(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202391066 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.24

(22) Дата подачи заявки
2021.10.09

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

(54) СПОСОБЫ ИНИЦИАЦИИ БЕЗОПАСНЫХ МЕХАНИЗМОВ УНИЧТОЖЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ БЛОКИРУЮЩЕГО CD47-SIRPα АГЕНТА

(31) **63/090,001; 63/135,518**
(32) **2020.10.09; 2021.01.08**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/054326**
(87) **WO 2022/076928 2022.04.14**

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

(72) Изобретатель:
Шрепфер Соня (US)

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

(57) В настоящем изобретении предложены способы и композиции для введения нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47.

202391066 A1

202391066 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577772EA/081

СПОСОБЫ ИНИЦИАЦИИ БЕЗОПАСНЫХ МЕХАНИЗМОВ УНИЧТОЖЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ БЛОКИРУЮЩЕГО CD47-SIRPA АГЕНТА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Данная заявка PCT заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США, сер. № 63/090001, поданной 9 октября 2020 г., и предварительной заявке на патент США, сер. № 63/135518, поданной 8 января 2021 г., обе из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[2] Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в формате ASCII посредством EFS-Web и полностью включен в данный документ посредством ссылки. Копия ASCII, созданная 9 октября 2021 г., называется 2021-10-09 Sana 8007.WO00 sequence listing.txt и имеет размер 121 кб.

[3] Регенеративная медицина (клеточная терапия) предполагает подготовку и доставку клеток пациенту. Эти клетки могут быть плюрипотентными стволовыми клетками (ПСК), которые могут быть дифференцированы в клетки любого типа, клетками, дифференцированными из этих ПСК, или первичными клетками. Эти клетки могут быть сконструированы таким образом, чтобы они содержали одну или более экзогенных нуклеиновых кислот, кодирующих CD47, трансмембранный белок и известный аутоантигенный маркер на клетках-хозяевах в организме и, необязательно, один или более других белков. Когда CD47 связывается с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRPα), белком трансмембранного рецептора на циркулирующих иммунных клетках, для доставки ингибирующего сигнала «не ешь меня», клетка-хозяин, экспрессирующая CD47, избегает отторжения иммунной системой пациента, например, путем гибели, опосредованной макрофагами и/или натуральными клетками-киллерами (NK). Иммуносупрессивные характеристики таких сконструированных клеток могут сделать их опасными для пациента, которому трансплантируют клетки, например, если происходит неконтролируемый рост, что создает необходимость в разработке механизмов безопасности, которые могут модулировать, например, элиминировать с помощью врожденной иммунной системы пациента, трансплантированную популяцию клеток путем воздействия на ось CD47-SIRPα или их взаимодействие.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[4] В настоящем изобретении предложены способы и композиции для модулирования популяции клеток, ранее введенных или трансплантированных субъекту, включающие введение субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом популяция клеток содержит одну или более экзогенных нуклеиновых кислот, кодирующих CD47, и/или экспрессируют или сверхэкспрессируют CD47. Такой блокирующий CD47-SIRPα агент включает малую молекулу, макромолекулу, полипептид, слитый белок, диатело, антитело или их комбинацию, которые связываются с CD47 или SIRPα, таким образом

воздействуя, интерферируя, блокируя и/или ингибируя ось CD47-SIRPα или их взаимодействие. Модулирование популяции клеток, которые сверхэкспрессируют CD47 или иным образом экспрессируют экзогенные полипептиды CD47, включает инициации механизмов уничтожения врожденной иммунной системы у субъекта, которому вводили такие клетки. Механизмы лизиса врожденной иммунной системы могут быть инициированы введением блокирующего CD47-SIRPα агента, и могут включать опосредованное иммунными клетками уничтожение клеток, такое как NK-опосредованное уничтожение, опосредованное макрофагами уничтожение, АЗКЦ и/или КЗЦ.

[5] В одном аспекте в данном документе предложен способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47.

[6] В еще одном аспекте в данном документе предложен способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию Т клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47.

[7] В еще одном аспекте в данном документе предложен способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию Т-клеток (i), сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47, и по меньшей мере одного химерного антигенного рецептора (CAR) и (ii) имеющих сниженную экспрессию молекул MHC класса I HLA, молекул MHC класса II HLA, Т-клеточного рецептора (TCR) альфа и/или TCR бета.

[8] В еще одном аспекте в данном документе предложен способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию Т-клеток, имеющих сниженную экспрессию молекул HLA MHC класса I, молекул HLA MHC класса II, и TCR альфа и сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47 и химерного антигенного рецептора CD19 (CAR).

[9] В еще одном аспекте в данном документе предложен способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию островковых клеток поджелудочной железы сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47.

[10] В еще одном аспекте в данном документе предложен способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию островковых клеток поджелудочной железы (i), сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47, и (ii) имеющих сниженную экспрессию молекул MHC класса I HLA и/или MHC класса II HLA.

[11] В еще одном аспекте в данном документе предложен способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию островковых клеток поджелудочной железы (i),

сконструированных для экспрессии экзогенных полипептидов CD47, CD46 и CD59 и (ii) имеющих сниженную экспрессию молекул MHC класса I HLA и/или молекул MHC класса II HLA.

[12] В еще одном аспекте в данном документе предложен способ уменьшения популяции клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47, у субъекта, включающий: (a) введение субъекту первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента; (b) определение первого результата первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, введенного в (a); (c) необязательно введение второй дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, на основании первого результата в (b); и (d) необязательно определение второго результата для второй дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, введенного в (c).

[13] В еще одном аспекте в данном документе предложен способ, включающий: (a) количественное определение популяции клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47 у субъекта; (b) определение первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, который эффективен для уменьшения популяции клеток по меньшей мере на 20%; и (c) введение субъекту первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента.

[14] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления Т-клетки представляют собой первичные клетки.

[15] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления Т-клетки являются аллогенными.

[16] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления Т-клетки дифференцируются из иПСК.

[17] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления Т-клетки дополнительно сконструированы для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR).

[18] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из вышеупомянутых или нижеупомянутых вариантов осуществления CAR представляет собой CD19 CAR, выбранный из группы, состоящей из тисагенлеклейсела, лизокабтагена маралейцела, аксикабтагена цилолейцела и брексукабтагена аутолейцела.

[19] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления CAR представляет собой CAR к CD19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:117.

[20] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления CAR к CD19 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:116.

[21] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления Т-клетки сконструированы так, чтобы экспрессировать по меньшей мере один дополнительный фактор, выбранный из группы, состоящей из CD16, CD24, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, ингибитора C1, FASL, IDO1, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IL-

10, IL-35, PD-1, PD-L1, серпина b9, CCl21, Mfge8, и их комбинации.

[22] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления отстровковые клетки поджелудочной железы сконструированы так, чтобы экспрессировать по меньшей мере один дополнительный фактор, выбранный из группы, состоящей из CD16, CD24, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, ингибитора C1, FASL, IDO1, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IL-10, IL-35, PD-1, PD-L1, серпина b9, CCl21, Mfge8, и их комбинации.

[23] Способ по любому из пп. 5, 6 или 7, отличающийся тем, что островковые клетки поджелудочной железы сконструированы таким образом, чтобы они имели сниженную экспрессию CD142.

[24] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из вышеупомянутых или нижеупомянутых вариантов осуществления островковые клетки поджелудочной железы представляют собой первичные клетки.

[25] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из вышеупомянутых или нижеупомянутых вариантов осуществления островковые клетки поджелудочной железы дифференцируются из иПСК.

[26] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления CAR и ген, кодирующий экзогенный полипептид CD47, вводили в Т-клетки в бицистронном векторе.

[27] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления бицистронный вектор вводили в Т-клетки с помощью лентивируса.

[28] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления CAR и ген, кодирующий экзогенный полипептид CD47, находятся под контролем одного промотора.

[29] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из вышеупомянутых или нижеупомянутых вариантов осуществления первый результат и второй результат независимо выбраны из группы, состоящей из: (i) уменьшения количества клеток на около 10-100%, (ii) ослабления нежелательного явления на около 10-100% и (iii) комбинации (i) и (ii).

[30] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят: (i) 0,05, 0,1, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг; (ii) один раз каждые 12 часов, один раз каждые 24 часа, один раз каждые 36 часов или один раз каждые 48 часов; и/или (iii) от 1 дня до 3 недель.

[31] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления первая доза и вторая доза являются одинаковыми.

[32] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления клетки являются первичными клетками.

[33] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления первичные клетки представляют собой Т-клетки или островковые клетки поджелудочной железы.

[34] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления клетки дифференцируются из иПСК.

[35] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из клеток сердца, нервных клеток, эндотелиальных клеток, Т-клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы, клеток кожи, клеток крови, первичных клеток и эпителиальных клеток.

[36] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления клетки сконструированы для экспрессии по меньшей мере одного дополнительного фактора, выбранного из группы, состоящей из CD16, CD24, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, ингибитора C1, FASL, IDO1, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IL-10, IL-35, PD-1, PD-L1, серпина b9, CCl21, Mfge8, и их комбинации.

[37] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления Т-клетки сконструированы таким образом, чтобы они имели сниженную экспрессию TCRα и/или TCRβ.

[38] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления Т-клетки сконструированы таким образом, чтобы они имели сниженную экспрессию цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA4), и/или белка программируемой смерти клеток (PD1).

[39] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления ген, кодирующий экзогенный полипептид CD47, вводили в клетку посредством опосредованной гомологичной репарацией (HDR) вставки в геномный локус клетки.

[40] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления геномный локус выбран из группы, состоящей из локуса B2M, локуса CIITA, локуса TRAC, локуса TRBC и локуса «безопасная гавань».

[41] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления локус «безопасная гавань» выбран из группы, состоящей из локуса AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26, и SHS231.

[42] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления CAR связывает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD38, CD123, CD138, BCMA и их комбинации.

[43] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления первый результат и/или второй результат

представляет собой нежелательное явление.

[44] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через один день после того, как субъекту вводили клетки.

[45] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через неделю после того, как субъекту вводили клетки.

[46] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через один месяц после того, как субъекту вводили клетки.

[47] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят после того, как у субъекта наблюдается нежелательное явление, связанное с введенными клетками.

[48] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления нежелательное явление выбрано из группы, состоящей из гиперпролиферации, трансформации, опухолеобразования, синдрома высвобождения цитокинов, реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), связанного с иммунными эффекторными клетками синдрома нейротоксичности (ICANS), воспаления, инфекции, тошноты, рвоты, кровотечения, интерстициального пневмонита, респираторного заболевания, желтухи, потери веса, диареи, потери аппетита, судорог, боли в животе, веноокклюзионной болезни печени (VOD), отторжения трансплантата, поражения органов, бесплодия, гормональных изменений, образования с аномальным ростом, катаракты и посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства (PTLD).

[49] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент содержит CD47-связывающий домен.

[50] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления CD47-связывающий домен содержит сигнальный регуляторный белок альфа (SIRPα) или его фрагмент.

[51] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент содержит домен Fc иммуноглобулина G (IgG).

[52] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления домен Fc IgG содержит домен Fc IgG1.

[53] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления домен Fc IgG1 содержит фрагмент антитела человека.

[54] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых

выше или ниже вариантов осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из TTI-621, TTI-622 и ALX148.

[55] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления домен Fc IgG содержит домен Fc IgG4.

[56] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой антитело.

[57] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из MIAP410, B6H12 и магролимаба.

[58] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят в дозе, эффективной для уменьшения популяции клеток.

[59] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления популяцию клеток уменьшают на около 10-100%.

[60] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления популяция клеток элиминируется.

[61] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления уменьшение популяции клеток происходит посредством иммунного ответа.

[62] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления иммунный ответ представляет собой опосредованное NK-клетками уничтожение клеток, опосредованное макрофагами уничтожение клеток, комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ) и/или антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ).

[63] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту внутривенно, подкожно, внутрибрюшинно, внутримышечно или интракраниально.

[64] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом от 1 до 20 дней в течение периода от 10 дней до 6 месяцев.

[65] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления субъекту вводят блокирующий CD47-SIRPα агент: (i) в дозе 0,05, 0,1, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг; (ii) один раз каждые 12 часов, один раз каждые 24 часа, один раз каждые 36 часов или один раз каждые 48 часов; и/или (iii) от 1 дня до 3 недель.

[66] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых

выше или ниже вариантов осуществления способ дополнительно включает введение субъекту IL-2.

[67] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, которое связывает CD47, биспецифического антитела, которое связывает CD47, слитого белка иммуноцитокина, которое связывает CD47, CD47-содержащего слитого белка, антитела или его фрагмента, которое связывает SIRPα, биспецифического антитела, которое связывает SIRPα, слитого белка иммуноцитокина, который связывает SIRPα, слитого белка, содержащего SIRPα, и их комбинации.

[68] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из магролимаба (Hu5F9-G4), CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801 (NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, и IMC-002.

[69] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против CD47, Fab против CD47, наноантитела VHH против CD47, DARPin против CD47 и их вариантов.

[70] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из ADU-1805, CC-95251, OSE-172 (BI 765063), KWAR23, и P362.

[71] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против SIRPα, Fab против SIRPα, наноантитела VHH против SIRPα, DARPin против SIRPα и их вариантов.

[72] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления SIRPα-содержащий слитый белок содержит CD47-связывающий домен SIRPα, связанный с доменом Fc.

[73] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления домен Fc содержит домен Fc или его часть, выбранные из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[74] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления клетки имеют сниженную экспрессию молекул MHC класса I HLA и/или MHC класса II HLA.

[75] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых

выше или ниже вариантов осуществления экспрессия MHC класса I и/или MHC класса II подавлена.

[76] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления сниженная экспрессия MHC класса I HLA опосредована сниженной экспрессией B2M, а сниженная экспрессия MHC класса II опосредована сниженной экспрессией CIITA.

[77] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления экспрессия B2M и/или CIITA подавлена.

[78] В некоторых вариантах осуществления каждого или любого из упомянутых выше или ниже вариантов осуществления экзогенный полипептид CD47 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[79] На Фиг. 1A-1D показано уничтожение стимулированными IL-2 NK-клетками HIP клеток человека ($B2M^{-/-}$,$CIITA^{-/-}$,$CD47^{+}$) (Фиг. 1A), клеток dKO человека ($B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$) (Фиг. 1B), HIP клеток человека, обработанных антителом изотипического контроля IgG1 к CD47 (Фиг. 1C), или HIP клеток человека, обработанных антителом к CD47 MIP410 (Фиг. 1D).

[80] На Фиг. 2A-2D показано уничтожение макрофагами HIP клеток человека ($B2M^{-/-}$,$CIITA^{-/-}$,$CD47^{+}$) (Фиг. 2A), клеток dKO человека ($B2M^{-/-}$,$CIITA^{-/-}$) (Фиг. 2B), HIP клеток человека, обработанных антителом изотипического контроля IgG1 к CD47 (Фиг. 2C), или HIP клетками человека, обработанных антителом к CD47 MIP410 (Фиг. 2D).

[81] На Фиг. 3A и 3B показаны измерения биолюминесценции HIP клеток человека ($B2M^{-/-}$,$CIITA^{-/-}$,$CD47^{+}$), которые инъецировали подкожно мышам NSG с адоптивно перенесенными NK-клетками человека, после обработки антителом изотипического контроля IgG1 (Фиг. 3A) или антителом к CD47 MIP410 (Фиг. 3B).

[82] На Фиг. 4A-4J представлены данные клеточного анализа в реальном времени индуцированного NK-клетками и макрофагами уничтожения HIP человека (например, $B2M^{-/-}$,$CIITA^{-/-}$,$TRAC^{-/-}$) CAR-T-клеток, экспрессирующих экзогенные конструкции CD47- и CD19-специфических CAR (см., например, «HIP CAR-T, одиночный промотор CD47-CAR») при воздействии антитела к CD47 (см., например, Фиг. 4A-4E). Данные также демонстрируют степень индуцированного NK-клетками и макрофагами уничтожения контрольных CAR-T-клеток, экспрессирующих конструкции CAR и EGFRt, контрольных CAR-T-клеток, по существу аналогичных биоаналогу или суррогату тисагенлеклейсела, и контрольных ложно-трансдуцированных T-клеток (Фиг. 4E-4J).

[83] На Фиг. 5A и 5B показаны данные об ускользании от иммунного ответа in vivo после адоптивного переноса человеческих NK-клеток и макрофагов иммунодефицитным мышам NSG вместе со смесью ложно-трансдуцированных T-клеток человека и CAR-T-клеток человека с двойным нокаутом HLA-I и HLA-II (Фиг. 5A) или гипоиммуногенных CAR-T-клеток человека с тройным нокаутом HLA-I, HLA-II и TCR (Фиг. 5B).

[84] На Фиг. 6 показаны уровни активации T-клеток и связывания донор-

специфического антитела, обнаруженные в образцах гуманизированных мышей, которым инъецировали либо аллогенные CAR-T-клетки (такие как CAR-T-клетки, экспрессирующие конструкции CAR-EGFRt («CAR(EGFRt)»), либо биоаналог или суррогат тисагенлеклейсела («CAR(тисагенлеклейсел)») или гипоиммуногенные человеческие CAR-T-клетки с тройным нокаутом HLA-I, HLA-II и TCR («HIP»).

[85] На Фиг. 7A и 7B показана жизнеспособность in vitro HIP иПСК человека после подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивного переноса NK-клеток и макрофагов и введении антитела к CD47 магролимаба в дозе 100 мкг/мл в период с 0-го по 10-й день (Д0-Д10).

[86] На Фиг. 8A и 8B показано образование тератомы (выживаемость HIP иПСК) у мышей NSG после подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивного переноса NK-клеток и введения изотипического контроля IgG4.

[87] На Фиг. 9A и 9B показана жизнеспособность клеток in vivo HIP иПСК человека после подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивного переноса NK-клеток и введения антитела к CD47 магролимаба в период с 0-го по 10-й день (Д0-Д10).

[88] На Фиг. 10A и 10B показана жизнеспособность in vitro HIP иПСК человека при подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивном переносе NK-клеток и макрофагов и введении антитела к CD47 MIAP410 дозе 100 мкг/мл в период с 0-го по 10-й день (Д0-Д10).

[89] На Фиг. 11A и 11B показано образование тератомы (выживаемость HIP иПСК) у мышей NSG после подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивного переноса NK-клеток и введения изотипического контроля IgG1.

[90] На Фиг. 12A и 12B показана жизнеспособность клеток in vivo HIP иПСК человека после подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивного переноса NK-клеток и введения антитела к CD47 MIAP410 в период с 0-го по 10-й день (Д0-Д10).

[91] На Фиг. 13A и 13B показана жизнеспособность клеток in vivo HIP иПСК человека после подкожной трансплантации $15{,}5\times10^4$ иПСК человека и адоптивного переноса 1×10^6 NK-клеток человека и введения антитела к CD47 MIAP410 на 0 день, 1 день и 3 день.

[92] На Фиг. 14A и 14B показана жизнеспособность клеток in vivo HIP иПСК человека при подкожной трансплантации $16{,}5\times10^4$ иПСК человека и адоптивном переносе 1×10^6 NK-клеток человека и внутрибрюшинном введении антитела к CD47 MIAP410 на 0 день, 1 день и 3 день.

[93] На Фиг. 15A и 15B показано образование тератомы (выживаемость HIP иПСК) в головном мозге мышей NSG после интракраниальной трансплантации 5×10^4 человеческих иПСК и адоптивного переноса 1×10^6 NK-клеток и введения изотипического контроля IgG4 на 0 день, 1 день и 3 день.

[94] На Фиг. 16A и 16B показана жизнеспособность клеток in vivo HIP иПСК человека в головном мозге после интракраниальной трансплантации 5×10^4 иПСК человека и адоптивном переносе 1×10^6 NK-клеток человека и внутрибрюшинном введении

антитела к CD47 MIAP410 на 0 день, 1 день и 3 день.

[95] На Фиг. 17A и 17B показана жизнеспособность клеток in vivo HIP иПСК человека в головном мозге при интракраниальной трансплантации 5×10^4 иПСК человека и адоптивном переносе 1×10^6 NK-клеток человека и внутрибрюшинном введении антитела к CD47 MIAP410 на 0 день, 1 день и 3 день, при этом гематоэнцефалический барьер был нарушен инъекциями маннитола.

[96] На Фиг. 18A-18F показаны данные об уничтожении in vitro HIP иПСК человека в отношении уничтожения, опосредованного NK-клеточной АЗКЦ, NK-клетками и КЗЦ (A), уничтожения, опосредованного NK-клеточной АЗКЦ, NK-клетками и КЗЦ, при введении IgG1Fc к SIRPα (B), уничтожения, опосредованного NK-клеточной АЗКЦ, NK-клетками и КЗЦ, при введении IgG4Fc к SIRPα (C), уничтожения, опосредованного макрофагальной АЗКЦ и макрофагами (D), уничтожения, опосредованного макрофагальной АЗКЦ и макрофагами, при введении IgG1Fc к SIRPα (E) и уничтожения, опосредованного макрофагальной АЗКЦ и макрофагами, при введении IgG4Fc к SIRPα.

[97] На Фиг. 19A и 19B показана жизнеспособность клеток in vivo HIP иПСК человека при подкожной трансплантации иПСК человека и адоптивном переносе NK-клеток человека и введении IgG1Fc к SIRPα на 0 день, 1 день и 3 день с повторной инъекцией HIP иПСК человека на Д20 и Д40 с последующими инъекциями IgG1Fc к SIRPα (в течение 3 дней).

[98] На Фиг. 20A и 20B показана жизнеспособность клеток in vivo HIP иПСК человека при подкожной трансплантации иПСК человека и адоптивном переносе NK-клеток человека и введении IgG4Fc к SIRPα на 0 день, 1 день и 3 день с повторной инъекцией HIP иПСК человека на Д20 и Д40 с последующими инъекциями IgG4Fc к SIRPα (в течение 3 дней).

[99] На Фиг. 21A и 21B показано образование тератомы (выживаемость HIP иПСК) в головном мозге мышей NSG после интракраниальной трансплантации иПСК человека и адоптивного переноса NK-клеток человека и микроглии человека и введения изотипического контроля IgG1 на 0 день, 1 день, и 3 день.

[100] На Фиг. 22A и 22B демонстрируют жизнеспособность клеток in vivo HIP иПСК человека при интракраниальной трансплантации иПСК человека и адоптивном переносе NK-клеток человека и микроглии человека и введении IgG1Fc к SIRPα на 0 день, 1 день, и 3 день.

[101] На Фиг. 23A и 23B показано образование тератомы (выживаемость HIP иПСК) в головном мозге мышей NSG при интракраниальной трансплантации иПСК человека и адоптивном переносе человеческих NK-клеток и микроглии человека и внутрибрюшинном введении изотипического контроля IgG1 на 0 день, 1 день, и 3 день.

[102] На Фиг. 24A и 24B показана жизнеспособность клеток in vivo HIP иПСК человека в головном мозге при интракраниальной трансплантации иПСК человека и адоптивном переносе NK-клеток человека и микроглии человека и внутрибрюшинном введении IgG1Fc SIRPα на 0 день, 1 день, и 3 день, при этом гематоэнцефалический

барьер был нарушен инъекциями маннитола.

[103] На Фиг. 25A и 25B показано образование тератомы (выживаемость HIP иПСК) в головном мозге мышей NSG после интракраниальной трансплантации иПСК человека и адоптивного переноса NK-клеток человека и микроглии человека и введения изотипического контроля IgG4 на 0 день, 1 день, и 3 день.

[104] На Фиг. 26A и 26B показана жизнеспособность клеток in vivo HIP иПСК человека в головном мозге при интракраниальной трансплантации иПСК человека и адоптивном переносе NK-клеток человека и микроглии человека и внутрибрюшинном введении IgG4c к SIRPα на 0 день, 1 день, и 3 день.

