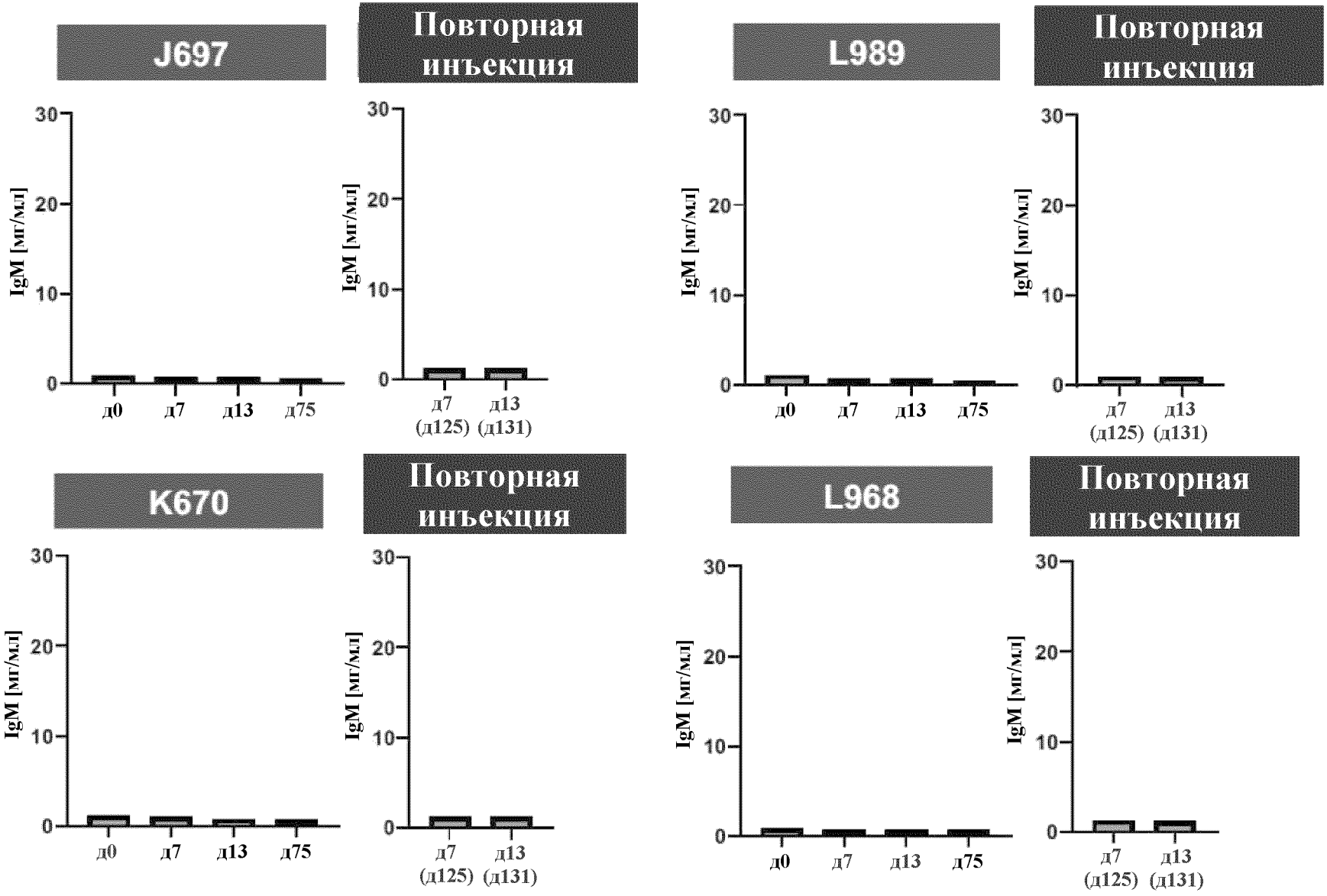
Фиг. 10


J696
Повторная инъекция
L688
Повторная инъекция
K668
Повторная инъекция
L691
Повторная инъекция
IgM [мг/мл]
30
20
10
0
*
д0
д7
д13
д75
д7 (д125)
д13 (д131)