[105] На Фиг. 27 показана жизнеспособность HIP иПСК человека при подкожной инъекции иПСК человека мышам NSG наряду с адоптивным переносом человеческих NK-клеток и антителом к SIRPα путем подкожного введения, смешанных в дозе 1 мг на Д0, Д1 и Д3. Повторную инъекцию HIP иПСК человека проводили на Д20 50000 клеток (50 тыс.) подкожно (в левый бок) вместе с 1 мг B6H12 на Д20 (смешанный), Д21 и Д23. Повторную инъекцию HIP иПСК человека проводили на Д40 50 тысяч подкожно (в верхнюю часть средней части грудной клетки) вместе с 1 мг B6H12 на Д40 (смешанный), Д41 и Д43.

[106] На Фиг. 28A и 28B показаны данные по блокированию CD47 с помощью IgG1Fc к SIRPα или IgG4Fc к SIRPα in vitro, с эффектами, изученными на NK-клетках (A) и макрофагах (B).

[107] На Фиг. 29A и 29B показаны данные по блокированию CD47 с помощью IgG1Fc к SIRPα или IgG4Fc к SIRPα in vitro с эффектами, изученными на CD19 HIP CAR и NK-клетках (A) и CD19 HIP CAR и макрофагах (B).

[108] На Фиг. 30 показано исследование мышей NSG с использованием модели опухоли Nalm6. Адоптивный перенос человеческих NK-клеток и HIP CAR-T-клеток человека осуществляли внутривенно со слитым белком и без него внутривенно. 100 ЕД/мл IL-2 размораживали в течение ночи перед сортировкой, а затем 100 ЕД/мл IL-2 в течение ночи после сортировки и перед инъекцией.

[109] На Фиг. 31 показано исследование мышей NSG с использованием модели опухоли Nalm6. Адоптивный перенос человеческих NK-клеток и HIP CAR-T-клеток человека осуществляли внутривенно со слитым белком и без него внутривенно. 100 ЕД/мл IL-2 размораживали в течение ночи перед сортировкой, а затем 100 ЕД/мл IL-2 в течение ночи после сортировки и перед инъекцией. Когда HIP CAR были устранены с помощью стратегии безопасности, опухоль Nalm-6 росла.

[110] На Фиг. 32 показано исследование мышей NSG с использованием модели опухоли Nalm6.

[111] На Фиг. 33 и 34 показано исследование мышей NSG с использованием модели опухоли Nalm6, где HIP CAR-T-клетки элиминированы слитыми белками IgG1 и IgG4 к CD47, что указывает на рост опухоли Nalm-6.

[112] На Фиг. 35A и 35B показана жизнеспособность клеток in vitro HIP первичных

островков мыши при введении антитела к CD47 MIAP410 в результате опосредованного NK-клетками уничтожения (A) и опосредованного макрофагами уничтожения (B).

[113] На Фиг. 36 показана модель исследования островков поджелудочной железы на мышах.

[114] На Фиг. 37A-37C показаны данные о жизнеспособности клеток для аллогенных HIP островков и по ремиссии диабета у аллогенных мышей при внутримышечном введении изотипического контроля IgG1.

[115] На Фиг. 38A-38C показаны данные о жизнеспособности клеток для HIP аллогенных островков и по ремиссии диабета у аллогенных мышей при внутримышечном введении 5 мг MIAP410 на Д7-Д18.

[116] На Фиг. 39A-B показана жизнеспособность HIP иПСК после инъекции HIP иПСК человека мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток и макрофагов человека и введением MIAP410 с Fc изотипа IgG1 со стимуляцией IL-2 in vivo или без нее.

[117] На Фиг. 40A-B показана жизнеспособность HIP иПСК при инъекции HIP иПСК человека мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток и макрофагов человека и трехкратным введением высокой дозы MIAP410 с Fc изотипа IgG1.

[118] На Фиг. 41 показана жизнеспособность HIP иПСК в головном мозге при местном подкожном введении или внутрибрюшинном введении MIAP410.

[119] На Фиг. 42A и 42B показано образование тератомы (выживаемость HIP иПСК) у мышей NSG после подкожной трансплантации HIP иПСК человека и адоптивного переноса NK-клеток и введения изотипического контроля IgG1.

[120] На Фиг. 43A и 43B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека при подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивном переносе NK-клеток и местном введении низкой дозы (НД; 500 мкг) MIAP410 с Fc изотипа IgG1 одновременно с введением IL-2 в NK-клетки для активации в период с 0 дня по 10 день (Д0-Д10).

[121] На Фиг. 44A и 44B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека при подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивном переносе NK-клеток и местном введении низкой дозы (НД; 500 мкг) MIAP410 с Fc изотипа IgG1 одновременно с введением IL-2 в NK-клетки для активации в период с 3 по 36 день.

[122] На Фиг. 45A и 45B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека при подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивном переносе NK-клеток и местном введении низкой дозы (НД; 500 мкг) MIAP410 с Fc изотипа IgG1 одновременно с введением IL-2 в NK-клетки для активации в период с 11 по 36 день.

[123] На Фиг. 46A и 46B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека при подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивном переносе NK-клеток и местном введении низкой дозы (НД; 500 мкг) MIAP410 с Fc изотипа IgG1 в период от 0 дня по 10 день (Д0-Д10).

[124] На Фиг. 47A и 47B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека

при подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивном переносе NK-клеток и местном введении низкой дозы (НД; 500 мкг) MIAP410 с Fc изотипа IgG1 в период с 3 дня по 36 день.

[125] На Фиг. 48A и 48B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека при подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивном переносе NK-клеток и местном введении низкой дозы (НД; 500 мкг) MIAP410 с Fc изотипа IgG1 в период с 11 дня по 36 день.

[126] На Фиг. 49A и 49B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека при подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивном переносе NK-клеток и местном введении высокой дозы (ВД; 1 мг) MIAP410 с Fc изотипа IgG1 на Д0, Д1 и Д3.

[127] На Фиг. 50A и 50B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека при подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивном переносе NK-клеток и местном введении высокой дозы (ВД; 1 мг) MIAP410 с Fc изотипа IgG1 на Д11, Д12 и Д14.

[128] На Фиг. 51A и 51B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека при подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивном переносе NK-клеток и местном внутрибрюшинном введении высокой дозы (ВД; 1 мг) MIAP410 с Fc изотипа IgG1 на Д0, Д1 и Д3.

[129] На Фиг. 52A и 52B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека при подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивном переносе NK-клеток и местном внутрибрюшинном введении высокой дозы (ВД; 1 мг) MIAP410 с Fc изотипа IgG1 на Д11, Д12 и Д14.

[130] На Фиг. 53 показана жизнеспособность иПСК человека при подкожной инъекции клеток dKO человека (B2M-/CIITA-/-) мышам NSG и адоптивном переносе NK-клеток человека.

[131] На Фиг. 54 показана жизнеспособность иПСК человека после подкожной инъекции клеток dKO человека (B2M-/CIITA-/-) мышам NSG и адоптивного переноса NK-клеток человека или микроглии человека.

[132] На Фиг. 55A и 55B показана жизнеспособность иПСК человека при подкожной инъекции клеток dKO человека (B2M-/CIITA-/-) мышам NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека или без него.

[133] На Фиг. 56A и 56B показана жизнеспособность иПСК человека при инъекции клеток dKO человека (B2M-/CIITA-/-) в головной мозг мышей NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека или без него.

[134] На Фиг. 57A и 57B показана жизнеспособность иПСК человека при инъекции клеток dKO человека (B2M-/CIITA-/-) в головной мозг мышей NSG с адоптивным переносом микроглии человека.

[135] На Фиг. 58 показаны данные о жизнеспособности клеток человека дикого типа, dKO (B2M-/-CIITA-/-) или HIP 1.0 (B2M-/-CIITA-/-CD47 tg), совместно культивируемых с аллогенными макрофагами человека или микроглией.

[136] На Фиг. 59 показаны данные о жизнеспособности для клеток dKO человека

(B2M-/-CIITA-/-), совместно культивируемых с аллогенными макрофагами человека или микроглией, или для клеток dKO мыши (B2M-/-CIITA-/-), совместно культивируемых с аллогенными макрофагами мыши или микроглией.

[137] На Фиг. 60 показаны данные о жизнеспособности для клеток dKO человека (B2M-/-CIITA-/-), совместно культивируемых с ксеногенными (межвидовыми) мышиными макрофагами или микроглией, или клетками dKO мыши (B2M-/-CIITA-/-), совместно культивируемыми с ксеногенными человеческими макрофагами или микроглией.

[138] На Фиг. 61A и 61B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека при интракраниальной трансплантации HIP иПСК мышам NSG и адоптивном переносе NK-клеток и введении высокой дозы (ВД; 1 мг) контроля Fc изотипа IgG1 на Д0, Д1 и Д3.

[139] На Фиг. 62A и 62B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека при интракраниальной трансплантации HIP иПСК мышам NSG и адоптивном переносе NK-клеток и введении высокой дозы (ВД; 1 мг) MIAP410 на Д0, Д1 и Д3.

[140] На Фиг. 63A и 63B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека при интракраниальной трансплантации HIP иПСК мышам NSG и адоптивном переносе NK-клеток и введении высокой дозы (ВД; 1 мг) MIAP410 на Д0, Д1 и Д3, при этом гематоэнцефалический барьер был нарушен инъекциями маннитола.

[141] На Фиг. 64A и 64B показаны данные о жизнеспособности для HIP иПСК человека in vitro при введении 100 мкг/мл антитела к CD47 B6H12 с доменом Fc мышиного IgG1 в присутствии NK-клеток человека (A) или макрофагов человека (B).

[142] На Фиг. 65 показаны данные о жизнеспособности для HIP иПСК человека in vivo при подкожной трансплантации HIP иПСК человека с адоптивным переносом NK-клеток человека и введением B6H12.

[143] На Фиг. 66A и 66B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека после подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивного переноса NK-клеток и местного введения низкой дозы (НД; 500 мкг) контрольного Fc изотипа IgG4 в период Д0-Д40.

[144] На Фиг. 67A и 67B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека после подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивного переноса NK-клеток и местного введения низкой дозы (НД; 500 мкг) антитела к CD47 B6H12 с Fc изотипа IgG1 в течение периода Д0-Д96.

[145] На Фиг. 68A и 68B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека после подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивного переноса NK-клеток и местного введения низкой дозы (НД; 500 мкг) антитела к CD47 B6H12 с Fc изотипа IgG1 в течение периода Д3-Д40.

[146] На Фиг. 69A и 69B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека после подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивного переноса NK-клеток и местного введения низкой дозы (НД; 500 мкг) антитела к CD47 B6H12 с Fc изотипа IgG1 в течение периода Д11-Д44.

[147] На Фиг. 70A и 70B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека

при подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивном переносе NK-клеток и местном введении высокой дозы (ВД; 1 мг) антитело к CD47 B6H12 с Fc изотипа IgG1 на Д0, Д1 и Д3.

[148] На Фиг. 71A и 71B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека при подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивном переносе NK-клеток и местном введении высокой дозы (ВД; 1 мг) антитела к CD47 B6H12 с Fc изотипа IgG1 на Д3, Д4, и Д6.

[149] На Фиг. 72A и 72B показана жизнеспособность in vivo HIP иПСК человека при подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивном переносе NK-клеток и местном введении высокой дозы (ВД; 1 мг) антитело к CD47 B6H12 с Fc изотипа IgG1 на Д11, Д12 и Д14.

[150] На Фиг. 73A и 73B показана жизнеспособность клеток in vivo HIP иПСК человека при подкожной трансплантации HIP иПСК и адоптивном переносе NK-клеток и местном внутрибрюшинном введении высокой дозы (ВД; 1 мг) антитела к CD47 B6H12 с Fc изотипа IgG1 на Д0, Д1 и Д3.

[151] На Фиг. 74 показано исследование in vitro влияния синтетических препаратов флуцитозина и ганцикловира на цитозиндезаминазу и аварийный переключатель HsVtk, соответственно, в отношении защиты клеток с достаточными уровнями CD47 от уничтожения NK-клеток и макрофагов.

[152] На Фиг. 75 показаны данные по уничтожению пролекарственными средствами для исследования in vitro влияния синтетических препаратов флуцитозина и ганцикловира на цитозиндезаминазу и аварийный переключатель HsVtk, соответственно.

[153] На Фиг. 76A и 76B показаны иПСК HIP-CyD человека, образующие тератомы у мышей NSG.

[154] На Фиг. 77A и 77B показаны данные по жизнеспособности HIP иПСК человека (клон 2G11 CyD) при подкожной инъекции мышам NSG и лечении флуцитозином в НД (200 мг/кг), вводимым ежедневно внутрибрюшинно, с уничтожением иПСК HIP-CyD в течение 16-44 дней.

[155] На Фиг. 78A и 78B показаны данные по жизнеспособности HIP иПСК человека (клон 2G11 CyD) при подкожной инъекции мышам NSG и лечении флуцитозином в ВД (500 мг/кг), вводимым ежедневно внутрибрюшинно, с уничтожением иПСК HIP-CyD в течение 16-32 дней.

[156] На Фиг. 79A и 79B показаны данные по жизнеспособности HIP иПСК человека (клон 2G11 CyD) при подкожной инъекции мышам NSG и лечении флуцитозином в НД (200 мг/кг), вводимым ежедневно внутрибрюшинно, начиная с 13-го дня, с уничтожением иПСК HIP-CyD в течение 3-11 дней после начала введения.

[157] На Фиг. 80A и 80B показаны данные по жизнеспособности HIP иПСК человека (клон 2G11 CyD) при подкожной инъекции мышам NSG и лечении флуцитозином в ВД (500 мг/кг), вводимым ежедневно внутрибрюшинно, начиная с 13-го дня, с уничтожением иПСК HIP-CyD в течение 3-11 дней после начала введения.

[158] На Фиг. 81A-81F показаны данные по жизнеспособности HIP иПСК человека (клон 15; без аварийного переключателя) после подкожной инъекции мышам NSG и лечения флуцитозином в ВД (500 мг/кг), вводимой ежедневно внутрибрюшинно, причем выживаемость иПСК HIP-CyD снижается, несмотря на отсутствие аварийного переключателя (A и B), и дополнительное исследование, которое подтверждает полученные результаты (C-F).

[159] На Фиг. 82A и 82B показаны данные по жизнеспособности luc+ HIP иПСК человека (клон 2-G11 цитозиндезаминазы) после подкожной инъекции мышам NSG.

[160] На Фиг. 83A и 83B показаны данные по жизнеспособности HIP иПСК человека (клон 1-B10 HSVTk) после подкожной инъекции мышам NSG и введения солевого раствора.

[161] На Фиг. 84A и 84B показаны данные по жизнеспособности HIP иПСК человека (клон 1-B10 HSVTk) после подкожной инъекции мышам NSG и лечения ганцикловиром в НД (50 мг/кг), вводимой ежедневно внутрибрюшинно, с уничтожением иПСК HIP-HsVtk в течение 12-24 дней.

[162] На Фиг. 85A и 85B показаны данные по жизнеспособности HIP иПСК человека (клон 1-B10 HSVTk) после подкожной инъекции мышам NSG и лечения ганцикловиром ВД (75 мг/кг), вводимой ежедневно внутрибрюшинно, с уничтожением иПСК HIP-HsVtk в течение 12-16 дней.

[163] На Фиг. 86A и 86B показаны данные по жизнеспособности HIP иПСК человека (клон 1-B10 HSVTk) после подкожной инъекции мышам NSG и лечения ганцикловиром в НД (50 мг/кг), вводимым ежедневно внутрибрюшинно, начиная с 13-го дня, с уничтожением иПСК HIP-HsVtk через 7 дней после начала введения.

[164] На Фиг. 87A и 87B показаны данные по жизнеспособности клеток HIP иПСК человека (клон 1-B10 HSVTk) после подкожной инъекции мышам NSG и лечения ганцикловиром в ВД (75 мг/кг), вводимым ежедневно внутрибрюшинно, начиная с 13-го дня, с уничтожением иПСК HIP-HsVtk через 7 дней после начала введения.

[165] На Фиг. 88A и 88B показаны данные по жизнеспособности клеток HIP иПСК человека (клон 15; без аварийного переключателя) после подкожной инъекции мышам NSG и лечения ганцикловиром в ВД (75 мг/кг), вводимым ежедневно внутрибрюшинно, начиная с 0 дня, без уничтожения HIP иПСК.

[166] На Фиг. 89A и 89B показаны данные по жизнеспособности luc+ HIP иПСК человека (клон 1-B10 HSVtk) после подкожной инъекции мышам NSG.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[167] Регенеративная медицина (клеточная терапия) предполагает подготовку и доставку клеток пациенту. Клеточная терапия, т.е. трансплантация клеток субъекту для замены или восстановления поврежденных клеток, может оказать неоценимую помощь при лечении заболеваний, характеризующихся прогрессирующим разрушением или отсутствием клеток, тканей и/или органов. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия направлена на восстановление, замену, регенерацию и/или обеспечение

клеток, которые в противном случае повреждены, дисфункциональны или отсутствуют. Клетки для применения в клеточной терапии могут представлять собой, например, плюрипотентные стволовые клетки (ПСК), которые можно дифференцировать в клетки любого типа, клетки, дифференцированные из этих ПСК, или первичные клетки. Клетки для применения в клеточной терапии могут быть сконструированы таким образом, чтобы они содержали одну или более экзогенных нуклеиновых кислот, кодирующих толерогенный фактор, такой как CD47, трансмембранный белок и известный аутоантигенный маркер на клетках-хозяевах в организме, и, необязательно, один или более других белков. Когда CD47 связывается с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRPα), белком трансмембранного рецептора на циркулирующих иммунных клетках, для доставки ингибирующего сигнала «не ешь меня», клетка-хозяин, экспрессирующая CD47, избегает отторжения иммунной системой пациента, например, путем гибели, опосредованной макрофагами и/или натуральными клетками-киллерами (NK). Иммуносупрессивные характеристики таких сконструированных клеток могут сделать их опасными для пациента, которому трансплантируют клетки, например, если происходит неконтролируемый рост, что создает необходимость в разработке механизмов безопасности, которые могут модулировать, например, элиминировать с помощью врожденной иммунной системы пациента, трансплантированную популяцию клеток путем воздействия на ось CD47-SIRPα или их взаимодействие. В данном изобретении предложены способы и композиции для модулирования клетки или популяции клеток, ранее введенных или трансплантированных субъекту, причем клетка или популяция клеток содержат одну или более экзогенных нуклеиновых кислот, кодирующих CD47, и/или экспрессируют или сверхэкспрессируют экзогенный полипептид CD47, путем введения субъекту агента, блокирующего CD47-SIRPα. Блокирующий CD47-SIRPα агент может включать малую молекулу, макромолекулу, полипептид, слитый белок, диатело, антитело или их комбинацию, которые связываются с CD47 или SIRPα, таким образом воздействуя, интерферируя, блокируя и/или ингибируя ось CD47-SIRPα или их взаимодействие. Это взаимодействие инициирует механизмы уничтожения ранее введенных клеток с помощью врожденной иммунной системы, включая уничтожение клеток, опосредованное иммунными клетками, такое как уничтожение клеток, опосредованное NK, опосредованное макрофагами, АЗКЦ и/или КЗЦ. Таким образом, введение блокирующего CD47-SIRPα агента приводит к снижению, а в некоторых вариантах осуществления к полной элиминации ранее введенных клеток у субъекта.

I. Определения

[168] Термин «антитело» используется для обозначения, помимо природных антител, генетически сконструированных или иным образом модифицированных форм иммуноглобулинов или их частей, включая химерные антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела или синтетические антитела. Антитела могут быть моноклональными или поликлональными антителами. В тех вариантах осуществления, в которых антитело представляет собой иммуногенно активную часть молекулы

иммуноглобулина, антитело может включать, помимо прочего, антитело с одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv), дисульфид-связанный Fv, однодоменное антитело (sdAb), антитело VHH, антигенсвязывающий фрагмент (Fab), Fab', фрагмент F(ab')2 или диатело. Антитело scFv получают из антитела путем связывания вариабельных областей тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей иммуноглобулина коротким линкерным пептидом. scFv может содержать Vh-Vl или Vl-Vh. Аналогичным образом, антитело дисульфидсвязанный Fv может быть получено путем связывания VH и VL с использованием междоменной дисульфидной связи. С другой стороны, sdAb состоят только из вариабельной области тяжелой или легкой цепи и обычно представляют собой наименьшие антигенсвязывающие фрагменты антител. Антитело VHH представляет собой антигенсвязывающий фрагмент только тяжелой цепи. Диатело представляет собой димер фрагмента scFv, состоящий из областей VH и VL, нековалентно соединенных небольшим пептидным линкером или ковалентно связанных друг с другом. Описанные в данном документе антитела, в том числе те, которые содержат иммуногенно активную часть молекулы иммуноглобулина, сохраняют способность связывать специфический антиген.

[169] В контексте данного документа термин «защитный переключатель» относится к системе контроля экспрессии представляющего интерес гена или белка, которая при подавлении или повышении экспрессии приводит к клиренсу или гибели клетки, например, посредством распознавания иммунной системой хозяина. Защитный переключатель может быть разработан так, чтобы представлять собой или включать экзогенную молекулу, вводимую для предотвращения или смягчения нежелательного клинического явления. Защитный переключатель можно сконструировать, регулируя экспрессию на уровне ДНК, РНК и белка. Защитный переключатель может включать белок или молекулу, которая позволяет контролировать клеточную активность в ответ на нежелательное явление. В некоторых вариантах осуществления защитный переключатель относится к агенту (например, белку, молекуле и т. д.), который связывает конкретную клетку и направляет ее на гибель или уничтожение. В некоторых случаях защитный переключатель представляет собой блокирующий агент, который связывает целевой белок на поверхности целевой клетки, что, в свою очередь, инициирует иммунный ответ. В одном варианте осуществления защитный переключатель представляет собой «аварийный переключатель», который экспрессируется в неактивном состоянии и является фатальным для клетки, экспрессирующей защитный переключатель, при активации переключателя селективным агентом извне. В одном варианте осуществления ген защитного переключателя является цис-действующим по отношению к представляющему интерес гену в конструкции. Активация защитного переключателя приводит к тому, что клетка убивает только себя или себя и соседние клетки посредством апоптоза или некроза.

[170] Используемый в данном документе для характеристики клетки термин «гипоиммуногенная» в общем случае означает, что такая клетка менее подвержена иммунному отторжению субъектом, которому такие клетки привиты или трансплантированы. Например, по отношению к неизмененной или немодифицированной

клетке дикого типа такая гипоиммуногенная клетка может на около 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или более или менее подвержена иммунному отторжению субъектом, которому трансплантируют такие клетки. В некоторых аспектах технологии редактирования генома используются для модулирования экспрессии генов MHC I и/или MHC II и, необязательно, для экспрессии толерогенного фактора, такого как, но не ограничиваясь этим, CD47, и, таким образом, для создания гипоиммуногенной клетки. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка избегает иммунного отторжения у несовместимого по MHC аллогенного реципиента. В некоторых случаях дифференцированные клетки, полученные из описанных в данном документе гипоиммуногенных стволовых клеток, избегают иммунного отторжения при введении (например, при трансплантации или пересадке) несовместимому по MHC аллогенному реципиенту. В некоторых случаях гипоиммуногенные или дифференцированные клетки, полученные из описанных в данном документе гипоиммуногенных стволовых клеток, избегают иммунного отторжения при введении (например, при трансплантации или пересадке) несовместимому по MHC аллогенному реципиенту с более низким уровнем иммуносупрессии, чем это было бы необходимо для негипоиммуногенной клетки. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка защищена от отторжения адаптивной иммунной системой и/или отторжения клетками врожденной иммунной системы.

[171] Гипоиммуногенность клетки можно определить путем оценки иммуногенности клетки, например, способности клетки вызывать адаптивный и врожденный иммунные ответы. Такой иммунный ответ можно измерить с помощью анализов, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления в анализе иммунного ответа измеряется влияние гипоиммуногенной клетки на пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток, уничтожение Т-клеток, пролиферацию NK-клеток, активацию NK-клеток и активность макрофагов. В некоторых случаях гипоиммуногенные клетки и их производные 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.

[172] В контексте данного документа «иммуносупрессивный фактор» или «иммунорегуляторный фактор» включают факторы гипоиммунитета и ингибиторы комплемента.

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

иммунные сигнальные пути.

[174] В контексте данного документа локус «безопасная гавань» относится к локусу гена, который обеспечивает безопасную экспрессию трансгена или экзогенного гена. Безопасные гавани или геномные безопасные гавани представляют собой участки в геноме, способные обеспечить интеграцию нового генетического материала таким образом, который позволяет вновь вставленным генетическим элементам: (i) функционировать прогнозируемо и (ii) не вызывать изменений генома хозяина, представляющих собой риск для клетки-хозяина или организма. Примеры локусов «безопасная гавань» включают ген CCR5, ген CXCR4, ген PPP1R12C (также известный как AAVS1), ген альбумина и ген Rosa.

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

[176] В целях настоящего изобретения термин «ген» включает область ДНК, кодирующую генный продукт, а также все области ДНК, которые регулируют выработку генного продукта, независимо от того, являются ли такие регуляторные последовательности смежными с кодирующими и/или транскрибируемыми последовательностями. Соответственно, ген включает, но не обязательно ограничивается этим, промоторные последовательности, терминаторы, последовательности регуляции трансляции, такие как сайты связывания рибосом и внутренние сайты посадки рибосом, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы, граничные элементы, точки начала репликации, сайты прикрепления к матриксу и контрольные области локуса.

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

[178] «Модуляция генной экспрессии » относится к изменению уровня экспрессии

гена. Модуляция экспрессии может включать, но не ограничивается этим, активацию гена и репрессию гена. Модуляция также может быть полной, т.е. при которой экспрессия гена полностью инактивирована или активирована до уровней дикого типа или выше; или она может быть частичной, при которой экспрессия гена частично снижена или частично активирована до некоторой доли уровней дикого типа.

[179] В контексте данного документа термин «сниженная экспрессия» или «снижение экспрессии» относится к клетке, демонстрирующей более низкий уровень экспрессии гена или белка (например, уровень, который на по меньшей мере около 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% ниже) по сравнению с немодифицированной соответствующей клеткой или клеткой дикого типа (например, нормальной, здоровой или исходной клеткой).

[180] В контексте данного документа термин «повышенная экспрессия» или «увеличение экспрессии» относится к клетке, демонстрирующей более высокий уровень экспрессии гена или белка (например, уровень, который на по меньшей мере около 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% выше) по сравнению с немодифицированной соответствующей клеткой или клеткой дикого типа (например, нормальной, здоровой или исходной клеткой).

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

[182] «Вектор» или «конструкция» способны переносить последовательности генов в целевые клетки. Как правило, «векторная конструкция», «вектор экспрессии» и «вектор для переноса гена» означают любую конструкцию нуклеиновой кислоты, способную направлять экспрессию представляющего интерес гена и которая может переносить последовательности генов в целевые клетки. Таким образом, этот термин включает клонирующие и экспрессионные носители, а также интегрирующиеся векторы. Способы введения векторов или конструкций в клетки известны специалистам в данной области и

включают, помимо прочего, липид-опосредованный перенос (то есть липосомы, включая нейтральные и катионные липиды), электропорацию, прямую инъекцию, слияние клеток, бомбардировку частицами, соосаждение фосфатом кальция, перенос, опосредованный DEAE-декстраном, и перенос, опосредованный вирусным вектором.

[183] В контексте данного документа «плюрипотентные стволовые клетки», или «первичные 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 «иПСК», тип плюрипотентных стволовых клеток, полученных из неплюрипотентных клеток. Примеры исходных клеток включают соматические клетки, которые были перепрограммированы для индукции плюрипотентного недифференцированного фенотипа различными способами. Такие «иПС» или «иПСК» клетки могут быть созданы путем индукции экспрессии определенных регуляторных генов или путем экзогенного применения определенных белков. Способы индукции иПС клетки известны в данной области техники и дополнительно описаны ниже. (См., например, Zhou et al., Stem Cells 27 (11): 2667-74 (2009); Huangfu et al, Nature Biotechnol. 26 (7): 795 (2008); Woltjen et al., Nature 458 (7239): 766-770 (2009); и Zhou et al., Cell Stem Cell 8:381-384 (2009); каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Генерация индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) описана ниже. Используемый в данном документе термин «чиПСК» представляет собой человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

[184] Под «HLA» или «человеческим лейкоцитарным антигеном» понимается генный комплекс, кодирующий белки главного комплекса гистосовместимости (MHC) у человека. Эти белки клеточной поверхности, составляющие комплекс HLA, отвечают за регуляцию иммунного ответа на антигены. У людей есть два MHC, 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 либо «MHC», либо «HLA» не предназначено для ограничения, поскольку это зависит от того, получены ли гены от человека (HLA) или от мыши (MHC). Таким образом, в отношении клеток млекопитающих эти термины можно взаимозаменяемо использовать в данном документе.

[185] Термины «лечить», «процесс лечения», «лечение» и т.д., применяемые к

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

[186] В контексте данного документа термины «процесс лечения» и «лечение» относятся к введению субъекту эффективного количества клеток с целевыми полинуклеотидными последовательностями, измененными ex vivo в соответствии с описанными в данном документе способами, так что у субъекта наблюдается уменьшение проявления по меньшей мере одного симптома заболевания или регресс заболевания, например, благоприятные или желаемые клинические результаты. В целях настоящей 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 увеличению выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если не получать лечение. Таким образом, специалист в данной области техники понимает, что лечение может улучшить болезненное состояние, но может не обеспечивать полное излечение заболевания. Используемый в данном документе термин «лечение» включает профилактику. В качестве альтернативы лечение является «эффективным», если прогрессирование заболевания снижено или остановлено. «Лечение» также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, у кого уже диагностировано нарушение, связанное с экспрессией полинуклеотидной последовательности, а также тех, у кого может развиться такое нарушение из-за генетической предрасположенности или других факторов.

[187] Под «лечением» или «предотвращением» заболевания или нарушения понимают задержку или предотвращение дебюта такого заболевания или нарушения, обращение вспять, облегчение, ослабление, ингибирование, замедление или остановку прогрессирования, обострения или ухудшения течения или тяжести состояния, связанного с таким заболеванием или нарушением. В одном варианте осуществления симптомы заболевания или нарушения облегчаются на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или на по меньшей мере 50%.

[188] В контексте данного документа термины «введение», «внесение» и «трансплантация» используются взаимозаменяемо в контексте помещения клеток,

например клеток, описанных в данном документе, содержащих целевую полинуклеотидную последовательность, измененную в соответствии со способами настоящего изобретения, субъекту, способом или путем, который приводит к по меньшей мере частичной локализации введенных клеток в желаемом месте. 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 случаях клетки также можно вводить в место, отличное от желаемого, например, в печень или подкожно, например, в капсуле, чтобы сохранить имплантированные клетки в месте имплантации и избежать миграции имплантированных клеток.

[189] В дополнительных или альтернативных аспектах настоящая технология предусматривает изменение целевых полинуклеотидных последовательностей любым способом, известным специалисту в данной области техники, например, с использованием системы TALEN. Следует понимать, что хотя примеры способов, в которых используются CRISPR/Cas (например, Cas9 и Cpf1) и TALEN, подробно описаны в данном документе, технология не ограничивается 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.

[190] Способы по настоящему изобретению можно использовать для изменения целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. В настоящем изобретении предложено изменение целевых полинуклеотидных последовательностей в клетке в любых целях. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность в клетке изменена с получением мутантной клетки. В контексте данного документа термин «мутантная клетка» относится к клетке с полученным генотипом, который отличается от исходного генотипа. В некоторых случаях «мутантная клетка» проявляет мутантный фенотип, например, когда нормально функционирующий ген изменен с использованием систем CRISPR/Cas по настоящему изобретению. В других случаях «мутантная клетка» демонстрирует фенотип дикого типа, например, когда для коррекции мутантного генотипа используется система CRISPR/Cas. 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).

[191] В некоторых вариантах осуществления изменение представляет собой индел. Как применяется в данном документе, «индел» относится к мутации, возникшей в результате вставки, делеции или их комбинации. Как известно специалистам в данной области техники, индел в кодирующей области геномной последовательности приводит к мутации со сдвигом рамки считывания, если длина индела не кратна трем. В некоторых вариантах осуществления изменение представляет собой точечную мутацию. Как применяется в данном документе, «точечная мутация» относится к замене, которая заменяет один из нуклеотидов. Систему CRISPR/Cas можно использовать для индукции индела любой длины или точечной мутации в целевой полинуклеотидной последовательности.

[192] 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.

[193] 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 нарушения, 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).

[194] Под «нокином» в данном документе подразумевается процесс, который добавляет генетическую функцию в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления это приводит к повышению или понижению 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 изменения промотора, добавления другого промотора, добавления энхансера или изменения других экспрессионных последовательностей генов.

[195] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изменение приводит к понижению экспрессии полинуклеотидной последовательности-мишени.

Термины «снижение», «пониженный», «понижение» и «снижение» используются в данном документе, как правило, для обозначения снижения на статистически значимую величину. Однако, во избежание сомнений, «снижение», «пониженный», «понижение», «снижение» означает уменьшение, по меньшей мере, на 10% по сравнению с эталонным уровнем, например, снижение на по меньшей мере около 20%, или по меньшей мере около 30%, или по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или до и включая снижение на 100% (т.е. уровень отсутствия по сравнению с эталонным образцом) или любое снижение на 10-100% по сравнению с эталонным уровнем.

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

[197] 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 вектор экспрессии. Следовательно, этот термин в отношении экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты относится к внесению кодирующей нуклеиновой кислоты в экспрессируемой форме в клетку. «Экзогенная» молекула представляет собой молекулу, конструкцию, фактор и т.п., которые, как правило, не присутствуют в клетке, но могут быть введены в клетку одним или более генетическими, биохимическими или другими способами. «Нормальное присутствие в клетке» определяется с учетом конкретного этапа развития и условий окружающей среды клетки. Таким образом, например, молекула, присутствующая только во время эмбрионального развития нейронов, является экзогенной молекулой по отношению к взрослой нейронной клетке. Экзогенная молекула может включать, например, функционирующую версию эндогенной молекулы с нарушением функции или версию с нарушением функции нормально функционирующей эндогенной молекулы.

[198] Экзогенная молекула или фактор могут представлять собой, помимо прочего, малую молекулу, такую как получаемая в результате комбинаторного химического процесса, или макромолекулу, такую как белок, нуклеиновая кислота, углевод, липид, гликопротеин, липопротеин, полисахарид, любое модифицированное производное вышеуказанных молекул или любой комплекс, содержащий одну или более вышеуказанных молекул. Нуклеиновые кислоты включают ДНК и РНК, могут быть одноцепочечными или двухцепочечными; могут быть линейными, разветвленными или кольцевыми; и могут иметь любую длину. Нуклеиновые кислоты включают те, которые способны образовывать двойные спирали, а также нуклеиновые кислоты, образующие тройные спирали. Смотрите, например, патенты США №№ 5176996 и 5422251. Белки включают, но не ограничиваются этим, ДНК-связывающие белки, транскрипционные факторы, факторы ремоделирования хроматина, метилированные ДНК-связывающие белки, полимеразы, метилазы, деметилазы, ацетилазы, деацетилазы, киназы, фосфатазы, интегразы, рекомбиназы, лигазы, топоизомеразы, гиразы и геликазы.

[199] 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.

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

[201] Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии согласно Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), алгоритма гомологичного выравнивания

согласно Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), поиск по методу сходства согласно Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 85:2444 (1988), путем компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA, и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин, США), или путем визуального осмотра (см. в целом Ausubel et al, ниже).

[202] 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 осуществления анализов BLAST является общедоступным через Национальный центр биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information).

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

[204] 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 применения такой исключительной терминологии, как «единственно», «только» и т. п. в связи с указанием элементов формулы изобретения, или применения «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 настоящего изобретения. 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 настоящей технологии, далее описаны репрезентативные иллюстративные способы и материалы.

[205] В контексте данного документа будут использоваться следующие термины, которые определены, как указано ниже.

[206] Перед дальнейшим описанием настоящей технологии следует понимать, что она не ограничена конкретными описанными вариантами осуществления, поскольку они, конечно, могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена для описания только конкретных вариантов осуществления и не подразумевает ограничения, поскольку объем представленной технологии ограничивается только прилагаемой формулой изобретения.

[207] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится данная технология. Когда приводится диапазон значений, следует понимать, что данная технология охватывает каждое промежуточное значение с точностью до десятого знака нижнего предела, если в контексте явно не указано иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона, а также любое другое указанное или промежуточное значение в таком указанном диапазоне. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также включены в данную технологию с учетом любого специальным образом исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, 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.

[208] 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. Ссылка на любую публикацию предназначена для ее раскрытия до даты подачи заявки и не должна рассматриваться как признание того, что технология, описанная в данном документе, не предоставляет права датировать такое описание более ранним числом в

силу более ранней в силу изобретения. Более того, даты приведенных публикаций могут отличаться от фактических дат публикаций, что может потребовать независимого подтверждения.

II. CD47, сигнальный регуляторный белок альфа (SIRPα) и иммунная система

[209] В данном документе предусмотрены способы и композиции для модулирования популяции клеток, экспрессирующих CD47 и ранее введенных или трансплантированных субъекту, включающие введение субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента.

А. Взаимодействие/ось CD47-SIRPα

[210] Кластер дифференцировки 47 (CD47) представляет собой сильно гликозилированный, повсеместно экспрессируемый белок клеточной поверхности в суперсемействе иммуноглобулинов. CD47 играет роль в важных клеточных функциях, таких как пролиферация, адгезия, миграция, апоптоз и фагоцитоз. Молекулярная структура CD47 включает внеклеточный вариабельный домен иммуноглобулина (IgV), трансмембранный домен и короткий, альтернативно сплайсированный цитоплазматический хвост. В некоторых вариантах осуществления CD47 взаимодействует in trans с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRPα) и играет роль в рекрутировании гранулоцитов и Т-клеток в очаги инфекции. SIRPα кодирует рецептор суперсемейства Ig, экспрессируемый на поверхности макрофагов и дендритных клеток, чья цитоплазматическая область содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM), которые могут инициировать каскад для ингибирования фагоцитоза.

[211] CD47 функционирует как аутоантигенный маркер на клетках-хозяевах внутри организма. В некоторых вариантах осуществления при экспрессии CD47 связывается с SIRPα на поверхности циркулирующих иммунных клеток для доставки ингибирующего сигнала «не ешь меня». Связывание CD47-SIRPα приводит к фосфорилированию ITIM на SIRPα, что инициирует ряд событий, которые в конечном итоге могут предотвратить фагоцитоз. Фагоцитоз целевых клеток макрофагами регулируется балансом активирующих и ингибирующих сигналов (SIRPα-CD47). Этот баланс нарушается раковыми клетками, которые используют «собственный» сигнал и активируют экспрессию CD47, чтобы избежать иммунного надзора и последующего разрушения. В некоторых вариантах осуществления CD47-связывающий агент и/или SIRPα-связывающий агент, т. е. блокирующий CD47-SIRPα агент блокирует и/или препятствует ингибирующему сигналу SIRPα-CD47, тем самым инициируя фагоцитоз и/или другие механизмы иммунной системы.

В. Опосредованное иммунной системой уничтожение целевых клеток

[212] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы инициации связанных с врожденной иммунной системой механизмов уничтожения клетки или популяции клеток, ранее введенных или трансплантированных субъекту, причем клетки экспрессируют или сверхэкспрессируют CD47, путем введения субъекту одного или более блокирующих CD47-SIRPα агентов. В некоторых из этих

вариантов осуществления клетки, экспрессирующие или сверхэкспрессирующие CD47, содержат одну или более экзогенных нуклеиновых кислот, кодирующих CD47. Инициируемые связанные с врожденной иммунной системой механизмы уничтожения могут быть одним или более механизмами уничтожения, опосредованными иммунными клетками, включая NK-опосредованное уничтожение, опосредованное макрофагами уничтожение, АЗКЦ и/или КЗЦ.

[213] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы инициации опосредованного NK-клетками уничтожения клетки или популяции клеток, ранее введенных или трансплантированных субъекту и экспрессирующих или сверхэкспрессирующих CD47, включая клетки, сконструированные для экспрессии или сверхэкспрессии CD47.

[214] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы инициации опосредованного макрофагами уничтожения клетки или популяции клеток, ранее введенных или трансплантированных субъекту и экспрессирующих или сверхэкспрессирующих CD47, включая клетки, сконструированные для экспрессии или сверхэкспрессии CD47. Макрофаги являются важными компонентами врожденного иммунитета, которые могут ингибировать рост опухоли посредством фагоцитоза. SIRPα экспрессируется на поверхности миелоидных клеток, включая макрофаги, гранулоциты, моноциты и дендритные клетки. Когда макрофаги связываются с CD47 на целевых клетках, таких как раковые клетки или другие экзогенные клетки, через SIRPα, ингибируется опосредованное макрофагами уничтожение целевых клеток. В некоторых вариантах осуществления SIRPα- и/или CD47-связывающий агент, то есть блокирующий CD47-SIRPα агент, блокирует и/или препятствует ингибированию опосредованного макрофагами фагоцитоза, инициируя опосредованное макрофагами уничтожение целевых клеток, экспрессирующих CD47.

[215] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы инициации опосредованного антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ) уничтожения клетки или популяции клеток, ранее введенных или трансплантированных субъекту и экспрессирующих или сверхэкспрессирующих CD47, включая клетки, сконструированные для экспрессии или сверхэкспрессии CD47. Некоторые иммунные клетки опосредуют индукцию гибели опсонизированных антителами раковых клеток, процесс, известную как АЗКЦ. Некоторые иммунные клетки наделены ингибирующими рецепторами, такими как SIRPα, которые связываются с CD47 на целевых клетках, таких как раковые клетки или другие экзогенные клетки, что приводит к ингибированию АЗКЦ, опосредованной иммунными клетками. В некоторых вариантах осуществления SIRPα- и/или CD47-связывающий агент, то есть блокирующий CD47-SIRPα агент, блокирует и/или препятствует ингибированию АЗКЦ, опосредованной иммунными клетками, инициируя опосредованное АЗКЦ уничтожение целевых клеток, экспрессирующих CD47. АЗКЦ может быть опосредован через активацию различных рецепторов Fc и различными клетками, экспрессирующими Fc-рецептор, такими как

натуральные клетки-киллеры (NK), макрофаги и нейтрофилы. В некоторых вариантах осуществления АЗКЦ эффективно инициируется блокирующими CD47-SIRPα агентами, содержащими IgG1 и/или IgG4.

[216] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы инициации опосредованного комплемент-зависимой цитотоксичностью (КЗЦ) уничтожения клетки или популяции клеток, ранее введенных или трансплантированных субъекту, и экспрессирующих или сверхэкспрессирующих CD47, включая клетки, сконструированные для экспрессии или сверхэкспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления система комплемента активируется посредством связывания антитела, содержащего домен Fc, в комплексе с антигеном, таким как CD47, на целевой клетке. C1q связывается с доменом Fc антитела в комплексе антитело-антиген, инициируя связывание других белков комплемента, что в конечном итоге приводит к образованию одного или более цитолитического мембраноатакующего комплекса (MAC), которые образуют поры в мембране целевой клетки, что приводит к лизису/гибели клеток. В некоторых вариантах осуществления КЗЦ эффективно инициируется блокирующим CD47-SIRPα агентом, содержащим IgG1.

[217] В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в данном документе, клетка или популяция клеток, содержащие одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих CD47 и/или экспрессирующих или сверхэкспрессирующих CD47, содержат нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1 (кодирующая последовательность (CDS) нуклеотидной последовательности, указанной в NCBI, идент. № NM_001777.4) или SEQ ID NO:3 (CDS нуклеотидной последовательности, указанной в NCBI, идент. № NM_198793.2), или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3. В некоторых из этих вариантов осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CD47, является экзогенной. В некоторых вариантах осуществления CD47, экспрессируемый или сверхэкспрессируемый клеткой, содержит, состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая CD47, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетке млекопитающего, например, в клетке человека. В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая CD47, имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%,

по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:5.

Таблица 1. Иллюстративные последовательности CD47

SEQ ID NO:	**Последовательность**	**Описание**
1	atgtggcccctggtagcggcgctgttgctgggctcggcgtgctgcgga tcagctcagctactatttaataaaacaaaatctgtagaattcacgttttgta atgacactgtcgtcattccatgctttgttactaatatggaggcacaaaaca ctactgaagtatacgtaaagtggaaatttaaaggaagagatatttacacc tttgatggagctctaaacaagtccactgtccccactgactttagtagtgc aaaaattgaagtctcacaattactaaaaggagatgcctctttgaagatgg ataagagtgatgctgtctcacacacaggaaactacacttgtgaagtaac agaattaaccagagaaggtgaaacgatcatcgagctaaaatatcgtgtt gtttcatggttttctccaaatgaaaatattcttattgttattttcccaatttttgc tatactcctgttctggggacagtttggtattaaaacacttaaatatagatcc ggtggtatggatgagaaaacaattgctttacttgttgctggactagtgatc actgtcattgtcattgttggagccattcttttcgtcccaggtgaatattcatt aaagaatgctactggccttggtttaattgtgacttctacagggatattaat attacttcactactatgtgtttagtacagcgattggattaacctccttcgtca ttgccatattggttattcaggtgatagcctatatcctcgctgtggttggact gagtctctgtattgcggcgtgtataccaatgcatggccctcttctgatttc aggtttgagtatcttagctctagcacaattacttggactagtttatatgaaa tttgtggcttccaatcagaagactatacaacctcctaggaaagctgtaga ggaacccccttaatgcattcaaagaatcaaaaggaatgatgaatgatgaa taa	Нуклеотидная последовательность CDS NM_001777.4 (нуклеотиды 124-1095)
2	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFT FCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFK GRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLK GDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREG ETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFW GQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVI VIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILIL LHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVG LSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVY MKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGM MNDE	Аминокислотная последовательность, кодируемая CDS NM_001777.4
3	atgtggcccctggtagcggcgctgttgctgggctcggcgtgctgcgga tcagctcagctactatttaataaaacaaaatctgtagaattcacgttttgta atgacactgtcgtcattccatgctttgttactaatatggaggcacaaaaca ctactgaagtatacgtaaagtggaaatttaaaggaagagatatttacacc tttgatggagctctaaacaagtccactgtccccactgactttagtagtgc aaaaattgaagtctcacaattactaaaaggagatgcctctttgaagatgg ataagagtgatgctgtctcacacacaggaaactacacttgtgaagtaac agaattaaccagagaaggtgaaacgatcatcgagctaaaatatcgtgtt gtttcatggttttctccaaatgaaaatattcttattgttattttcccaatttttgc tatactcctgttctggggacagtttggtattaaaacacttaaatatagatcc ggtggtatggatgagaaaacaattgctttacttgttgctggactagtgatc actgtcattgtcattgttggagccattcttttcgtcccaggtgaatattcatt aaagaatgctactggccttggtttaattgtgacttctacagggatattaat attacttcactactatgtgtttagtacagcgattggattaacctccttcgtca	Нуклеотидная последовательность CDS NM_198793.2 (нуклеотиды 181-1098)

	ttgccatattggttattcaggtgatagcctatatcctcgctgtggttggact gagtctctgtattgcggcgtgtataccaatgcatggccctcttctgatttc aggtttgagtatcttagctctagcacaattacttggactagtttatatgaaa tttgtggcttccaatcagaagactatacaacctcctaggaataactga	
4	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFT FCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFK GRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLK GDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREG ETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFW GQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVI VIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILIL LHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVG LSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVY MKFVASNQKTIQPPRNN	Аминокислотная последовательность, кодируемая CDS NM_198793.2
5	atgtggcccctggtcgccgccctgttgctgggctcggcatgctgcgga tcagctcagctactgtttaataaaacaaaatctgtagaattcacgttttgta acgacactgtcgtgatcccatgctttgttactaatatggaggcacaaaac accactgaagtgtacgtgaagtggaaattcaaaggcagagacatttac acctttgacggcgccctcaacaagtccaccgtgcccactgactttagta gcgcaaaaattgaggtcagccaattactaaaaggagatgcctctttgaa gatggacaagagcgatgctgtcagccacacagggaactacacttgtg aagtaacagagttaacccgcgaaggtgaaacgatcatcgagctgaag tatcgagtggtgtcctggttttctccgaacgagaatatccttatcgtaatttt cccaattttcgctatcctcctgttctggggccagtttggtatcaagacact caaatatcggtccggtgggatggatgagaagacaattgccctgcttgtt gctggactcgtgatcaccgtcatcgtgattgttggggccatccttttcgtc ccaggggagtacagcctgaagaatgctacgggcctgggattaattgtg acctctacagggatactcatcctgcttcactactatgtgttcagtaccgcg attggactgacctccttcgtcattgccatattggtgattcaggtgatagcc tacatcctcgccgtggttggcctgagtctctgtatcgcggcgtgcatacc catgcatggcccctcttctgatttcagggttgagtatcctcgcactagcac agttgctgggactggtttatatgaaatttgtggcctccaaccagaagact atacagcctcctaggaaggctgtagaggagcccctgaatgcattcaag gaatcaaaaggcatgatgaatgatgaa	Кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая CD47

С. Ускользание от иммунной системы с помощью экспрессии CD47 на сконструированных клетках

[218] В данном документе представлены сконструированные клетки, которые экзогенно экспрессируют CD47, и способы их применения. В некоторых вариантах осуществления такие экспрессирующие CD47 клетки вводят пациенту, а в некоторых случаях вводят до введения блокирующего CD47-SIRPα агента. Понятно, что любой из агентов, описанных выше, которые могут ингибировать или блокировать взаимодействие с CD47 и SIRPα, можно использовать в любой комбинации, чтобы служить защитным переключателем для любых сконструированных клеток, которые ускользают от распознавания иммунной системой, описанных в данном документе.