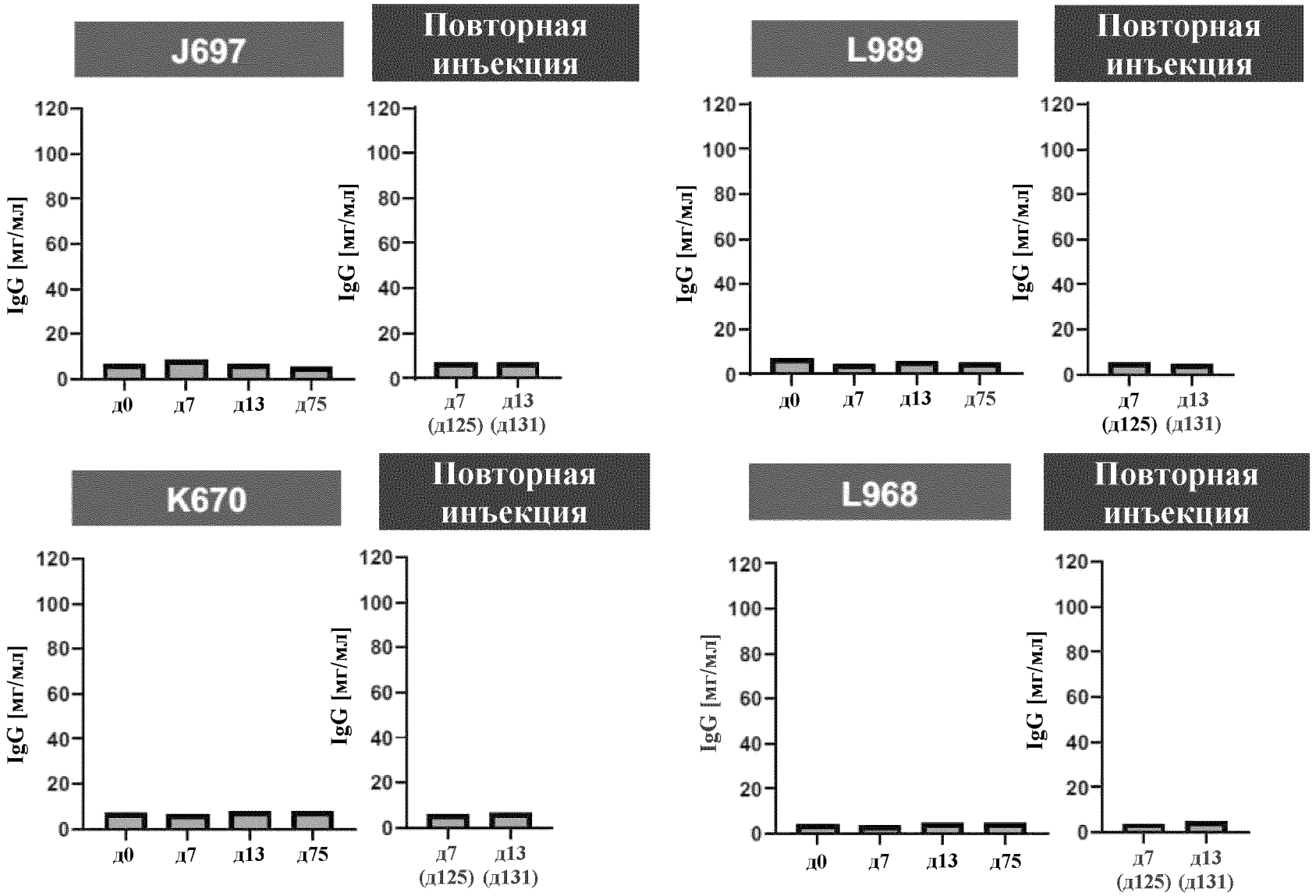
Фиг. 11


J696
Повторная инъекция
L688
Повторная инъекция
K668
Повторная инъекция
L691
Повторная инъекция
IgG [мг/мл]
120
100
80
60
40
20
0
*
д0
д7
д13
д75
д7 (д125)
д13 (д131)

Фиг. 12


J697
Повторная инъекция
L989
Повторная инъекция
K670
Повторная инъекция
L968
Повторная инъекция
IgM [мг/мл]
0
10
20
30
д0
д7
д13
д75
д7 (д125)
д13 (д131)

Фиг. 13


J697
Повторная инъекция
L989
Повторная инъекция
K670
Повторная инъекция
L968
Повторная инъекция
IgG [мг/мл]
120
100
80
60
40
20
0
д0
д7
д13
д75
д7 (д125)
д13 (д131)

Фиг. 14