[219] В некоторых вариантах осуществления субъекту-реципиенту вводят клетки, экзогенно экспрессирующие CD47, которые могут ускользать от распознавания или ответа иммунной системы (например, проявляют сниженную иммуногенность или

являются гипоиммуногенными). Ускользание от иммунного распознавания может быть достигнуто за счет сверхэкспрессии одного или более иммуносупрессивных факторов или молекул, включая толерогенные факторы и ингибиторы комплемента. В некоторых вариантах осуществления клетки также демонстрируют пониженную экспрессию MHC I или MHC II или обоих (например, HLA I и/или HLA II). Во многих вариантах осуществления клетки дополнительно демонстрируют пониженную экспрессию или отсутствие экспрессии Т-клеточных рецепторов (TCR) (например, TCRα и/или TCRβ). Подробные описания таких клеток и способов их получения описаны в данном документе.

[220] В одном варианте осуществления экспрессия иммуносупрессивного фактора основана на модулировании экспрессии иммунорегуляторного фактора CD47. CD47 является компонентом врожденной иммунной системы, который, в некоторых аспектах, действует как сигнал «не ешь меня» как часть врожденной иммунной системы для блокирования фагоцитоза макрофагами. Полезные иммуносупрессивные факторы, которые могут быть сконструированы для экспрессии представляющими интерес клетками, включают, но не ограничиваются ими, CD47, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4, C1-ингибитор, IL-10, IL-35, FASL, серпин b9, CCL21, Mfge8, TGF-β, Cd73, Cd39, LAG3, IL1r2, Ackr2, Tnfrsf22, Tnfrsf23, Tnfrsf10, Dad1 или IFNγRI d39, включая описанные в WO2018227286, поданной 12 июня 2018 г., содержание которой, включая представленные в нем последовательности, таблицу 1 и перечень последовательностей, полностью включены в данный документ посредством ссылки.

[221] В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки, представленные в данном документе, содержат экзогенно экспрессируемый CD47 и один или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, которая включает DUX4, PD-L1, CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, HLA-G (H2-M3), FASL (FASLG), CCL21 (Ccl21 b), Mfge8, Serpin B9 (Spi6) и любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат экзогенно экспрессируемые CD47 и DUX4. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат экзогенно экспрессируемые CD47 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат экзогенно экспрессируемые CD47 и CD24. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат экзогенно экспрессируемые CD47 и CD46. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат экзогенно экспрессируемые CD47 и CD55. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат экзогенно экспрессируемые CD47 и CD59. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат экзогенно экспрессируемые CD47 и CD200. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат экзогенно экспрессируемые CD47 и HLA-G. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат экзогенно экспрессируемые CD47 и FASL. В

некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат экзогенно экспрессируемые CD47 и CCL21. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат экзогенно экспрессируемые CD47 и Mfge8. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат экзогенно экспрессируемые CD47 и серпин B9, (Serpinb9). В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат экзогенно экспрессируемые CD47, PD-L1, HLAG, CD200, FASL, CCL21, Mfge8 и серпин B9.

[222] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения клеток или их популяции, модифицированных для экспрессии одного или более иммуносупрессивных факторов, выбранных из группы, включающей CD47, PD-L1, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, IDO1, CTLA4, C1-ингибитор, IDO1, IL-10, IL-35, FASL, CCL21, Mfge8, и серпин б9. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к клеткам или их популяции, которые были модифицированы для экспрессии одного или более иммуносупрессивных факторов, выбранных из группы, включающей CD47, PD-L1, CD24, CD27, CD35, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, IDO1, CTLA4, C1-ингибитор, IDO1, IL-10, IL-35, FASL, CCL21, Mfge8 и Serpin B9. В других вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор выбран из группы, включающей B2M, CIITA, NLRC5, TAP1, HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFX-ANK, NFY-A, RFX5, RFX-AP, HLA-G, HLA-E, NFY-B, PD-L1, NFY-C, IRF1, GITR, 4-1BB, CD28, B7-1, CD47, B7-2, OX40, CD27, HVEM, SLAM, CD226, ICOS, LAG3, TIGIT, TIM3, CD160, BTLA, CD244, LFA-1, ST2, HLA-F, CD30, B7-H3, VISTA, TLT, PD-L2, CD58, CD2, и HELIOS.

[223] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор интегрирован в эндогенный локус для защиты экспрессии фактора или векторной кассеты, содержащей этот фактор. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный фактор вставляют в сайт, выбранный из локуса B2M, локуса CIITA, локуса TRAC, локуса TRBC и локуса «безопасная гавань». Неограничивающие примеры локусов «безопасная гавань» включают, но не ограничиваются ими, локус гена AAVS1 (также известный как PPP1R12C), ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3 (также известный как CD142), FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1 (также известный как известный как CD91), MICA, MICB, RHD, ROSA26 и SHS231. Иммуносупрессивный фактор может быть вставлен в подходящую область локуса «безопасная гавань», включая, например, интрон, экзон и/или кодирующую ген область (также известную как кодирующая последовательность или «CDS»). В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» выбран из группы, состоящей из локуса AAVS1, локуса CCR5 и локуса CLYBL. В некоторых вариантах осуществления вставка вносится в один аллель конкретного геномного локуса. В некоторых вариантах осуществления вставка вносится в обоих аллелях конкретного геномного локуса. В любом из этих вариантов осуществления ориентация трансгена, встроенного в целевой геномный локус, может быть либо такой же, либо

противоположной направлению гена в этом локусе.

[224] В данном документе предложены сконструированные клетки, которые представляют собой жизнеспособный источник для любого типа трансплантированных клеток. Такие клетки могут быть защищены от адаптивного и врожденного иммунного отторжения при введении субъекту-реципиенту посредством экспрессии одного или более иммуносупрессивных факторов. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки не подвергаются отторжению клетками врожденного иммунитета. В некоторых случаях клетки не подвержены опосредованному NK-клетками лизису. В некоторых случаях описанные в данном документе клетки не подвержены к поглощению макрофагами.

[225] В некоторых аспектах сконструированные клетки представляют собой плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки или первичные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки получают из плюрипотентных стволовых клеток с использованием выбранного протокола дифференцировки для определенного типа клеток. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки выбраны из группы, которая включает цитотоксические Т-клетки, Т-хелперы, Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки, инфильтрирующие опухоль лимфоциты и их комбинации.

[226] 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 вводили 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, необязательно, объединены. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки получают от одного или более 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 сконструированы для экзогенной экспрессии CD47 и культивируются in vitro.

[227] В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки или пул первичных Т-клеток сконструированы для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR). CAR (также известные как химерные иммунорецепторы, химерные Т-клеточные рецепторы или искусственные Т-клеточные рецепторы) представляют собой рецепторные белки, которые были сконструированы таким образом, чтобы обеспечить клетки-хозяева (например, Т-клетки) новой способностью нацеливаться на определенный белок. Рецепторы являются химерными, потому что они объединяют в одном рецепторе как антигенсвязывающую, так и активирующую Т-клетки функцию. CAR может быть любым, известным специалистам в данной области техники. Полезные CAR включают те, которые связывают антиген, выбранный из группы, включающей CD19, CD22, CD38, CD123, CD138 и BCMA. В некоторых случаях CAR является таким же или эквивалентным тем, которые используются в одобренных FDA препаратах на основе CAR-Т-клеток, таких как, помимо прочего, тисагенлеклейсел и аксикабтаген цилолейцел, или тех, которые проходят

клинические испытания. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CD19-специфический CAR.

[228] В определенных вариантах осуществления CAR может содержать сигнальный пептид на N-конце. Неограничивающие примеры сигнальных пептидов включают сигнальный пептид CD8α, сигнальный пептид IgK и сигнальный пептид субъединицы альфа рецептора гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора (GMCSFR-α, также известный как субъединица альфа рецептора колониестимулирующего фактора 2 (CSF2RA)) и их варианты, аминокислотные последовательности которых представлены в **таблице 2** ниже.

Таблица 2. Иллюстративные последовательности сигнальных пептидов

SEQ ID NO:	**Последовательность**	**Описание**
6	MALPVTALLLPLALLLHAARP	Сигнальный пептид CD8α
7	METDTLLLWVLLLWVPGSTG	Сигнальный пептид IgK
8	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	Сигнальный пептид GMCSFR-α (CSF2RA)

[229] В определенных вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR может содержать одно или более антител, специфичных к одному целевому антигену или множеству целевых антигенов. Антитело может представлять собой фрагмент антитела, например, scFv, или однодоменный фрагмент антитела, например, VHH. В определенных вариантах осуществления scFv может содержать вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и вариабельную область легкой цепи (V_L) антитела, соединенные линкером. V_H и V_L могут быть соединены в любом порядке, то есть V_H-линкер-V_L или V_L-линкер-V_H. Неограничивающие примеры линкеров включают линкер Whitlow, линкер $(G_4S)_n$ (n может быть положительным целым числом, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 и т. д.) и их варианты. В определенных вариантах осуществления антиген может быть антигеном, который исключительно или предпочтительно экспрессируется на опухолевых клетках, или антигеном, характерным для аутоиммунного или воспалительного заболевания. Примеры целевых антигенов включают, но не ограничиваются ими, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD70, каппа-, лямбда- и антиген созревания В-клеток (BCMA), член D группы 5 семейства C сопряженных с G-белком рецепторов (GPRC5D) (ассоциированные с лейкозами); CS1/SLAMF7, CD38, CD138, GPRC5D, TACI и BCMA (ассоциированные с миеломами); GD2, HER2, EGFR, EGFRvIII, B7H3, PSMA, PSCA, CAIX, CD171, CEA, CSPG4, EPHA2, FAP, FRα, IL-13Rα, мезотелин, MUC1, MUC16 и ROR1 (ассоциированные с солидными опухолями). В любом из этих вариантов осуществления внеклеточный связывающий домен CAR может быть кодон-оптимизирован в отношении экспрессии в клетке-хозяине или иметь вариантные последовательности для усиления функций внеклеточного связывающего домена.

[230] В некоторых вариантах осуществления CAR может содержать шарнирный домен, также называемый спейсером. В некоторых вариантах осуществления CAR может

включать шарнирный домен, также называемый спейсером. Неограничивающие примеры шарнирных доменов включают шарнирный домен CD8α, шарнирный домен CD28, шарнирный домен IgG4, домен шарнир-CH2-CH3 IgG4 и их варианты, аминокислотные последовательности которых представлены в таблице **3** ниже.

Таблица 3. Иллюстративные последовательности шарнирных доменов

SEQ ID NO:	**Последовательность**	**Описание**
9	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACD	Шарнирный домен CD8α
10	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPS PLFPGPSKP	Шарнирный домен CD28
113	AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKP	Шарнирный домен CD28
11	ESKYGPPCPPCP	Шарнирный домен IgG4
12	ESKYGPPCPSCP	Шарнирный домен IgG4
13	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	Домен шарнир-CH2-CH3 IgG4

[231] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR может содержать трансмембранную область альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3ε, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154 или их функциональный вариант, включая человеческие версии каждой из этих последовательностей. В других вариантах осуществления трансмембранный домен может содержать трансмембранную область 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, включая человеческие версии каждой из этих последовательностей. В **таблице 4** представлены аминокислотные последовательности нескольких иллюстративных трансмембранных доменов.

Таблица 4. Иллюстративные последовательности трансмембранных доменов

SEQ ID NO:	**Последовательность**	**Описание**
14	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	Трансмембранный домен CD8α
15	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	Трансмембранный домен CD28
114	MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	Трансмембранный домен CD28

[232] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен и/или внутриклеточный костимулирующий домен CAR может содержать один или более

сигнальных доменов, выбранных из B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BTLA/CD272, CD28, CTLA-4, Gi24/VISTA/B7-H5, ICOS/CD278, PD-1, 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/TNFβ, OX40/TNFRSF4, лиганда OX40/TNFSF4, RELT/TNFRSF19L, TACI/TNFRSF13B, TL1A/TNFSF15, TNFα, 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, лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена-1 (LFA-1), NKG2C, CD3ζ, иммунорецепторного активирующего мотива на основе тирозина (ITAM), CD27, CD28, 4-1BB, CD134/OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганда, который специфически связывается с CD83, и его функционального варианта, включая человеческие версии каждой из этих последовательностей. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен и/или внутриклеточный костимулирующий домен содержит один или более сигнальных доменов, выбранных из домена CD3ζ, ITAM, домена CD28, домена 4-1BB или их функционального варианта. В **таблице 5** представлены аминокислотные последовательности нескольких иллюстративных внутриклеточных костимулирующих и/или сигнальных доменов. В определенных вариантах осуществления, как в случае тисагенлеклейсела, как описано ниже, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID NO: 18 может иметь мутацию, например, мутацию глутамина (Q) в лизин (K) в положении аминокислоты 14 (см. SEQ ID NO:115).

Таблица 5. Иллюстративные последовательности внутриклеточных костимулирующих и/или сигнальных доменов

SEQ ID NO:	**Последовательность**	**Описание**
16	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCEL	Костимулирующий домен 4-1BB
17	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY QPYAPPRDFAAYRS	Костимулирующий домен CD28
18	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	Сигнальный домен CD3ζ
115	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK	Сигнальный домен CD3ζ (с мутацией Q на K в

	NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	положении 14)

[233] В определенных вариантах осуществления CAR встраивают в Т-клетку или другую иммунную клетку с использованием вектора. В определенных из этих вариантов осуществления вектор содержит одну экспрессионную кассету для экспрессии CAR. В других вариантах осуществления вектор представляет собой полицистронный вектор, содержащий две или более экспрессионные кассеты, например, бицистронный вектор, трицистронный вектор или квадрацистронный вектор, который обеспечивает одновременную экспрессию двух или более отдельных белков из одного транскрипта мРНК в клетке-хозяине. В этих вариантах осуществления одна экспрессионная кассета может экспрессировать CAR, тогда как одна или более дополнительных кассет экспрессии могут экспрессировать дополнительный фактор, включая, например, CD47, CD16, CD24, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, ингибитор C1, FASL, IDO1, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, IL-10, IL-35, PD-1, PD-L1, серпин b9, CCl21, Mfge8. В определенных вариантах осуществления две или более экспрессионных кассет находятся под контролем одного промотора и отделены друг от друга одним или более сайтами расщепления для достижения совместной экспрессии представляющих интерес белков из одного транскрипта. В других вариантах осуществления два или более генов могут находиться под контролем отдельных промоторов. В определенных вариантах осуществления полицистронный вектор может дополнительно содержать защитный переключатель. Полицистронный вектор может быть вектором любого типа, подходящим для введения нуклеотидных последовательностей в клетку-хозяина, включая, например, плазмиды, аденовирусные векторы, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, фаги и донорные векторы на основе гомологичной репарации (HDR).

[234] В определенных вариантах осуществления две или более экспрессионных кассет полицистронного вектора могут быть разделены одним или более сайтами расщепления. В некоторых вариантах осуществления один или более сайтов расщепления содержат один или более сайтов саморасщепления. В некоторых вариантах осуществления сайт саморасщепления содержит сайт 2A. Пептиды 2A представляют собой класс пептидов длиной 18-22 аминокислоты, впервые обнаруженных у пикорнавирусов, и могут индуцировать проскок рибосомы во время трансляции белка, таким образом продуцируя равные количества нескольких генов из одного и того же транскрипта мРНК. Пептиды 2A функционируют так, чтобы «расщеплять» транскрипт мРНК, заставляя рибосому пропускать синтез пептидной связи на С-конце между остатками глицина (G) и пролина (P), что приводит к разделению между концами последовательности 2A и следующего по ходу транскрипции пептида. В молекулярной биологии, как правило, используются четыре пептида 2A: T2A, P2A, E2A и F2A, последовательности которых приведены в **таблице 6**. Линкер глицин-серин-глицин (GSG) необязательно добавляют к N-концу пептида 2A для повышения эффективности

расщепления. Использование «()» вокруг последовательности в данном изобретении означает, что заключенная в скобки последовательность является необязательной.

Таблица 6. Последовательности пептидов 2A

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	Пептид 2A
85	(GSG) EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
86	(GSG) ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
87	(GSG) QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
88	(GSG) VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A

[235] В некоторых вариантах осуществления один или более сайтов расщепления дополнительно содержат один или более сайтов расщепления протеазой. Один или более сайтов расщепления протеазой могут либо предшествовать, либо следовать за сайтами саморасщепления (например, сайты 2A) в направлении от 5’ к 3’ полицистронного вектора. Сайт расщепления протеазой может быть расщеплен протеазой после трансляции полного транскрипта или после трансляции каждой экспрессионной кассеты, так что первый продукт экспрессии высвобождается до трансляции следующей кассеты экспрессии. В этих вариантах осуществления наличие сайта расщепления протеазой в дополнение к сайту 2A, особенно предшествующего сайту 2A в направлении от 5’ к 3’, может уменьшить количество дополнительных аминокислотных остатков, присоединенных к представляющим интерес экспрессируемым белкам. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления протеазой содержит сайт расщепления фурином, также известный как сайт фермента, расщепляющего белок в месте спаренных основных аминокислот, (PACE). Существует по меньшей мере три последовательности расщепления фурином, FC1, FC2 и FC3, аминокислотные последовательности которых приведены в **таблице 7**. Подобно сайтам 2A, для эффективности расщепления могут быть включены одна или более необязательных последовательностей глицин-серин-глицин (GSG).

Таблица 7. Последовательности сайтов расщепления фурином

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	Сайт расщепления фурином
89	RRRR (GSG)	FC1
90	RKRR (GSG)	FC2
91	RKRR (GSG) TPDPW (GSG)	FC3

[236] В некоторых вариантах осуществления один или более сайтов расщепления содержат один или более сайтов саморасщепления, один или более сайтов расщепления протеазой и/или любую их комбинацию. Например, сайт расщепления может включать только сайт 2A. В еще одном примере сайт расщепления может включать сайт FC2 или FC3, за которым следует сайт 2A. В этих вариантах осуществления один или более сайтов саморасщепления могут быть одинаковыми или разными. Точно так же один или более

сайтов расщепления протеазой могут быть одинаковыми или разными.

[237] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит промотор, который управляет экспрессией конститутивного гена в клетках млекопитающих. Часто используемые включают, например, промотор фактора элонгации 1 альфа (EF1α), немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV) (Greenaway et al., Gene 18: 355-360 (1982)), ранний промотор обезьяньего вакуолизирующего вируса 40 (SV40) (Fiers et al., Nature 273:113-120 (1978)), промотор вируса некроза селезенки (SFFV), промотор фосфоглицераткиназы (PGK) (Adra et al., Gene 60(1):65-74 (1987)), промотор бета-актина человека, промотор гена полиубиквитина C (UBC) и промотор CAG (Nitoshi et al., Gene 108:193-199 (1991)). Примером промотора, способного экспрессировать трансген CAR в клетке млекопитающего (например, Т-клетке), является промотор EF1α. Нативный промотор EF1α стимулирует экспрессию альфа-субъединицы комплекса фактора элонгации-1, который отвечает за ферментную доставку аминоацил-тРНК в рибосому. Промотор EF1α широко используется в экспрессионных плазмидах млекопитающих и продемонстрировал эффективность при стимуляции экспрессии CAR из трансгенов, клонированных в лентивирусный вектор. См., например, Milone et al., Mol. Ther. 17(8):1453-1464 (2009).

[238] В других вариантах осуществления полицистронный вектор содержит индуцируемый промотор. В отличие от конститутивных промоторов, индуцируемые промоторы могут переключаться между включенным и выключенным состоянием в ответ на определенные стимулы (например, химические агенты, температура, свет) и могут регулироваться ткане- или клеточно-специфическим образом. Неограничивающие примеры часто используемых индуцируемых промоторов включают тетрациклин-зависимую систему регуляции с экспрессией гена в присутствии тетрациклина (систему Tet-On) и тетрациклин-зависимую систему регуляции с экспрессией гена в отсутствие тетрациклина (Tet-Off), в которых используются тетрациклин-чувствительные элементы (TRE), расположенные выше минимального промотора (например, промотора CMV) (Gossen & Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(12):5547-5551 (1992)). TRE состоит из 7 повторов 19-нуклеотидной последовательности тетрациклинового оператора (tetO) и может быть распознан тетрациклин-зависимым репрессором (tetR). В системе Tet-Off тетрациклин-зависимый трансактиватор (tTA) был разработан путем слияния tetR с активирующим доменом белка вириона 16 вируса простого герпеса. В отсутствие тетрациклина или его аналогов (например, доксициклина) tTA будет связываться с последовательностями tetO TRE и управлять экспрессией; в присутствии тетрациклина rTA будет связываться с тетрациклином, а не с TRE, что приведет к снижению экспрессии гена. Наоборот, в системе Tet-On обратный трансактиватор (rtTA) был создан путем мутагенеза аминокислотных остатков, важных для тетрациклин-зависимой репрессии, а rtTA связывается с TRE и управляет экспрессией генов в присутствии тетрациклина или доксициклина (Gossen et al., Science 268(5218):1766-1769 (1995)). Другие примеры индуцируемых промоторов включают, например, AlcA, LexA и Cre.

[239] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит консенсусную последовательность Козак перед первой экспрессионной кассетой. Консенсусная последовательность Козак представляет собой мотив нуклеиновой кислоты, который функционирует как сайт инициации трансляции белка в большинстве эукариотических транскриптов мРНК и обеспечивает сборку рибосом и инициацию трансляции. В некоторых вариантах осуществления консенсусная последовательность Козак содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:92, где r представляет собой пурин (т. е. a или g): (gcc)gccrccatgg (SEQ ID NO:92).

[240] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит посттранскрипционный регуляторный элемент (WPRE) вируса гепатита сурка (WHV) после второй экспрессионной кассеты. WPRE представляет собой последовательность ДНК, которая при транскрипции создает третичную структуру, усиливающую экспрессию. Последовательность WPRE, как правило, используется для увеличения экспрессии генов, доставляемых вирусными векторами. В некоторых вариантах осуществления последовательность WPRE содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:93, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO:93:

aatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaat gcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtca ggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcg ctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattcc gtggtgttgtcggggaaatcatcgtcctttccttggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttc ggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcgga tctccctttgggccgcctccccgc (SEQ ID NO:93).

[241] В некоторых вариантах осуществления полицистронный вектор содержит плечи гомологии, фланкирующие фрагмент, содержащий экспрессионные кассеты и/или промотор, для использования в сайт-направленной вставке (нокин) в указанные локусы в клетке-хозяине, например, путем подходов на основе гомологичной репарации (HDR), как описано. Фрагмент полицистронного вектора, подлежащий вставке, обычно содержащий по меньшей мере экспрессионные кассеты и необязательно также содержащий промотор, должен быть фланкирован гомологичной последовательностью непосредственно выше и ниже целевого сайта вставки (т. е. левое плечо гомологии (LHA) и правое плечо гомологии (RHA)). Плечи гомологии специально разработаны для целевого геномного локуса фрагмента, который служит матрицей для HDR. Длина каждого плеча гомологии обычно зависит от размера вводимой вставки, при этом более крупные вставки требуют более длинных плеч гомологии.

[242] В некоторых вариантах осуществления клетка или популяция клеток,

экспрессирующие экзогенный CAR и экзогенный полипептид CD47, экспрессируют CAR и CD47 из двух отдельных векторов. В других вариантах осуществления экзогенный CAR и экзогенный полипептид CD47 вводили в клетку или популяцию клеток с помощью полицистронного вектора, например, бицистронного вектора, содержащего первую экспрессионную кассету, экспрессирующую экзогенный CAR, и вторую экспрессионную кассету, экспрессирующую экзогенный CD47. В некоторых из этих вариантов осуществления полицистронный вектор может содержать одну или более дополнительных экспрессионных кассет, экспрессирующих один или более дополнительных факторов. В определенных вариантах осуществления, где клетка или популяция клеток содержат бицистронный вектор, кодирующий экзогенный CAR и экзогенный полипептид CD47, бицистронный вектор вводили в клетку или клетки с помощью лентивируса.

CAR к CD19

[243] В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR к CD19. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 может содержать сигнальный пептид, внеклеточный связывающий домен, который специфически связывает CD19, шарнирный домен, трансмембранный домен, внутриклеточный костимулирующий домен и/или внутриклеточный сигнальный домен в тандеме.

[244] В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид CAR к CD19 содержит сигнальный пептид CD8α. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид CD8α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:6, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит сигнальный пептид IgK. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид IgK содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:7, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит сигнальный пептид GMCSFR-α или CSF2RA. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид GMCSFR-α или CSF2RA содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:8, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:8.

[245] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD19 специфичен в отношении CD19, например, CD19 человека. Внеклеточный связывающий домен CAR к CD19 может быть кодон-оптимизирован в отношении экспрессии в клетке-хозяине или иметь вариантные последовательности для усиления функций внеклеточного связывающего домена. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен содержит иммуногенно активную часть молекулы иммуноглобулина, например, scFv.

[246] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD19 содержит scFv, полученный из моноклонального антитела FMC63 (FMC63), который содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и вариабельную область легкой цепи (V_L) FMC63, соединенные линкером. FMC63 и производный scFv были описаны в Nicholson et al., Mol. Immun. 34(16-17):1157-1165 (1997) и публикации заявки PCT № WO2018/213337, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные последовательности всего scFv, полученного из FMC63 (также называемого scFv FMC63), и его различных частей представлены в **таблице 8** ниже. В некоторых вариантах осуществления CD19-специфический scFv содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:19, 20 или 25, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:19, 20, или 25. В некоторых вариантах осуществления CD19-специфический scFv может содержать одну или более CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 21-23 и 26-28. В некоторых вариантах осуществления CD19-специфический scFv может содержать легкую цепь с одной или более CDR, имеющими аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 21-23. В некоторых вариантах осуществления CD19-специфический scFv может содержать тяжелую цепь с одной или более CDR, имеющими аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 26-28. В любом из этих вариантов осуществления CD19-специфический scFv может содержать одну или более CDR, содержащих одну или более аминокислотных замен, или содержащих последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с любой из идентифицированных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD19 содержит или состоит из одной или более CDR, как описано в данном документе.

[247] В некоторых вариантах осуществления линкер, связывающий части V_H и V_L scFv, представляет собой линкер Whitlow, имеющий аминокислотную

последовательность, указанную в SEQ ID NO:24. В некоторых вариантах осуществления линкер Whitlow может быть заменен другим линкером, например, линкером $3xG_4S$, имеющим аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:30, что приводит к получению другого scFv, полученного из FMC63, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:29. В некоторых из этих вариантов осуществления CD19-специфический scFv содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:29, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:29.

Таблица 8. Иллюстративные последовательности scFv к CD19 и компонентов

SEQ ID NO:	**Аминокислотная последовательность**	**Описание**
19	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDI SKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT YFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGS GKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPS QSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIK DNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	Полная последовательность scFv FMC63 к CD19 с линкером Whitlow
20	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDI SKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT YFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT	Вариабельная область легкой цепи scFv FMC63 к CD19
21	QDISKY	CDR1 легкой цепи scFv FMC63 к CD19
22	HTS	CDR2 легкой цепи scFv FMC63 к CD19
23	QQGNTLPYT	CDR3 легкой цепи scFv FMC63 к CD19
24	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер Whitlow
25	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVS LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSE TTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMN SLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDY WGQGTSVTVSS	Вариабельная область тяжелой цепи scFv FMC63 к CD19
26	GVSLPDYG	CDR1 тяжелой цепи scFv FMC63 к CD19
27	IWGSETT	CDR2 тяжелой цепи scFv FMC63 к CD19

28	AKHYYYGGSYAMDY	CDR3 тяжелой цепи scFv FMC63 к CD19
29	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDI SKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT YFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGS GGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQS LSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDN SKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYY YGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	Полная последовательность scFv FMC63 к CD19 с линкером 3xG_4S
30	GGGGSGGGGSGGGGS	Линкер 3xG_4S

[248] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD19 получен из антитела, специфичного к CD19, включая, например, SJ25C1 (Bejcek et al., Cancer Res. 55:2346-2351 (1995)), HD37 (Pezutto et al., J. Immunol. 138(9):2793-2799 (1987)), 4G7 (Meeker et al., Hybridoma 3:305-320 (1984)), B43 (Bejcek (1995)), BLY3 (Bejcek (1995)), B4 (Freedman et al., 70:418-427 (1987)), B4 HB12b (Kansas & Tedder, J. Immunol. 147:4094-4102 (1991); Yazawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:15178-15183 (2005); Herbst et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 335:213-222 (2010)), BU12 (Callard et al., J. Immunology, 148(10): 2983-2987 (1992)), и CLB-CD19 (De Rie Cell. Immunol. 118:368-381(1989)). В любом из этих вариантов осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD19 может содержать или состоять из V_H, V_L, и/или одного или более CDR любого из антител.

[249] В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен CAR к CD19 содержит шарнирный домен CD8α, например, шарнирный домен CD8α человека. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен CD8α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:9, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает шарнирный домен CD28, например, шарнирный домен CD28 человека. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:10, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает шарнирный домен IgG4, например, шарнирный домен IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен IgG4 содержит или состоит из

аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит домен шарнир-Ch2-Ch3 IgG4, например, домен шарнир-Ch2-Ch3 IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления домен шарнир-Ch2- Ch3 IgG4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:13, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:13.

[250] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR к CD19 содержит трансмембранный домен CD8α, например, трансмембранный домен CD8α человека. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:14, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD28, например, трансмембранный домен CD28 человека. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:15, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:15.

[251] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный костимулирующий домен CAR к CD19 включает костимулирующий домен 4-1BB. 4-1BB, также известный как CD137, передает мощный костимулирующий сигнал Т-клеткам, способствуя дифференцировке и повышая долгосрочное выживание Т-лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен 4-1BB является человеческим. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен 4-1BB содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:16, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%,

по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный костимулирующий домен содержит костимулирующий домен CD28. CD28 является еще одной костимулирующей молекулой на Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен CD28 является человеческим. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:17. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный костимулирующий домен CAR к CD19 содержит костимулирующий домен 4-1BB и костимулирующий домен CD28, как описано.

[252] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR к CD19 содержит сигнальный домен CD3-дзета (ζ). CD3ζ связывается с рецепторами Т-клеток (TCR) для генерации сигнала и содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). Сигнальный домен CD3ζ относится к аминокислотным остаткам из цитоплазматического домена дзета-цепи, которых достаточно для функциональной передачи начального сигнала, необходимого для активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD3ζ является человеческим. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD3ζ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:18, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:18.

[253] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит CD19-специфический scFv, имеющий последовательности, указанные в SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:29, шарнирный домен IgG4 SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12, трансмембранный домен CD28 SEQ ID NO:15, костимулирующий домен 4-1BB SEQ ID NO:16, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID NO:18 и/или их варианты (т.е. имеющие последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 идентичности с раскрытой последовательностью). В любом из этих вариантов осуществления CAR к CD19 может дополнительно содержать сигнальный пептид (например, сигнальный пептид CD8α), как описано.

[254] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 содержит CD19-специфический scFv, имеющий последовательности, указанные в SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:29, шарнирный домен CD28 SEQ ID NO:10, трансмембранный домен CD28 SEQ ID NO:15, костимулирующий домен CD28 SEQ ID NO:17, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID NO:18 и/или их варианты (т.е. имеющие последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 идентичности с раскрытой последовательностью). В любом из этих вариантов осуществления CAR к CD19 может дополнительно содержать сигнальный пептид (например, сигнальный пептид CD8α), как описано.

[255] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 кодируется нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:116, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:116 (см. **таблицу 9**). Кодируемый CAR к CD19 имеет соответствующую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:117, или имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или на 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:117, со следующими компонентами: Сигнальный пептид CD8α, scFv FMC63 (V_L-линкер Whitlow-V_H), шарнирный домен CD8α, трансмембранный домен CD8α, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3ζ.

[256] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 представляет собой коммерчески доступный вариант CAR к CD19, включая, помимо прочего, CAR к CD19, экспрессируемый и/или кодируемый Т-клетками, включая тисагенлеклейсел, лизокабтаген маралейцел, аксикабтаген цилолейцел и брексукабтаген аутолейцел. Тисагенлеклейсел содержит CAR к CD19 со следующими компонентами: Сигнальный пептид CD8α, scFv FMC63(V_L-линкер $3xG_4S$-V_H), шарнирный домен CD8α, трансмембранный домен CD8α, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3ζ. Нуклеотидная и аминокислотная последовательность CAR к CD19 в тисагенлеклейселе представлена в **таблице 9**, а аннотации последовательностей представлены в **таблице 10**. Лизобактаген маралейцел содержит CAR к CD19 со следующими компонентами: Сигнальный пептид GMCSFR-α или CSF2RA, scFv FMC63 (V_L-линкер Whitlow-V_H), шарнирный домен IgG4, трансмембранный домен CD28, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3ζ. Нуклеотидная и аминокислотная последовательность CAR к CD19 в лизобактагене маралейцеле представлена в **таблице 9**, а аннотации последовательностей представлены в **таблице 11**. Аксикабтаген цилолейцел или его части. Аксикабтаген цилолейцел содержит

CAR к CD19 со следующими компонентами: Сигнальный пептид GMCSFR-α или CSF2RA, scFv FMC63 (V_L-линкер Whitlow-V_H), шарнирный домен CD28, трансмембранный домен CD28, костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3ζ. Нуклеотидная и аминокислотная последовательность CAR к CD19 в аксикабтагене цилолейцеле представлена в **таблице 9**, а аннотации последовательностей представлены в **таблице 12**. Брексукабтаген аутолейцел или его части. Брексукабтаген аутолейцел содержит CAR к CD19 со следующими компонентами: Сигнальный пептид GMCSFR-α, scFv FMC63, шарнирный домен CD28, трансмембранный домен CD28, костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3ζ.

[257] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 кодируется нуклеотидную последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 31, 33 или 35, или нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 31, 33, или 35. Кодируемый CAR к CD19 имеет соответствующую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 32, 34 или 36 соответственно, или по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 32, 34, или 36, соответственно.

Таблица 9. Иллюстративные последовательности CAR к CD19

SEQ ID NO:	**Последовательность**	**Описание**
116	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctcca cgccgccaggccggacatccagatgacacagactacatcctccctgtc tgcctctctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtcagga cattagtaaatatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaa actcctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggt tcagtggcagtgggtctggaacagattattctctcaccattagcaacctg gagcaagaagatattgccacttacttttgccaacagggtaatacgcttcc gtacacgttcggaggggggaccaagctggagatcacaggctccacct ctggatccggcaagcccggatctggcgagggatccaccaagggcga ggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacaga gcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattacccgactatggt gtaagctggattcgccagcctccacgaaagggtctggagtggctggg agtaatatggggtagtgaaaccacatactataattcagctctcaaatcca gactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaat gaacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacatt attactacggtggtagctatgctatggactactggggccaaggaacctc agtcaccgtctcctcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacac cggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggc gtgccggccagcggcgggggggcgcagtgcacacgaggggctgg acttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtgg ggtccttctcctgtcactggttatcacccctttactgcaaacggggcagaa	Иллюстративная нуклеотидная последовательность CAR к CD19

	agaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaact actcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaaga aggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcc cccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatcta ggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccggg accctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaag gcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagt gagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgat ggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgc ccttcacatgcaggccctgcccccctcgc	
117	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSL SASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDG TVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT GSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVA PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQ VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAM DYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR	Иллюстративная аминокислотная последовательность CAR к CD19
31	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctcca cgccgccaggccggacatccagatgacacagactacatcctccctgtc tgcctctctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtcagga cattagtaaatatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaa actcctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggt tcagtggcagtgggtctggaacagattattctctcaccattagcaacctg gagcaagaagatattgccacttacttttgccaacagggtaatacgcttcc gtacacgttcggaggggggaccaagctggagatcacaggtggcggt ggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcggatctgaggtgaaac tgcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtcc gtcacatgcactgtctcaggggtctcattacccgactatggtgtaagctg gattcgccagcctccacgaaagggtctggagtggctgggagtaatatg gggtagtgaaaccacatactataattcagctctcaaatccagactgacc atcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagtct gcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacattattactacg gtggtagctatgctatggactactggggccaaggaacctcagtcaccg tctcctcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcc caccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggc cagcggcgggggggcgcagtgcacacgaggggctggacttcgcct gtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctc ctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaaactcc tgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagag gaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatg tgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaca agcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaaga	Нуклеотидная последовательность CAR к CD19 тисагенлеклейсела

	gaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagat gggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaat gaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggat gaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttacca gggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgca ggccctgcccccctcgc	
32	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSL SASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDG TVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT GGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPS QSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLE WLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQV FLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMD YWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF SRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR	Аминокислотная последовательность CAR к CD19 тисагенлеклейсела
33	atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgagctgccccacccc gcctttctgctgatccccgacatccagatgacccagaccacctccagcc tgagcgccagcctgggcgaccgggtgaccatcagctgccgggccag ccaggacatcagcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccgacg gcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggc gtgcccagccggtttagcggcagcggctccggcaccgactacagcct gaccatctccaacctggaacaggaagatatcgccacctacttttgccag cagggcaacacactgccctacacctttggcggcggaacaaagctgga aatcaccggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcga gggcagcaccaagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggccctgg cctggtggcccccagccagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagc ggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagctggatccggcagcccc ccaggaagggcctggaatggctgggcgtgatctggggcagcgagac cacctactacaacagcgccctgaagagccggctgaccatcatcaagg acaacagcaagagccaggtgttcctgaagatgaacagcctgcagacc gacgacaccgccatctactactgcgccaagcactactactacggcggc agctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtga gcagcgaatctaagtacggaccgccctgccccccttgccctatgttctg ggtgctggtggtggtcggaggcgtgctggcctgctacagcctgctggt caccgtggccttcatcatcttttgggtgaaacggggcagaaagaaactc ctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaaga ggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggat gtgaactgcgggtgaagttcagcagaagcgccgacgcccctgcctac cagcagggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcagaa gggaagagtacgacgtcctggataagcggagaggccgggaccctga gatgggcggcaagcctcggcggaagaaccccaggaaggcctgtat aacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcg gcatgaagggcgagcggaggcggggcaagggccacgacggcctgt atcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgccctgcac	Нуклеотидная последовательность CAR к CD19 лизобактагена маралейцела

	atgcaggccctgcccccaagg	
34	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSL SASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDG TVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT GSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVA PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQ VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAM DYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPMFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	Аминокислотная последовательность CAR к CD19 лизобактагена маралейцела
35	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagc attcctcctgatcccagacatccagatgacacagactacatcctccctgt ctgcctctctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtcagg acattagtaaatatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgtta aactcctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtcccatcaag gttcagtggcagtgggtctggaacagattattctctcaccattagcaacc tggagcaagaagatattgccacttacttttgccaacagggtaatacgctt ccgtacacgttcggaggggggactaagttggaaataacaggctccac ctctggatccggcaagcccggatctggcgagggatccaccaagggc gaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcaca gagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattacccgactatg gtgtaagctggattcgccagcctccacgaaagggtctggagtggctgg gagtaatatggggtagtgaaaccacatactataattcagctctcaaatcc agactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaa tgaacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacat tattactacggtggtagctatgctatggactactggggtcaaggaacctc agtcaccgtctcctcagcggccgcaattgaagttatgtatcctcctcctta cctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaa acacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctttgggt gctggtggtggttgggggagtcctggcttgctatagcttgctagtaaca gtggcctttattattttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgca cagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgca agcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctc cagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcag ggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagagga gtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggg gaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaact gcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaag gcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtct cagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccc tgcccccctcgc	Нуклеотидная последовательность CAR к CD19 аксикабтагена цилолейцела
36	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSL SASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDG TVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT	Аминокислотная последовательность CAR к CD19 аксикабтагена

	GSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVA PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQ VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAM DYWGQGTSVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKS NGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSR VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR	цилолейцела

Таблица 10. Аннотация последовательностей CAR к CD19 тисагенлеклейсела

Признак	**Положение нуклеотидной последовательности**	**Положение аминокислотной последовательности**
Сигнальный пептид CD8α	1-63	1-21
scFv FMC63 (V_L- линкер 3xG_4S -V_H)	64-789	22-263
Шарнирный домен CD8α	790-924	264-308
Трансмембранный домен CD8α	925-996	309-332
Костимулирующий домен 4-1BB	997-1122	333-374
Сигнальный домен CD3ζ	1123-1458	375-486

Таблица 11. Аннотация последовательностей CAR к CD19 лизобактагена маралейцела

Признак	**Положение нуклеотидной последовательности**	**Положение аминокислотной последовательности**
Сигнальный пептид GMCSFR-α	1-66	1-22
scFv FMC63 (V_L- линкер Whitlow -V_H)	67-801	23-267
Шарнирный домен IgG4	802-837	268-279
Трансмембранный домен CD28	838-921	280-307
Костимулирующий домен 4-1BB	922-1047	308-349
Сигнальный домен CD3ζ	1048-1383	350-461

Таблица 12. Аннотация последовательностей CAR к CD19 аксикабтагена цилолейцела

Признак	**Положение нуклеотидной последовательности**	**Положение аминокислотной последовательности**
Сигнальный пептид CSF2RA	1-66	1-22

scFv FMC63 (V_L- линкер Whitlow -V_H)	67-801	23-267
Шарнирный домен CD28	802-927	268-309
Трансмембранный домен CD28	928-1008	310-336
Костимулирующий домен CD28	1009-1131	337-377
Сигнальный домен CD3ζ	1132-1467	378-489

CAR к CD20

[258] В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR к CD20. CD20 представляет собой антиген, обнаруживаемый на поверхности В-клеток уже в про-В-фазе и постепенно увеличивающийся до уровня зрелости В-клеток, а также на клетках большинства В-клеточных новообразований. CD20-положительные клетки также иногда обнаруживаются при болезни Ходжкина, миеломе и тимоме. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD20 может содержать сигнальный пептид, внеклеточный связывающий домен, который специфически связывает CD20, шарнирный домен, трансмембранный домен, внутриклеточный костимулирующий домен и/или внутриклеточный сигнальный домен в тандеме.

[259] В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид CAR к CD20 содержит сигнальный пептид CD8α. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид CD8α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:6, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит сигнальный пептид IgK. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид IgK содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:7, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит сигнальный пептид GMCSFR-α или CSF2RA. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид GMCSFR-α или CSF2RA содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:8, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:8.

[260] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD20 специфичен в отношении CD20, например, CD20 человека. Внеклеточный связывающий домен CAR к CD20 может быть кодон-оптимизирован в отношении экспрессии в клетке-хозяине или иметь вариантные последовательности для усиления функций внеклеточного связывающего домена. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен содержит иммуногенно активную часть молекулы иммуноглобулина, например, scFv.

[261] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD20 получен из антитела, специфичного к CD20, включая, например, Leu16, IF5, 1.5.3, ритуксимаб, обинутузумаб, ибритумомаб, офатумумаб, тозитумумаб, одронекстамаб, вельтузумаб, ублитуксимаб, и окрелизумаб. В любом из этих вариантов осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD20 может содержать или состоять из V_H, V_L, и/или одного или более CDR любого из антител.

[262] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD20 содержит scFv, полученный из моноклонального антитела Leu16, который содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и вариабельную область легкой цепи (V_L) Leu16, соединенные линкером. См. Wu et al., Protein Engineering. 14(12):1025-1033 (2001). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкер $3xG_4S$. В других вариантах осуществления линкер представляет собой линкер Whitlow, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные последовательности различных частей всего scFv, полученного из Leu16 (также называемого scFv Leu16), и его различных частей представлены в **таблице 13** ниже. В некоторых вариантах осуществления CD20-специфический scFv содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 37, 38 или 42, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 37, 38 или 42. В некоторых вариантах осуществления CD20-специфический scFv может содержать одну или более CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 39-41, 43 и 44. В некоторых вариантах осуществления CD20-специфический scFv может содержать легкую цепь с одной или более CDR, имеющими аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 39-41. В некоторых вариантах осуществления CD20-специфический scFv может содержать тяжелую цепь с одной или более CDR, имеющими аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 43-44. В любом из этих вариантов осуществления CD20-специфический scFv может содержать одну или более CDR, содержащих одну или более аминокислотных замен, или содержащих последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей

мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с любой из идентифицированных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD20 содержит или состоит из одной или более CDR, как описано в данном документе.

Таблица 13. Иллюстративные последовательности scFv к CD20 и компонентов

SEQ ID NO:	**Аминокислотная последовательность**	**Описание**
37	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV NYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASG VPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAAT YYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKGSTSGS GKPGSGEGSTKGEVQLQQSGAELVKPG ASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTP GQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKA TLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYC ARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS	Полная последовательность scFv Leu16 к CD20 с линкером Whitlow
38	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV NYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASG VPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAAT YYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIK	Вариабельная область легкой цепи scFv Leu16 к CD20
39	RASSSVNYMD	CDR1 легкой цепи scFv Leu16 к CD20
40	ATSNLAS	CDR2 легкой цепи scFv Leu16 к CD20
41	QQWSFNPPT	CDR3 легкой цепи scFv Leu16 к CD20
42	EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGY TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPG NGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYM QLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWF FDVWGAGTTVTVSS	Тяжелая цепь scFv Leu16 к CD20
43	SYNMH	CDR1 тяжелой цепи scFv Leu16 к CD20
44	AIYPGNGDTSYNQKFKG	CDR2 тяжелой цепи scFv Leu16 к CD20

[263] В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен CAR к CD20 содержит шарнирный домен CD8α, например, шарнирный домен CD8α человека. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен CD8α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:9, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает шарнирный

домен CD28, например, шарнирный домен CD28 человека. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:10, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает шарнирный домен IgG4, например, шарнирный домен IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен IgG4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит домен шарнир-Ch2-Ch3 IgG4, например, домен шарнир-Ch2-Ch3 IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления домен шарнир-Ch2- Ch3 IgG4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:13, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:13.

[264] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR к CD20 содержит трансмембранный домен CD8α, например, трансмембранный домен CD8α человека. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:14, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD28, например, трансмембранный домен CD28 человека. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:15, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью,

указанной в SEQ ID NO:15.

[265] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный костимулирующий домен CAR к CD20 содержит костимулирующий домен 4-1BB, например, костимулирующий домен 4-1BB человека. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен 4-1BB содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:16, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный костимулирующий домен содержит костимулирующий домен CD28, например, костимулирующий домен CD28 человека. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:17.

[266] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR к CD20 содержит сигнальный домен CD3-дзета (ζ), например, сигнальный домен CD3ζ человека. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD3ζ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:18, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:18.

[267] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD20 содержит CD20-специфический scFv, имеющий последовательности, указанные в SEQ ID NO:37, шарнирный домен CD8α SEQ ID NO:9, трансмембранный домен CD8α SEQ ID NO:14, костимулирующий домен 4-1BB SEQ ID NO:16, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID NO:18 и/или их варианты (т.е. имеющие последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 идентичности с раскрытой последовательностью).

[268] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD20 содержит CD20-специфический scFv, имеющий последовательности, указанные в SEQ ID NO:37, шарнирный домен CD28 SEQ ID NO:10, трансмембранный домен CD8α SEQ ID NO:14, костимулирующий домен 4-1BB SEQ ID NO:16, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID NO:18

и/или их варианты (т.е. имеющие последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 идентичности с раскрытой последовательностью).

[269] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD20 содержит CD20-специфический scFv, имеющий последовательности, указанные в SEQ ID NO:37, шарнирный домен IgG4 SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12, трансмембранный домен CD8α SEQ ID NO:14, костимулирующий домен 4-1BB SEQ ID NO:16, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID NO:18 и/или их варианты (т.е. имеющие последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 идентичности с раскрытой последовательностью).

[270] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD20 содержит CD20-специфический scFv, имеющий последовательности, указанные в SEQ ID NO:37, шарнирный домен CD8α SEQ ID NO:9, трансмембранный домен CD28 SEQ ID NO:15, костимулирующий домен 4-1BB SEQ ID NO:16, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID NO:18 и/или их варианты (т.е. имеющие последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 идентичности с раскрытой последовательностью).

[271] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD20 содержит CD20-специфический scFv, имеющий последовательности, указанные в SEQ ID NO:37, шарнирный домен CD28 SEQ ID NO:10, трансмембранный домен CD28 SEQ ID NO:15, костимулирующий домен 4-1BB SEQ ID NO:16, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID NO:18 и/или их варианты (т.е. имеющие последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 идентичности с раскрытой последовательностью).

[272] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD20 содержит CD20-специфический scFv, имеющий последовательности, указанные в SEQ ID NO:37, шарнирный домен IgG4 SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:1, трансмембранный домен CD28 SEQ ID NO:15, костимулирующий домен 4-1BB SEQ ID NO:16, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID NO:18 и/или их варианты (т.е. имеющие последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 идентичности с раскрытой последовательностью).

CAR к CD22

[273] В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR к

CD22. CD22, который представляет собой трансмембранный белок, обнаруживаемый в основном на поверхности зрелых В-клеток, который функционирует как ингибирующий рецептор в отношении сигналинга В-клеточного рецептора (BCR). CD22 экспрессируется в 60-70% В-клеточных лимфом и лейкозов (например, В-хронический лимфолейкоз, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома Беркитта) и не присутствует на поверхности клеток на ранних стадиях развития В-клеток или на стволовых клетках. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD22 может содержать сигнальный пептид, внеклеточный связывающий домен, который специфически связывает CD22, шарнирный домен, трансмембранный домен, внутриклеточный костимулирующий домен и/или внутриклеточный сигнальный домен в тандеме.

[274] В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид CAR к CD22 содержит сигнальный пептид CD8α. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид CD8α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:6, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит сигнальный пептид IgK. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид IgK содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:7, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит сигнальный пептид GMCSFR-α или CSF2RA. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид GMCSFR-α или CSF2RA содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:8, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:8.

[275] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD22 специфичен в отношении CD22, например, CD22 человека. Внеклеточный связывающий домен CAR к CD22 может быть кодон-оптимизирован в отношении экспрессии в клетке-хозяине или иметь вариантные последовательности для усиления функций внеклеточного связывающего домена. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен содержит иммуногенно активную часть молекулы иммуноглобулина, например, scFv.

[276] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD22 получен из антитела, специфичного к CD22, включая, например, SM03, инотузумаб, эпратузумаб, моксетумомаб и пинатузумаб. В любом из этих вариантов осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD22 может содержать или состоять из V_H, V_L и/или одного или более CDR любого из антител.

[277] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD22 содержит scFv, полученный из моноклонального антитела m971 (m971), который содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и вариабельную область легкой цепи (V_L) m971, соединенные линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкер $3xG_4S$. В других вариантах осуществления вместо него можно использовать линкер Whitlow. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные последовательности всего scFv, полученного из m971 (также называемого scFv m971), и его различных частей представлены в **таблице 14** ниже. В некоторых вариантах осуществления CD22-специфический scFv содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 45, 46 или 50, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 45, 46 или 50. В некоторых вариантах осуществления CD22-специфический scFv может содержать одну или более CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 47-49 и 51-53. В некоторых вариантах осуществления CD22-специфический scFv может содержать тяжелую цепь с одной или более CDR, имеющими аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 47-49. В некоторых вариантах осуществления CD22-специфический scFv может содержать легкую цепь с одной или более CDR, имеющими аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 51-53. В любом из этих вариантов осуществления CD22-специфический scFv может содержать одну или более CDR, содержащих одну или более аминокислотных замен, или содержащих последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с любой из идентифицированных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD22 содержит или состоит из одной или более CDR, как описано в данном документе.

[278] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD22 содержит scFv, полученный из m971-L7, который представляет собой вариант m971 с созревшей аффинностью со значительно улучшенной аффинностью связывания с CD22 по сравнению с исходным антителом m971 (улучшенной с примерно 2 нМ до менее чем 50 пМ). В некоторых вариантах осуществления scFv, полученный из

m971-L7, содержит V_H и V_L m971-L7, соединенные линкером $3xG_4S$. В других вариантах осуществления вместо него можно использовать линкер Whitlow. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные последовательности всего scFv, полученного от m971-L7 (также называемого scFv m971-L7), и его различных частей представлены в **таблице 14** ниже. В некоторых вариантах осуществления CD22-специфический scFv содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 54, 55 или 59, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 54, 55 или 59. В некоторых вариантах осуществления CD22-специфический scFv может содержать одну или более CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 56-58 и 60-62. В некоторых вариантах осуществления CD22-специфический scFv может содержать тяжелую цепь с одной или более CDR, имеющими аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 56-58. В некоторых вариантах осуществления CD22-специфический scFv может содержать легкую цепь с одной или более CDR, имеющими аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 60-62. В любом из этих вариантов осуществления CD22-специфический scFv может содержать одну или более CDR, содержащих одну или более аминокислотных замен, или содержащих последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с любой из идентифицированных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD22 содержит или состоит из одной или более CDR, как описано в данном документе.

Таблица 14. Иллюстративные последовательности scFv к CD22 и компонентов

SEQ ID NO:	**Аминокислотная последовательность**	**Описание**
45	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDS VSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYY RSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFS LQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDA FDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ TIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQ SGVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFA TYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIK	Полная последовательность scFv m971 к CD22 с линкером $3xG_4S$
46	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDS VSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYY RSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFS LQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDA FDIWGQGTMVTVSS	Вариабельная область тяжелой цепи scFv m971 к CD22

47	GDSVSSNSAA	CDR1 тяжелой цепи scFv m971 к CD22
48	TYYRSKWYN	CDR2 тяжелой цепи scFv m971 к CD22
49	AREVTGDLEDAFDI	CDR3 тяжелой цепи scFv m971 к CD22
50	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTI WSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQS GVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFAT YYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIK	Легкая цепь scFv m971 к CD22
51	QTIWSY	CDR1 легкой цепи scFv m971 к CD22
52	AAS	CDR2 легкой цепи scFv m971 к CD22
53	QQSYSIPQT	CDR3 легкой цепи scFv m971 к CD22
54	QVQLQQSGPGMVKPSQTLSLTCAISGDS VSSNSVAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYY RSTWYNDYAVSMKSRITINPDTNKNQFS LQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDA FDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSDIQMIQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ TIWSYLNWYRQRPGEAPNLLIYAASSLQ SGVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFA TYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIK	Полная последовательность scFv m971-L7 к CD22 с линкером 3xG_4S
55	QVQLQQSGPGMVKPSQTLSLTCAISGDS VSSNSVAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYY RSTWYNDYAVSMKSRITINPDTNKNQFS LQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDA FDIWGQGTMVTVSS	Вариабельная область тяжелой цепи scFv m971-L7 к CD22
56	GDSVSSNSVA	CDR1 тяжелой цепи m971-L7 к CD22
57	TYYRSTWYN	CDR2 тяжелой цепи m971-L7 к CD22
58	AREVTGDLEDAFDI	CDR3 тяжелой цепи m971-L7 к CD22
59	DIQMIQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTI WSYLNWYRQRPGEAPNLLIYAASSLQS GVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFAT YYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIK	Вариабельная область легкой цепи scFv к CD22 m971-L7
60	QTIWSY	CDR1 легкой цепи m971-L7 к CD22
61	AAS	CDR2 легкой цепи m971-L7 к CD22
62	QQSYSIPQT	CDR3 легкой цепи m971-

		L7 к CD22

[279] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к CD22 содержит иммунотоксины HA22 или BL22. Иммунотоксины BL22 и HA22 представляют собой терапевтические агенты, которые содержат scFv, специфичный в отношении CD22, слитый с бактериальным токсином, и, таким образом, могут связываться с поверхностью раковых клеток, которые экспрессируют CD22, и уничтожать раковые клетки. BL22 содержит dsFv антитела к CD22, RFB4, слитого с укороченной формой экзотоксина A Pseudomonas массой 38 кДа (Bang et al., Clin. Cancer Res., 11:1545-50 (2005)). HA22 (CAT8015, моксетумомаб пасудотокс) представляет собой мутированную версию BL22 с более высокой аффинностью (Ho et al., J. Biol. Chem., 280(1): 607-17 (2005)). Подходящие последовательности антигенсвязывающих доменов HA22 и BL22, специфичных к CD22, описаны, например, в патентах США № 7541034; 7355012; и 7982011, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

[280] В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен CAR к CD22 содержит шарнирный домен CD8α, например, шарнирный домен CD8α человека. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен CD8α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:9, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает шарнирный домен CD28, например, шарнирный домен CD28 человека. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:10, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает шарнирный домен IgG4, например, шарнирный домен IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен IgG4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит домен шарнир-Ch2-Ch3 IgG4, например, домен шарнир-Ch2-

Ch3 IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления домен шарнир-Ch2- Ch3 IgG4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:13, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:13.

[281] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR к CD22 содержит трансмембранный домен CD8α, например, трансмембранный домен CD8α человека. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:14, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD28, например, трансмембранный домен CD28 человека. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:15, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:15.

[282] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный костимулирующий домен CAR к CD22 содержит костимулирующий домен 4-1BB, например, костимулирующий домен 4-1BB человека. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен 4-1BB содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:16, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный костимулирующий домен содержит костимулирующий домен CD28, например, костимулирующий домен CD28 человека. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%,

по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:17.

[283] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR к CD22 содержит сигнальный домен CD3-дзета (ζ), например, сигнальный домен CD3ζ человека. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD3ζ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:18, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:18.

[284] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD22 содержит CD22-специфический scFv, имеющий последовательности, указанные в SEQ ID NO:45 или SEQ ID NO:54, шарнирный домен CD8α SEQ ID NO:9, трансмембранный домен CD8α SEQ ID NO:14, костимулирующий домен 4-1BB SEQ ID NO:16, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID NO:18 и/или их варианты (т.е. имеющие последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 идентичности с раскрытой последовательностью).

[285] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD22 содержит CD22-специфический scFv, имеющий последовательности, указанные в SEQ ID NO:45 или SEQ ID NO:54, шарнирный домен CD28 SEQ ID NO:10, трансмембранный домен CD8α SEQ ID NO:14, костимулирующий домен 4-1BB SEQ ID NO:16, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID NO:18 и/или их варианты (т.е. имеющие последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 идентичности с раскрытой последовательностью).

[286] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD22 содержит CD22-специфический scFv, имеющий последовательности, указанные в SEQ ID NO:45 или SEQ ID NO:54, шарнирный домен IgG4 SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12, трансмембранный домен CD8α SEQ ID NO:14, костимулирующий домен 4-1BB SEQ ID NO:16, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID NO:18 и/или их варианты (т.е. имеющие последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 идентичности с раскрытой последовательностью).

[287] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD22 содержит CD22-специфический scFv, имеющий последовательности, указанные в SEQ ID NO:45 или SEQ ID NO:54, шарнирный домен CD8α SEQ ID NO:9, трансмембранный домен CD28 SEQ ID NO:15, костимулирующий домен 4-1BB SEQ ID NO:16, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID

NO:18 и/или их варианты (т.е. имеющие последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 идентичности с раскрытой последовательностью).

[288] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD22 содержит CD22-специфический scFv, имеющий последовательности, указанные в SEQ ID NO:45 или SEQ ID NO:54, шарнирный домен CD28 SEQ ID NO:10, трансмембранный домен CD28 SEQ ID NO:15, костимулирующий домен 4-1BB SEQ ID NO:16, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID NO:18 и/или их варианты (т.е. имеющие последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 идентичности с раскрытой последовательностью).

[289] В некоторых вариантах осуществления CAR к CD22 содержит CD22-специфический scFv, имеющий последовательности, указанные в SEQ ID NO:45 или SEQ ID NO:54, шарнирный домен IgG4 SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12, трансмембранный домен CD28 SEQ ID NO:15, костимулирующий домен 4-1BB SEQ ID NO:16, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID NO:18 и/или их варианты (т.е. имеющие последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99 идентичности с раскрытой последовательностью).

CAR к BCMA

[290] В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR к BCMA. BCMA является членом семейства рецепторов некроза опухоли (TNFR), экспрессируемым на клетках линии В-клеток, с максимальной экспрессией на терминально дифференцированных В-клетках или зрелых В-лимфоцитах. BCMA участвует в опосредовании выживания плазматических клеток для поддержания долгосрочного гуморального иммунитета. Экспрессия BCMA недавно была связана с рядом раковых заболеваний, таких как множественная миелома, лимфома Ходжкина и неходжкинская лимфома, различные лейкозы и глиобластома. В некоторых вариантах осуществления CAR к BCMA может содержать сигнальный пептид, внеклеточный связывающий домен, который специфически связывает BCMA, шарнирный домен, трансмембранный домен, внутриклеточный костимулирующий домен и/или внутриклеточный сигнальный домен в тандеме.

[291] В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид CAR к BCMA содержит сигнальный пептид CD8α. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид CD8α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:6, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%,

по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит сигнальный пептид IgK. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид IgK содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:7, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит сигнальный пептид GMCSFR-α или CSF2RA. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид GMCSFR-α или CSF2RA содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:8, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:8.

[292] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к BCMA специфичен в отношении BCMA, например, BCMA человека. Внеклеточный связывающий домен CAR к BCMA может быть кодон-оптимизирован в отношении экспрессии в клетке-хозяине или иметь вариантные последовательности для усиления функций внеклеточного связывающего домена.

[293] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен содержит иммуногенно активную часть молекулы иммуноглобулина, например, scFv. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к BCMA происходит от антитела, специфичного к BCMA, включая, например, белантамаб, эрланатамаб, теклистамаб, LCAR-B38M и цилтакабтаген. В любом из этих вариантов осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к BCMA может содержать или состоять из V_H, V_L, и/или одного или более CDR любого из антител.

[294] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к BCMA содержит scFv, полученный из мышиного моноклонального антитела C11D5.3, как описано в Carpenter et al., Clin. Cancer Res. 19(8):2048-2060 (2013). См. также публикацию заявки PCT № WO2010/104949. scFv, полученный из C11D5.3, может содержать вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и вариабельную область легкой цепи (V_L) C11D5.3, соединенные линкером Whitlow, аминокислотные последовательности которого представлены в **таблице 15** ниже. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический внеклеточный связывающий домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 63, 64 или 68, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%,

по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 63, 64 или 68. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен, специфичный в отношении BCMA, может содержать одну или более CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 65-67 и 69-71. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен, специфичный в отношении BCMA, может содержать легкую цепь с одной или более CDR, имеющими аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 65-67. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический внеклеточный связывающий домен может содержать тяжелую цепь с одной или более CDR, имеющими аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 69-71. В любом из этих вариантов осуществления BCMA-специфический scFv может содержать одну или более CDR, содержащих одну или более аминокислотных замен, или содержащих последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с любой из идентифицированных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к BCMA содержит или состоит из одной или более CDR, как описано в данном документе.

[295] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к BCMA содержит scFv, полученный из другого мышиного моноклонального антитела, C12A3.2, как описано в Carpenter et al., Clin. Cancer Res. 19(8):2048-2060 (2013) и публикации заявки PCT № WO2010/104949, аминокислотная последовательность которых также представлена в **таблице 15** ниже. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический внеклеточный связывающий домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 72, 73 или 77, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 72, 73 или 77. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен, специфичный в отношении BCMA, может содержать одну или более CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 74-76 и 78-80. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен, специфичный в отношении BCMA, может содержать легкую цепь с одной или более CDR, имеющими аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 74-76. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический внеклеточный связывающий домен может содержать тяжелую цепь с одной или более CDR, имеющими аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 78-80. В любом из этих вариантов осуществления BCMA-специфический scFv может содержать одну или более

CDR, содержащих одну или более аминокислотных замен, или содержащих последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с любой из идентифицированных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к BCMA содержит или состоит из одной или более CDR, как описано в данном документе.

[296] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к BCMA содержит мышиное моноклональное антитело с высокой специфичностью к BCMA человека, называемый как BB2121 во Friedman et al., Hum. Gene Ther. 29(5):585-601 (2018)). См. также публикацию заявки PCT № WO2012163805.

[297] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к BCMA содержит одиночные вариабельные фрагменты двух тяжелых цепей (VHH), которые могут связываться с двумя эпитопами BCMA, как описано в Zhao et al., J. Hematol. Oncol. 11(1):141 (2018), также называемый LCAR-B38M. См. также публикацию заявки PCT № WO2018/028647.

[298] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к BCMA содержит полностью человеческий вариабельный домен тяжелой цепи (FHVH), как описано в Lam et al., Nat. Commun. 11(1):283 (2020), также называемый FHVH33. См. также публикацию заявки PCT № WO2019/006072. Аминокислотные последовательности FHVH33 и его CDR представлены в **таблице 15** ниже. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический внеклеточный связывающий домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:81, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:81. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен, специфичный в отношении BCMA, может содержать одну или более CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 82-84. В любом из этих вариантов осуществления BCMA-специфический внеклеточный связывающий домен может содержать одну или более CDR, содержащих одну или более аминокислотных замен, или содержащих последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с любой из идентифицированных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к BCMA содержит или состоит из одной или более CDR, как описано в данном документе.

[299] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен

CAR к BCMA содержит scFv, полученный из CT103A (или CAR0085), как описано в патенте США № 11026975 B2, аминокислотная последовательность которого представлена в **таблице 15** ниже. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический внеклеточный связывающий домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 118, 119 или 123, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 118, 119, или 123. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен, специфичный в отношении BCMA, может содержать одну или более CDR, имеющих аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 120-122 и 124-126. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен, специфичный в отношении BCMA, может содержать легкую цепь с одной или более CDR, имеющими аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 120-122. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический внеклеточный связывающий домен может содержать тяжелую цепь с одной или более CDR, имеющими аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 124-126. В любом из этих вариантов осуществления BCMA-специфический scFv может содержать одну или более CDR, содержащих одну или более аминокислотных замен, или содержащих последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с любой из идентифицированных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR к BCMA содержит или состоит из одной или более CDR, как описано в данном документе.

[300] Кроме того, CAR и связывающие вещества, направленные на BCMA, описаны в публикациях заявок США №№ 2020/0246381 A1 и 2020/0339699 A1, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Таблица 15. Иллюстративные последовательности связывающего вещества и компонентов против BCMA

SEQ ID NO:	**Аминокислотная последовательность**	**Описание**
63	DIVLTQSPASLAMSLGKRATISCRASESV SVIGAHLIHWYQQKPGQPPKLLIYLASN LETGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPVEEDD VAIYSCLQSRIFPRTFGGGTKLEIKGSTSG SGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPG ETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGK GLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAF SLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCAL DYSYAMDYWGQGTSVTVSS	Полная последовательность scFv C11D5.3 к BCMA с линкером Whitlow

64	DIVLTQSPASLAMSLGKRATISCRASESV SVIGAHLIHWYQQKPGQPPKLLIYLASN LETGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPVEEDD VAIYSCLQSRIFPRTFGGGTKLEIK	Вариабельная область легкой цепи scFv C11D5.3 к BCMA
65	RASESVSVIGAHLIH	CDR1 легкой цепи scFv C11D5.3 к BCMA
66	LASNLET	CDR2 легкой цепи scFv C11D5.3 к BCMA
67	LQSRIFPRT	CDR3 легкой цепи scFv C11D5.3 к BCMA
68	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTF TDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETR EPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQIN NLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQG TSVTVSS	Вариабельная область тяжелой цепи scFv C11D5.3 к BCMA
69	DYSIN	CDR1 тяжелой цепи scFv C11D5.3 к BCMA
70	WINTETREPAYAYDFRG	CDR2 тяжелой цепи scFv C11D5.3 к BCMA
71	DYSYAMDY	CDR3 тяжелой цепи scFv C11D5.3 к BCMA
72	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESV TILGSHLIYWYQQKPGQPPTLLIQLASNV QTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDV AVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIKGSTSG SGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPG ETVKISCKASGYTFRHYSMNWVKQAPG KGLKWMGRINTESGVPIYADDFKGRFAF SVETSASTAYLVINNLKDEDTASYFCSN DYLYSLDFWGQGTALTVSS	Полная последовательность scFv C12A3.2 к BCMA с линкером Whitlow
73	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESV TILGSHLIYWYQQKPGQPPTLLIQLASNV QTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDV AVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIK	Вариабельная область легкой цепи scFv C12A3.2 к BCMA
74	RASESVTILGSHLIY	CDR1 легкой цепи scFv C12A3.2 к BCMA
75	LASNVQT	CDR2 легкой цепи scFv C12A3.2 к BCMA
76	LQSRTIPRT	CDR3 легкой цепи scFv C12A3.2 к BCMA
77	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTF RHYSMNWVKQAPGKGLKWMGRINTES GVPIYADDFKGRFAFSVETSASTAYLVIN NLKDEDTASYFCSNDYLYSLDFWGQGT ALTVSS	Вариабельная область тяжелой цепи scFv C12A3.2 к BCMA

78	HYSMN	CDR1 тяжелой цепи scFv C12A3.2 к BCMA
79	RINTESGVPIYADDFKG	CDR2 тяжелой цепи scFv C12A3.2 к BCMA
80	DYLYSLDF	CDR3 тяжелой цепи scFv C12A3.2 к BCMA
81	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSG DYIYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKEGTGANSSLADY RGQGTLVTVSS	Полная последовательность FHVH33 к BCMA
82	GFTFSSYA	CDR1 FHVH33 к BCMA
83	ISGSGDYI	CDR2 FHVH33 к BCMA
84	AKEGTGANSSLADY	CDR3 FHVH33 к BCMA
118	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIS SYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQKYDLLTFGGGTKVEIKGSTSGSGK PGSGEGSTKGQLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGL EWIGSISYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGD TILDVWGQGTMVTVSS	Полная последовательность scFv CT103A к BCMA с линкером Whitlow
119	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIS SYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQKYDLLTFGGGTKVEIK	Вариабельная область легкой цепи scFv CT103A к BCMA
120	QSISSY	CDR1 легкой цепи scFv CT103A к BCMA
121	AAS	CDR2 легкой цепи scFv CT103A к BCMA
122	QQKYDLLT	CDR3 легкой цепи scFv CT103A к BCMA
123	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSI SSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSISYSGS TYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARDRGDTILDVWGQGT MVTVSS	Вариабельная область тяжелой цепи scFv CT103A к BCMA
124	GGSISSSSYY	CDR1 тяжелой цепи scFv CT103A к BCMA
125	ISYSGST	CDR2 тяжелой цепи scFv CT103A к BCMA
126	ARDRGDTILDV	CDR3 тяжелой цепи scFv CT103A к BCMA

[301] В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен CAR к BCMA содержит шарнирный домен CD8α, например, шарнирный домен CD8α человека. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен CD8α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:9, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает шарнирный домен CD28, например, шарнирный домен CD28 человека. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:10, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает шарнирный домен IgG4, например, шарнирный домен IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен IgG4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит домен шарнир-Ch2-Ch3 IgG4, например, домен шарнир-Ch2-Ch3 IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления домен шарнир-Ch2- Ch3 IgG4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:13, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:13.

[302] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR к BCMA содержит трансмембранный домен CD8α, например, трансмембранный домен CD8α человека. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD8α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:14, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%,

по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD28, например, трансмембранный домен CD28 человека. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:15, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:15.

[303] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный костимулирующий домен CAR к BCMA содержит костимулирующий домен 4-1BB, например, костимулирующий домен 4-1BB человека. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен 4-1BB содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:16, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный костимулирующий домен содержит костимулирующий домен CD28, например, костимулирующий домен CD28 человека. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:17.

[304] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR к BCMA содержит сигнальный домен CD3-дзета (ζ), например, сигнальный домен CD3ζ человека. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD3ζ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:18, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:18.

[305] В некоторых вариантах осуществления CAR к BCMA содержит любой из BCMA-специфических внеклеточных связывающих доменов, как описано, шарнирный

домен CD8α SEQ ID NO:9, трансмембранный домен CD8α SEQ ID NO:14, костимулирующий домен 4-1BB SEQ ID NO:16, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID NO:18 и/или их варианты (т.е. имеющие последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с раскрытой последовательностью). В любом из этих вариантов осуществления CAR к BCMA может дополнительно содержать сигнальный пептид (например, сигнальный пептид CD8α), как описано.

[306] В некоторых вариантах осуществления CAR к BCMA содержит любой из BCMA-специфических внеклеточных связывающих доменов, как описано, шарнирный домен CD8α SEQ ID NO:9, трансмембранный домен CD8α SEQ ID NO:14, костимулирующий домен CD28 SEQ ID NO:17, сигнальный домен CD3ζ SEQ ID NO:18 и/или их варианты (т.е. имеющие последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с раскрытой последовательностью). В любом из этих вариантов осуществления CAR к BCMA может дополнительно содержать сигнальный пептид, как описано.

[307] В некоторых вариантах осуществления CAR к BCMA кодируется нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:127, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности) идентичности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:127 (см. **таблицу 16**). Кодируемый CAR к BCMA имеет соответствующую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:128, или имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или на 100% идентичности) идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:128, со следующими компонентами: сигнальный пептид CD8α, scFv CT103A (V_L-линкер Whitlow-V_H), шарнирный домен CD8α, трансмембранный домен CD8α, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3ζ.

[308] В некоторых вариантах осуществления CAR к BCMA представляет собой коммерчески доступный вариант CAR к BCMA, включая, например, идекабтаген виклейсел (идекабтаген, также называемый bb2121). Идекабтаген виклейсел содержит CAR к BCMA со следующими компонентами: связывающее вещество BB2121, шарнирный домен CD8α, трансмембранный домен CD8α, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3ζ.

Таблица 16. Иллюстративные последовательности CAR к BCMA

SEQ ID NO:	Последовательность	Описание
127	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctcc acgccgccaggccggacatccagatgacccagtctccatcctccctgt ctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcaga gcattagcagctatttaaattggtatcagcagaaaccagggaaagccc ctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatca aggttcagtggcagtggatctgggacagatttcactctcaccatcagca gtctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcagcaaaaatacgac ctcctcacttttggcggagggaccaaggttgagatcaaaggcagcac cagcggctccggcaagcctggctctggcgagggcagcacaaaggg acagctgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttcg gagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtggctccatcagcagta gtagttactactggggctggatccgccagccccccagggaaggggctg gagtggattgggagtatctcctatagtgggagcacctactacaacccgt ccctcaagagtcgagtcaccatatccgtagacacgtccaagaaccagt tctccctgaagctgagttctgtgaccgccgcagacacggcggtgtact actgcgccagagatcgtggagacaccatactagacgtatggggtcag ggtacaatggtcaccgtcagctcattcgtgcccgtgttcctgcccgcca aacctaccaccaccccctgcccctagacctcccaccccagccccaaca atcgccagccagcctctgtctctgcggcccgaagcctgtagacctgct gccggcggagccgtgcacaccagaggcctggacttcgcctgcgaca tctacatctgggcccctctggccggcacctgtggcgtgctgctgctga gcctggtgatcaccctgtactgcaaccaccggaacaaacggggcag aaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaa ctactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaa gaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcagatccgccgacg cccctgcctaccagcagggacagaaccagctgtacaacgagctgaa cctgggcagacgggaagagtacgacgtgctggacaagcggagagg ccgggaccccgagatgggcggaaagcccagacggaagaacccccc aggaaggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggc ctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggaggcgcggcaagg gccacgatggcctgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggacac ctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccccaga	Иллюстративная нуклеотидная последовательность CAR к BCMA
128	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQKYDLLTFGGGTKVEI KGSTSGSGKPGSGEGSTKGQLQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPG KGLEWIGSISYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDTILD VWGQGTMVTVSSFVPVFLPAKPTTTPAPRPP TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR	Иллюстративная аминокислотная последовательность CAR к BCMA

[309] В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки или пул первичных Т-клеток сконструированы таким образом, чтобы демонстрировать пониженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора по сравнению с немодифицированными первичными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления первичные Т-клетки или пул первичных Т-клеток сконструированы так, чтобы они проявляли пониженную экспрессию CTLA4, PD1 или и CTLA4, и PD1 по сравнению с немодифицированными первичными Т-клетками. Способы генетической модификации клетки, включая Т-клетку, подробно описаны, например, в WO 2016183041, описание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, включая таблицы, приложения, перечень последовательностей и фигуры.

[310] В некоторых вариантах осуществления после введения сконструированных клеток, описанных в данном документе, субъекту-реципиенту или пациенту происходит нежелательная экспансия или пролиферация клеток у реципиента; присутствуют в неподходящем месте в теле реципиента; или подвергаются злокачественной трансформации. В некоторых вариантах осуществления такие сконструированные клетки индуцируют синдром высвобождения цитокинов, индуцируют нейротоксичность; или индуцируют токсичность, такую как целевую внеопухолевую токсичность у реципиента. И после этого субъекту-реципиенту вводят агент, который блокирует, нейтрализует, инактивирует, препятствует связыванию, сигналингу, активности и функции CD47 и SIRPα.

[311] Не желая быть связанными теорией, считается, что модификации сконструированных клеток «маскируют» их от эффекторных клеток иммунной системы реципиента, которые отвечают за удаление инфицированных, злокачественных или чужеродных клеток. «Маскировка» клетки иммунной системой позволяет существовать и выживать специфическим клеткам, например, аллогенным клеткам в организме. В некоторых случаях сконструированные клетки, описанные в данном документе, могут больше не быть терапевтически эффективными или могут вызывать нежелательные побочные эффекты у реципиента. Неограничивающие примеры нежелательных явлений включают гиперпролиферацию, трансформацию, опухолеобразование, синдром высвобождения цитокинов, РТПХ, связанный с иммунными эффекторными клетками синдром нейротоксичности (ICANS), воспаление, инфекцию, тошноту, рвоту, кровотечение, интерстициальный пневмонит, респираторное заболевание, желтуху, потерю массы, диарею, потерю аппетита, судороги, боль в животе, веноокклюзионную болезнь печени (VOD), отторжение трансплантата, поражение органов, бесплодие, гормональные изменения, образование с аномальным ростом, катаракту и посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство (PTLD) и т.п. Таким образом, возможность контролировать присутствие сконструированных клеток в организме реципиента имеет решающее значение для безопасности. Таким образом, «демаскировка» клеток служит защитным переключателем и может быть достигнуто путем блокирования или нейтрализации функции иммуносупрессивного фактора, такого

как CD47.

[312] В некоторых вариантах осуществления при приведении в контакт клеток с блокирующим CD47-SIRPα агентом клетки распознаются иммунной системой реципиента. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки экспрессируют иммуносупрессивный фактор CD47, так что клетки являются гипоиммуногенными или имеют сниженную иммуногенность до тех пор, пока реципиенту не введут один или более блокирующих CD47-SIRP агентовα. В присутствии блокирующего CD47-SIRPα агента клетки демаскируются и распознаются иммунными клетками как мишени для гибели или клиренса клеток.

1. Изменение экспрессии комплексов MHC класса I и/или MHC класса II

[313] В данном документе предложены клетки, содержащие экзогенный белок CD47 и модификацию одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC I и/или человеческих лейкоцитарных антигенов MHC II. В некоторых вариантах осуществления модулируется экспрессия человеческих лейкоцитарных антигенов MHC I или человеческих лейкоцитарных антигенов MHC II. В некоторых вариантах осуществления модулируется экспрессия человеческих лейкоцитарных антигенов MHC I и человеческих лейкоцитарных антигенов MHC II. В некоторых вариантах осуществления клетки генетически модифицированы для снижения или инактивации экспрессии комплекса MHC класса I, для снижения или инактивации экспрессии комплекса MHC класса II, для предотвращения прямого распознавания CD8 T-клетками субъекта-реципиента и/или для ускользания от распознавания NK-клетками субъекта-реципиента. В некоторых вариантах осуществления клетки проявляют сниженную иммуногенность. Подробные описания генетически модифицированных клеток можно найти, например, в WO 2016183041, описание которой включено в данном документ полностью, включая перечень последовательностей, таблицы и фигуры.

[314] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит геномную модификацию одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию белков MHC I и белков MHC II. В определенных вариантах осуществления клетка содержит геномную модификацию одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию белков MHC I или белков MHC II. В некоторых аспектах, система генетического редактирования применяется для модификации одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой одну или более последовательностей, выбранных из группы, включающей B2M, CIITA и NLRC5. В некоторых вариантах осуществления геном клетки был изменен для уменьшения или устранения экспрессии критических компонентов HLA. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает инактивирующую мутацию (например, делецию, добавление или замену).

[315] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетические модификации в генах, выбранных из одного или более генов из группы, включающей B2M, CIITA, NLRC5, B7-1, B7-2, B7-H3, CD27, CD28, CD47, GITR, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, IRF1, NFY-A, NFY-B, PD-L1, PD-L2, NFY-C, OX40, RFX5, RFX-ANK, RFX-AP, TAP1, HVEM, SLAM, LFA-1, ST2, CD2, CD30, CD58, CD74, CD160, CD226, CD244, 4-1BB, BTLA, ICOS, LAG3, HELIOS, TIGIT, TIM3, TLT, VISTA, и лиганды NKG2D. В некоторых вариантах осуществления лиганды NKG2D выбраны из одной или более групп, включающих MICA, MICB, Raetl e, Raetl g, Raetl I, Ulbpl, Ulbp2 и Ulbp3.

[316] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к клетке или ее популяции, содержащей геном, в котором ген был отредактирован для удаления непрерывного участка геномной ДНК, тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию молекул MHC класса I в клетке или ее популяции. В определенных аспектах настоящее изобретение относится к клетке или ее популяции, содержащей геном, в котором ген был отредактирован для удаления непрерывного участка геномной ДНК, тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию молекул MHC класса II в клетке или ее популяции. В конкретных аспектах настоящее изобретение относится к клетке или ее популяции, содержащей геном, в котором один или более генов были отредактированы для удаления непрерывного участка геномной ДНК, тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию молекул MHC класса I и/или MHC класса II в клетке или ее популяции.

[317] В некоторых вариантах осуществления экспрессия молекул MHC I или MHC II модулируется путем нацеливания и удаления непрерывного участка геномной ДНК, тем самым снижая или устраняя экспрессию целевого гена, выбранного из группы, которая включает, но не ограничивается ими, B2M, CIITA и NLRC5.

[318] 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.

i. CIITA

[319] В некоторых аспектах настоящие технологии, описанные в данном документе, модулируют (например, уменьшают, снижают или устраняют) экспрессию генов MHC II путем нацеливания и модулирования (например, уменьшения, снижения или устранения) экспрессии трансактиватора класса II (CIITA). В некоторых аспектах модуляция происходит с использованием системы CRISPR/Cas. CIITA является членом семейства белков богатых лейцином повторов (LRR) LR или нуклеотидсвязывающего домена (NBD) и регулирует транскрипцию MHC II путем связывания с энхансеосомой MHC.

[320] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность, описанная в данном документе, представляет собой вариант CIITA. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность является гомологом CIITA. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность является ортологом CIITA.

[321] В некоторых аспектах снижение или устранение экспрессии CIITA снижает или устраняет экспрессию одного или более из следующих MHC класса II: HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ и HLA-DR.

[322] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген CIITA. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеленная на ген CIITA редкощепящей эндонуклеазой, содержит белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну направляющую последовательность рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген CIITA. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна направляющая последовательность рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген CIITA выбрана из группы, которая включает SEQ ID NO: 5184-36352 из таблицы 12 WO 2016/183041. В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[323] 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 экспрессию белка CIITA определяют с помощью 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).

ii. B2M

[324] В некоторых вариантах осуществления описанный способ по настоящему изобретению модулирует (например, уменьшает, снижает или устраняет) экспрессию генов MHC-I путем нацеливания и модулирования (например, уменьшения, снижения или

устранения) экспрессии вспомогательной цепи B2M. В некоторых аспектах модуляция происходит с использованием системы CRISPR/Cas. За счет модуляции (например, снижения, уменьшения или устранения) экспрессии B2M блокируется направленная миграция молекул MHC-I и клетка становится гипоиммуногенной. В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[325] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность, описанная в данном документе, 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.

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

[327] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген B2M. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеленная на ген B2M редкощепящей эндонуклеазой, содержит белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну направляющую последовательность рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген B2M. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна направляющая последовательность рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген B2M выбрана из группы, которая включает SEQ ID NO:81240-85644 из таблицы 15 WO2016/183041.

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

iii. NLRC5

[329] В некоторых аспектах способы, описанные в данном документе, модулируют (например, уменьшают, снижают или устраняют) экспрессию генов MHC-I путем нацеливания и модулирования (например, уменьшения, снижения или устранения) экспрессии содержащего домен CARD белка 5 семейства NLR/NOD27/CLR16.1 (NLRC5). В некоторых аспектах модуляция происходит с использованием системы CRISPR/Cas. NLRC5 является важным регулятором иммунных ответов, опосредованных MHC-I- и, подобно CIITA, NLRC5 в высокой степени индуцируется IFN-γ и может транслоцироваться в ядро. NLRC5 активирует промоторы генов MHC-I и индуцирует

транскрипцию MHC-I, а также родственных генов, участвующих в презентации антигена MHC-I.

[330] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность, описанная в данном документе, представляет собой вариант NLRC5. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность является гомологом NLRC5. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность является ортологом NLRC5.

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

[332] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген NLRC5. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеленная на ген NLRC5 редкощепящей эндонуклеазой, содержит белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну направляющую последовательность рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген NLRC5. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна направляющая последовательность рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген NLRC5 выбрана из группы, которая включает SEQ ID NO:36353-81239 из таблицы 14 WO2016/183041. В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать иммунный ответ у субъекта-реципиента.

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

[334] В некоторых вариантах осуществления описанные клетки включают модификацию для модуляции экспрессии одной из клеток, выбранных из группы, которая включает CD24, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-ингибитор, IL-10, IL-35, FASL, серпин b9, CCL21, и Mfge8. В некоторых случаях клетка сверхэкспрессирует один или более генов или белков, выбранных из группы, включающей CD24, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-ингибитор, IL-10, IL-35, FASL, серпин b9, CCL21, и Mfge8. В некоторых случаях клетки модифицированы таким образом, что в них снижалась экспрессия одного или более генов или белков, выбранных из группы, включающей CD24, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, тяжелую цепь HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-ингибитор, IL-10, IL-35, FASL, серпин b9, CCL21, и Mfge8.

[335] В некоторых вариантах осуществления описанные клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженную экспрессию молекул MHC класса I. В определенных вариантах осуществления описанные клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженную экспрессию молекул MHC класса II. В еще других вариантах осуществления описанные клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженную экспрессию молекул MHC класса I и MHC класса I.

[336] В некоторых вариантах осуществления описанные клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженную экспрессию B2M. В некоторых вариантах осуществления описанные клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженную экспрессию CIITA. В других вариантах осуществления описанные клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженную экспрессию B2M и CIITA.

[337] В некоторых вариантах осуществления описанные клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, которая включает CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9 и любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления описанные клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47; один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, включающей CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9 и любую их комбинацию; и имеют сниженную экспрессию молекул MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления описанные клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47; один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, включающей CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9 и любую их комбинацию; и имеют сниженную экспрессию молекул MHC класса II. В некоторых вариантах осуществления описанные клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47; один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, которая включает CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9 и любую их комбинацию; и имеют сниженную экспрессию молекул MHC класса I и молекул MHC класса II.

[338] В некоторых вариантах осуществления описанные клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47; один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, включающей CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9 и любую их комбинацию; и имеют сниженную экспрессию B2M. В некоторых вариантах осуществления описанные клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47; один или несколько дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, включающей CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, PD-L1, IDO1,

HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9 и любую их комбинацию; и имеют сниженную экспрессию CIITA. В некоторых вариантах осуществления описанные клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47; один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, включающей CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9 и любую их комбинацию; и имеют сниженную экспрессию NLRC5. В некоторых вариантах осуществления описанные клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47; один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, включающей CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9 и любую их комбинацию; и имеют сниженную экспрессию любого из группы, которая включает: (a) B2M и CIITA; (b) B2M и NLRC5; (c) CIITA и NLRC5; и (d) B2M, CIITA и NLRC5.

2. Изменение экспрессии комплексов TCR

[339] В данном документе предложены клетки, содержащие экзогенный белок CD47 и модификацию одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию комплексов TCR. В некоторых вариантах осуществления модулируется экспрессия белков TCRα или белков TCRβ. В некоторых вариантах осуществления модулируется экспрессия белков TCRα и белков TCRβ. В некоторых вариантах осуществления клетки генетически модифицированы для снижения или инактивации экспрессии одного или более комплексов TCR, для снижения или инактивации экспрессии TCRα, для снижения или инактивации экспрессии TCRβ и/или для снижения иммуногенности. Подробные описания генетически модифицированных клеток можно найти, например, в WO 2016183041, описание которой включено в данном документ полностью, включая перечень последовательностей, таблицы и фигуры.

[340] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит геномную модификацию одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию белков TCRα и белков TCRβ. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит геномную модификацию одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию белков TCRα или белков TCRβ. В некоторых аспектах, система генетического редактирования применяется для модификации одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой одну или более последовательностей, выбранных из группы, включающей TRAC и TRB. В некоторых вариантах осуществления геном клетки был изменен для уменьшения или удаления критических компонентов, связанных с экспрессией TCR, так что была изменена поверхностная экспрессия одного или более комплексов TCR. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает инактивирующую мутацию (например, делецию, добавление или замену).

i. TRAC

[341] В определенных вариантах осуществления технологии, описанные в данном документе, модулируют (например, снижают или устраняют) экспрессию генов TCR, включая ген TRAC, путем нацеливания и модулирования (например, снижения или устранения) экспрессии константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора. В некоторых аспектах модуляция происходит с использованием системы CRISPR/Cas. Путем модулирования (например, уменьшения или устранения) экспрессии TRAC, в клетке, модулируемой в соответствии с технологиями, описанными в данном документе, блокируется перенос молекул TCR на поверхность. В некоторых вариантах осуществления клетка, геном которой был сконструирован для модулирования экспрессии генов TCR, включая ген TRAC, также обладает сниженной способностью индуцировать иммунный ответ у субъекта-реципиента. В некоторых вариантах осуществления экспрессия одного или более комплексов TCR изменена в клетке с модулированной экспрессией гена TRAC.

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

[343] В некоторых аспектах снижение или устранение экспрессии TRAC снижает или устраняет поверхностную экспрессию TCR. Таким образом, экспрессия одного или более комплексов TCR снижена по сравнению с экспрессией в немодифицированной клетке.

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

[345] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген TRAC. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеленная на ген TRAC редкощепящей эндонуклеазой, содержит белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну направляющую последовательность рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген TRAC. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна направляющая последовательность рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген TRAC выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 532-609 и 9102-9797 из US 20160348073, которая

включена в данный документ посредством ссылки.

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

ii. TRB

[347] В определенных вариантах осуществления технологии, описанные в данном документе, модулируют (*например*, снижают или устраняют) экспрессию генов TCR, включая ген, кодирующий рецептор Т-клеточного антигена, бета-цепь (*например*, ген TRB или TCRB) путем нацеливания и модулирования (*например*, снижения или устранения) экспрессии константной области бета-цепи Т-клеточного рецептора. В некоторых аспектах модуляция происходит с использованием системы CRISPR/Cas. Путем модулирования (например, уменьшения или устранения) экспрессии TRB, в клетке, модулируемой в соответствии с технологиями, описанными в данном документе, блокируется перенос молекул TCR на поверхность. В некоторых вариантах осуществления клетка, геном которой был сконструирован для модулирования экспрессии генов TCR, включая ген TRB, также обладает сниженной способностью индуцировать иммунный ответ у субъекта-реципиента. В некоторых вариантах осуществления экспрессия одного или более комплексов TCR изменена в клетке с модулированной экспрессией гена TRB.

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

[349] В некоторых аспектах снижение или устранение экспрессии TRB снижает или устраняет поверхностную экспрессию TCR. Таким образом, экспрессия одного или более комплексов TCR снижена по сравнению с экспрессией в немодифицированной клетке.

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

белка и генного локуса TRB можно найти в GenBank № L36092.2, Uniprot № P0DSE2 и HGNC Ref. США № 12155.

[351] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммуногенные клетки содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген TRB. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеленная на ген TRB редкощепящей эндонуклеазой, содержит белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну направляющую последовательность рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген TRB. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна направляющая последовательность рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген TRB выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 610-765 и 9798-10532 из US 20160348073, которая включена в данный документ посредством ссылки.

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

[353] В данном документе предложены клетки, которые сконструированы для снижения экспрессии или устранения экспрессии человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или МНС класса II, снижения экспрессии или устранения экспрессии комплексов TCR и повышения экспрессии CD47 по сравнению с соответствующими клетками дикого типа или немодифицированными клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки также экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых случаях CAR представляет собой CD19-специфический CAR. В некоторых вариантах осуществления CD19-специфический CAR демонстрирует по существу аналогичную структуру и/или функцию CAR, экспрессируемому в клетках тисагенлеклейсела или его биоаналога или суррогата. В некоторых аспектах клетки включают генетическую модификацию одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из генов B2M, CIITA, TRAC и TRB. В некоторых вариантах осуществления генетические модификации вводят в гены B2M и CIITA. В некоторых вариантах осуществления генетические модификации вводят в гены B2M, CIITA и TRAC. В некоторых вариантах осуществления генетические модификации вводят в гены B2M, CIITA и TRB. В некоторых вариантах осуществления генетические модификации вводят в гены B2M, CIITA, TRAC и TRB. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$ клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRB^{-/-}$ клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRB^{-/-}$

клетки.

[354] Во многих аспектах клетки включают генетическую модификацию одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из генов B2M, CIITA, TRAC и TRB, и сверхэкспрессируют CD47. В некоторых вариантах осуществления клетки сверхэкспрессируют CD47 и несут генетические модификации, введенные в гены B2M и CIITA. В некоторых вариантах осуществления клетки сверхэкспрессируют CD47 и несут генетические модификации, введенные в гены B2M, CIITA и TRAC. В некоторых вариантах осуществления клетки сверхэкспрессируют CD47 и несут генетические модификации, введенные в гены B2M, CIITA и TRB. В некоторых вариантах осуществления клетки сверхэкспрессируют CD47 и несут генетические модификации, введенные в гены B2M, CIITA, TRAC и TRB. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, CD47tg клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRB^{-/-}$, CD47tg клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRB^{-/-}$, CD47tg клетки. В некоторых вариантах осуществления экспрессия экзогенного CD47 описанными клетками контролируется конститутивным промотором или индуцируемым промотором.

[355] Во многих аспектах клетки включают генетическую модификацию одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из генов B2M, CIITA, TRAC и TRB, и сверхэкспрессируют CD47 и CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки сверхэкспрессируют CD47 и CAR и несут генетические модификации, введенные в гены B2M и CIITA. В некоторых вариантах осуществления клетки сверхэкспрессируют CD47 и CAR и несут генетические модификации, введенные в гены B2M, CIITA и TRAC. В некоторых вариантах осуществления клетки сверхэкспрессируют CD47 и CAR и несут генетические модификации, введенные в гены B2M, CIITA и TRB. В некоторых вариантах осуществления клетки сверхэкспрессируют CD47 и CAR, и несут генетические модификации, введенные в гены B2M, CIITA, TRAC и TRB. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, CD47tg клетки, которые также экспрессируют химерные антигенные рецепторы. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRB^{-/-}$, CD47tg клетки, которые также экспрессируют химерные антигенные рецепторы. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$, $TRAC^{-/-}$, $TRB^{-/-}$, CD47tg клетки, которые также экспрессируют химерные антигенные рецепторы.

[356] В некоторых вариантах осуществления экспрессия CAR контролируется конститутивным промотором или индуцируемым промотором. В некоторых вариантах осуществления экспрессия экзогенного CD47 описанными клетками контролируется конститутивным промотором или индуцируемым промотором. В некоторых вариантах осуществления экспрессия CAR и CD47 контролируется одним промотором. Во многих вариантах осуществления экспрессия CAR и CD47 контролируется двумя промоторами. В некоторых вариантах осуществления экспрессия CAR контролируется первым

промотором, а CD47 контролируется вторым промотором, так что первый промотор и второй промотор представляют собой промоторы одного типа. В других случаях первый промотор и второй промотор представляют собой разные типы промоторов. В некоторых случаях уровень экспрессии CAR клеткой выше (например, на 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300% или более), чем уровень экспрессии CD47. В некоторых случаях уровень экспрессии CD47 (например, экзогенного CD47) клеткой выше (например, на 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300% или более выше) чем уровень экспрессии CAR. Во многих случаях уровни экспрессии CAR и экзогенного CD47 по существу одинаковы.

III. Первичные клетки: Получение, конструирование, дифференцировка, трансплантация

[357] В настоящее время присутствуют компоненты, содержащие композицию для модулирования популяции клеток, включая первичные клетки и непервичные клетки, содержащие одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих CD47, и, необязательно, другие белки, включающие введение блокирующего CD47-SIRPα агента субъекту, где популяция клеток ранее вводили или трансплантировали субъекту. В некоторых вариантах осуществления первичные клетки включают клетки, которые можно дифференцировать в другие непервичные типы клеток. В некоторых вариантах осуществления первичные клетки являются плюрипотентными. В некоторых вариантах осуществления первичные клетки включают плюрипотентные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления первичные клетки представляют собой первичные клетки человека. В некоторых вариантах осуществления первичные клетки человека представляют собой плюрипотентные стволовые клетки человека (hPSC). В некоторых вариантах осуществления непервичные клетки представляют собой непервичные клетки человека.

[358] Терапевтические клетки, включая плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки, первичные клетки и первичные Т-клетки, могут быть сконструированы таким образом, чтобы экспрессировать регуляторные белки иммунной системы и избегать отторжения иммунной системой реципиента. Таким образом, такие клетки имеют большие перспективы для применения в аллогенной клеточной терапии. В некоторых аспектах клетки согласно настоящей технологии содержат иммуносупрессивные (например, иммуногенные) факторы, которые функционируют для подавления иммунного ответа реципиента на привитые клетки. В некоторых вариантах осуществления введение агента, блокирующего CD47-SIRPα, реципиенту способствует фагоцитозу, клиренсу клеток и/или гибели этих клеток и их производных (например, клеток-потомков). В некоторых аспектах блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой агент, который нейтрализует, блокирует, антагонизирует или препятствует экспрессии CD47, SIRPα или того и другого на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент ингибирует или блокирует взаимодействие с CD47, SIRPα или с обоими. Такие блокирующие CD47-SIRPα агенты полезны в качестве защитных переключателей для модулирования активности введенных

или привитых клеток, тем самым повышая безопасность этих препаратов на основе клеток.

[359] В данном документе предложены способы применения блокирующего CD47-SIRPα агента для уменьшения количества клеток, экспрессирующих CD47, (например, клеток, экспрессирующих CD47, которые были внесены или введены пациенту). Также предложены клетки и полученные из них клетки (например, плюрипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки из плюрипотентных стволовых клеток, первичные Т-клетки и их потомство), экспрессирующие CD47. В некоторых вариантах осуществления клетки содержат экзогенно экспрессируемый CD47. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки, описанные в данном документе, вводят субъекту-реципиенту, а затем эти сконструированные клетки становятся мишенями для уничтожения и/или клиренса иммунной системой субъекта-реципиента после введения субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента.

[360] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, подвергаются отторжению клетками врожденного иммунитета после того, как субъекту-реципиенту вводят блокирующий CD47-SIRPα агент. В некоторых случаях клетки, экспрессирующие иммуносупрессивный фактор (например, CD47), не подвержены опосредованному NK-клетками лизису до введения блокирующего CD47-SIRPα агента. В некоторых случаях клетки не подвержены поглощению макрофагами до введения блокирующего CD47-SIRPα агента. В некоторых вариантах осуществления клетки можно использовать в качестве источника универсально совместимых клеток или тканей (например, универсальных донорских клеток или тканей), которые могут быть трансплантированы субъекту-реципиенту без необходимости применения иммунодепрессантов. Такие клетки сохраняют клеточно-специфические характеристики и признаки при трансплантации.

[361] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены клетки и/или полученные из них дифференцированные клетки, которые избегают иммунного отторжения у несовместимого по MHC аллогенного реципиента. В некоторых случаях клетки, экспрессирующие CD47, и их потомство, включая трансплантированные клетки, экспрессирующие CD47, и любое потомство (например, прямое или непрямое потомство клеток), могут уклоняться от иммунного распознавания субъектом-реципиентом. В некоторых вариантах осуществления клетки и/или дифференцированные клетки, полученные из таких клеток, являются гипоиммуногенными. Как таковые, клетки и их потомство могут уклоняться от распознавания иммунной системой и не вызывать иммунного ответа у субъекта-реципиента. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки, полученные из стволовых клеток, описанных в данном документе, избегают иммунного отторжения при введении (например, при трансплантации или пересадке) несовместимому по MHC аллогенному реципиенту. В некоторых вариантах осуществления клетки и/или дифференцированные клетки,

полученные из таких клеток, являются гипоиммуногенными.

А. Получение первичных и/или дифференцированных клеток

[362] В настоящем изобретении предложены способы получения сконструированных клеток, содержащих экзогенно экспрессируемый CD47. В некоторых вариантах осуществления клетки включают плюрипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные клетки и клетки, полученные из первичных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки включают тип клеток, выбранный из группы, которая включает сердечные клетки, нервные клетки, эндотелиальные клетки, Т-клетки, островковые клетки поджелудочной железы, клетки пигментного эпителия сетчатки, гепатоциты, клетки щитовидной железы, клетки кожи, клетки крови и эпителиальные клетки. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки или их потомство представляют собой клетки любого органа или ткани организма, включая, помимо прочего, сердце, головной мозг, кожу, глаз, поджелудочную железу, мочевой пузырь, селезенку, печень, легкие, почки, щитовидную железу, сердечно-сосудистую систему, дыхательную систему, нервную систему и иммунную систему. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки дифференцируют в клетки любого органа или ткани организма с использованием определенных условий дифференцировки.

[363] В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают первичные клетки, полученные с использованием способов, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает плюрипотентные стволовые клетки, полученные с использованием способа, известного специалистам в данной области техники. Получение индуцированных мышами и человеком плюрипотентных стволовых клеток (обычно называемых иПСК; миПСК для мышиных клеток или чиПСК для клеток человека) в целом известно в данной области техники. Как будет понятно специалистам в данной области техники, существует множество различных способов получения иПСК. Первоначальную индукцию проводили из эмбриональных или взрослых фибробластов мыши с использованием вирусного введения четырех факторов транскрипции: Oct3/4, Sox2, c-Myc и Klf4; см. Takahashi and Yamanaka, Cell, 126:663-676 (2006), который полностью включен в данный документ посредством ссылки и конкретно в отношении описанных в нем методов. С тех пор был разработан ряд методов; 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 чиПСК (смотрите, например, главу 3 последней ссылки).

[364] Как правило, иПСК получают транзиентной экспрессией одного или более факторов перепрограммирования в клетке-хозяине, как правило, вводимых с

использованием эписомальных векторов. В этих условиях небольшое количество клеток индуцируется для их преобразования в иПСК (в целом, эффективность этой стадии низка, поскольку не используются маркеры селекции). Как только клетки «перепрограммированы» и становятся плюрипотентными, они теряют эписомальный вектор(-ы) и продуцируют факторы, используя эндогенные гены.

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

[366] В некоторых вариантах осуществления используют один перепрограммирующий фактор, OCT4. В других вариантах осуществления используют два перепрограммирующих фактора, OCT4 и KLF4. В других вариантах осуществления используются три фактора перепрограммирования: OCT4, KLF4 и SOX2. В других вариантах осуществления используются четыре фактора перепрограммирования: OCT4, KLF4, SOX2 и c-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. Как правило, эти гены факторов перепрограммирования представлены в эписомальных векторах, те таких как известные в данной области техники и коммерчески доступные.

[367] В общем случае, как известно в данной области техники, иПСК 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.

[368] После образования гипоиммуногенных плюрипотентных стволовых клеток их можно поддерживать в недифференцированном состоянии, как известно для поддержания иПСК. 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.

В. Конструирование первичных и/или дифференцированных клеток

[369] Предлагаемые способы применимы для инактивации или удаления одного или более генов в клетках, таких как, но не ограничиваясь ими, плюрипотентные стволовые клетки, их дифференцированные клетки, первичные Т-клетки и т.п. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат генетическую модификацию для снижения или устранения поверхностной экспрессии любого компонента комплекса MHC класса I и/или любого компонента комплекса MHC класса I.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат генетическую модификацию гена, кодирующего B2M. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат генетическую модификацию гена, кодирующего CIITA. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат генетическую модификацию гена, кодирующего NLRC5. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат генетическую модификацию гена, кодирующего цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4 (CTLA4). В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки содержат генетическую модификацию гена, кодирующего белок программируемой смерти клеток 1 (PD1). Подробные описания генетически модифицированных Т-клеток можно найти, например, в WO2016160721, описание которой полностью включено в данный документ, включая перечень последовательностей, таблицы и фигуры.

[370] В некоторых вариантах осуществления технологии редактирования генома с использованием редкощепящих эндонуклеаз (например, системы CRISPR/Cas, TALEN, нуклеаз с цинковыми пальцами, мегануклеаз и хоминг эндонуклеаз) также используются для снижения или устранения экспрессии критических генов иммунной системы (например, путем удаления геномной ДНК критических генов иммунной системы) в стволовых клетках человека. В некоторых вариантах осуществления технологии редактирования генома или другие технологии модуляции генов используются для введения факторов, индуцирующих толерантность, в клетки человека, превращая их и полученные из них дифференцированные клетки в гипоиммуногенные клетки (или клетки со сниженной иммуногенностью). Таким образом, гипоиммуногенные клетки снижают или устраняют экспрессию MHC I и/или MHC II. В некоторых вариантах осуществления клетки являются неиммуногенными (например, не индуцируют иммунный ответ) у субъекта-реципиента. В некоторых вариантах осуществления клетки имеют сниженную иммуногенность (например, пониженную вероятность индукции иммунного ответа) у субъекта-реципиента.

[371] 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).

[372] В практике конкретных вариантов осуществления можно применять, если специально не указано иное, обычные методы химии, биохимии, органической химии, молекулярной биологии, микробиологии, методов рекомбинантной ДНК, генетики, иммунологии и клеточной биологии, которые находятся в пределах компетенции

специалистов в данной области техники, многие из которых описаны ниже с целью иллюстрации. Такие технологии подробно описаны в литературе. См., например, Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition, 2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, updated July 2008); Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) Current Protocols in Immunology Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); Annual Review of Immunology; а также монографии в таких журналах, как Advances in Immunology.

[373] В некоторых вариантах осуществления редкощепящую эндонуклеазу вносят в клетку, содержащую целевую полинуклеотидную последовательность, в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей редкощепящую эндонуклеазу. Процесс несения нуклеиновых кислот в клетки можно осуществлять любым подходящим способом. Подходящие методы включают трансфекцию, опосредованную фосфатом кальция или липидами, электропорацию и трансдукцию или инфекцию с применением 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 содержит модифицированную мРНК, как описано в данном документе (например, синтетическую модифицированную мРНК).

[374] В настоящем изобретении предложено изменение целевых полинуклеотидных последовательностей полинуклеотидов любым способом, доступным специалисту в данной области техники, с использованием системы CRISPR/Cas. Можно использовать любую систему CRISPR/Cas, способную изменять целевую полинуклеотидную последовательность в клетке. Такие системы CRISPR-Cas могут использовать различные белки Cas (Haft et al. PLoS Comput Biol.; 2005; 1(6)e60). Молекулярный механизм таких белков Cas, который позволяет системе CRISPR/Cas изменять целевые полинуклеотидные последовательности в клетках, включает РНК-связывающие белки, эндо- и экзонуклеазы, геликазы и полимеразы. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR типа I. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR типа II. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR типа V.

[375] Системы CRISPR/Cas, как правило, содержат как минимум два компонента: одну или более направляющих РНК (нРНК) и белок Cas. Белок Cas представляет собой нуклеазу, которая вводит двухцепочечный разрыв в целевой сайт. Системы CRISPR-Cas делятся на два основных класса: в системах класса 1 используется комплекс нескольких белков Cas для деградации нуклеиновых кислот; в системах класса 2 используется один большой белок Cas для той же цели. Класс 1 подразделяют на типы I, III и IV; класс 2 подразделяют на типы II, V и VI. Различные белки Cas, адаптированные для применения в редактировании генов, включают, помимо прочего, Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a (Cpf1), Cas12b (C2c1), Cas12c (C2c3), Cas12d. (CasY), Cas12e (CasX), Cas12f (C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k (C2c5), Cas13, Cas13a (C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3 и Mad7. См., например, Jinek et al., Science (2012) 337 (6096):816-821; Dang et al., Genome Biology (2015) 16:280; Ran et al., Nature (2015) 520:186-191; Zetsche et al., Cell (2015) 163:759-771; Strecker et al., Nature Comm. (2019) 10:212; Yan et al., Science (2019) 363:88-91. Наиболее широко используемый Cas9 представляет собой белок Cas типа II и описан в данном документе в качестве иллюстрации. Эти белки Cas могут быть получены из разных исходных видов. Например, Cas9 может быть получен из S. pyogenes или S. aureus.

[376] В исходном микробном геноме система CRISPR типа II включает последовательности из внедряющейся ДНК между повторяющимися последовательностями CRISPR, закодированными в виде массивов в геноме хозяина. Транскрипты из массивов повторов CRISPR процессируются в CRISPR РНК (crРНК), каждая из которых содержит вариабельную последовательность, транскрибированную с внедряющейся ДНК, известную как последовательность «протоспейсера», а также часть повтора CRISPR. Каждая crРНК гибридизуется со второй трансактивирующей CRISPR РНК (tracrРНК), и эти две РНК образуют комплекс с нуклеазой Cas9. Кодируемая протоспейсером часть crРНК направляет комплекс Cas9 на расщепление комплементарных целевых последовательностей ДНК при условии, что они примыкают к коротким последовательностям, известным как «мотивы, примыкающие к протоспейсеру» (PAM).

[377] Хотя предшествующее описание было сосредоточено на нуклеазе Cas9, следует понимать, что существуют другие РНК-направляемые нуклеазы, которые используют нРНК, отличающиеся некоторым образом от описанных до сих пор. Например, Cpf1 (CRISPR от Prevotella и Franciscella 1; также известная как Cas12a) представляет собой РНК-направляемую нуклеазу, для функционирования которой требуется только crРНК и не требуется tracrРНК.

[378] С момента своего открытия система CRISPR была адаптирована для индукции специфичных к последовательности двухцепочечных разрывов и целенаправленного редактирования генома в широком диапазоне клеток и организмов, от бактерий до эукариотических клеток, включая клетки человека. При ее применении в

редактировании генов искусственно сконструированные синтетические нРНК заменили исходные комплексы crРНК:tracrРНК, в том числе в некоторых вариантах осуществления с помощью одной нРНК. Например, нРНК могут представлять собой одиночные направляющие РНК (онРНК), состоящие из crРНК, тетрапетли и tracrРНК. crРНК, как правило, содержит комплементарную область (также называемую спейсером, как правило, длиной около 20 нуклеотидов), созданную пользователем для распознавания представляющей интерес целевой ДНК. Последовательность tracrРНК содержит каркасную область для связывания нуклеазой Cas. Последовательность crРНК и последовательность tracrРНК связаны тетрапетлей, и каждая из них имеет короткую повторяющуюся последовательность для гибридизации друг с другом, таким образом создавая химерную онРНК. Можно изменить геномную мишень нуклеазы Cas, просто изменив последовательность спейсера или комплементарной области, которая присутствует в гРНК. Комплементарная область будет направлять нуклеазу Cas к целевому сайту ДНК с помощью стандартных правил спаривания комплементарных оснований РНК-ДНК.

[379] Для того чтобы нуклеаза Cas могла функционировать, в геномной ДНК должен быть PAM, расположенный ниже целевой последовательности. Считается, что распознавание PAM белком Cas дестабилизирует соседнюю геномную последовательность, позволяя исследовать последовательность с помощью нРНК и приводя к спариванию нРНК-ДНК, когда присутствует совпадающая последовательность. Конкретная последовательность PAM варьируется в зависимости от вида, которому принадлежит ген Cas. Например, наиболее часто используемая нуклеаза Cas9, полученная из S. pyogenes, распознает последовательность PAM 5’-NGG-3’ или, с меньшей эффективностью, 5’-NAG-3’, где «N» может быть любым нуклеотидом. Другие варианты нуклеазы Cas с альтернативными PAM также были охарактеризованы и успешно использованы для редактирования генома, которые приведены в **таблице 17** ниже.

Таблица 17. Иллюстративные варианты нуклеазы Cas и их последовательности PAM

Нуклеаза CRISPR	**Организм-источник**	**Последовательность PAM (5’→3’)**
SpCas9	Streptococcus pyogenes	ngg или nag
SaCas9	Staphylococcus aureus	ngrrt или ngrrn
NmeCas9	Neisseria meningitidis	nnnngatt
CjCas9	Campylobacter jejuni	nnnnryac
StCas9	Streptococcus thermophilus	nnagaaw
TdCas9	Treponema denticola	naaaac
LbCas12a (Cpf1)	Lachnospiraceae bacterium	tttv
AsCas12a (Cpf1)	Acidaminococcus sp.	tttv

AacCas12b	Alicyclobacillus acidiphilus	ttn
BhCas12b v4	Bacillus hisashii	attn, tttn, или gttn

r=a или g; y=c или t; w=a или t; v=a или c, или g; n=любое основание

[380] В некоторых вариантах осуществления нуклеазы Cas могут содержать одну или более мутаций для изменения их активности, специфичности, распознавания и/или других характеристик. Например, нуклеаза Cas может иметь одну или более мутаций, которые изменяют ее точность для смягчения нецелевых эффектов (например, высокоточные варианты SpCas9 eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, HeFSpCas9 и evoSpCas9). В качестве другого примера, нуклеаза Cas может иметь одну или более мутаций, которые изменяют ее специфичность PAM.

[381] В некоторых вариантах осуществления предложены клетки-хозяева или их композиции, имеющие геномный локус, модифицированный любой из описанных систем редактирования генов. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация осуществляется с использованием сайт-направленной нуклеазы, выбранной из группы, состоящей из Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a (Cpf1), Cas12b (C2c1), Cas12c (C2c3), Cas12d (CasY), Cas12e (CasX), Cas12f (C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k (C2c5), Cas13, Cas13a (C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, нуклеаз с «цинковыми пальцами» (ZFN), нуклеаз на основе эффектора, подобного активатору транскрипции, (TALEN), мегануклеаз и CRISPR-ассоциированных транспозаз. В некоторых из этих вариантов осуществления модифицированный геномный локус представляет собой локус B2M, локус CIITA, локус TRAC, локус TRBC или локус «безопасная гавань». Неограничивающие примеры локуса «безопасная гавань» включают, но не ограничиваются ими, локус гена AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26, и SHS231.

[382] нРНК для применения в редактировании CRISPR содержат последовательность crРНК, которая, в свою очередь, содержит комплементарную область (также называемую спейсером), которая распознает и связывает представляющую интерес целевую комплементарную ДНК. Длина спейсера или комплементарной области, как правило, составляет от 15 до 30 нуклеотидов, как правило, около 20 нуклеотидов, хотя может варьироваться в зависимости от требований конкретной системы CRISPR/Cas. В определенных вариантах осуществления спейсер или комплементарная область полностью комплементарна целевой последовательности ДНК. В других вариантах осуществления спейсер частично комплементарен целевой последовательности ДНК, например комплементарен по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%.

[383] В определенных вариантах осуществления нРНК, указанные в данном документе, дополнительно содержат последовательность tracrРНК, которая содержит каркасную область для связывания с нуклеазой. Длина и/или последовательность tracrРНК может варьироваться в зависимости от конкретной нуклеазы, используемой для редактирования. В определенных вариантах осуществления для связывания нуклеазы с

помощью нРНК не требуется последовательность tracrРНК. В тех вариантах осуществления, где нРНК содержит tracrРНК, последовательность crРНК может дополнительно содержать область повторов для гибридизации с комплементарными последовательностями tracrРНК.

[384] В некоторых вариантах осуществления нРНК, представленные в данном документе, содержат две или более молекул нРНК, например, crРНК и tracrРНК, в виде двух отдельных молекул. В других вариантах осуществления нРНК представляют собой одиночные направляющие РНК (онРНК), включая онРНК, содержащие crРНК и tracrРНК в одной молекуле РНК. В некоторых из этих вариантов осуществления crРНК и tracrРНК связаны промежуточной тетрапетлей.

[385] В некоторых вариантах осуществления одну нРНК можно использовать в сочетании с сайт-направленной нуклеазой для целенаправленного редактирования представляющего интерес локуса гена. В других вариантах осуществления две или более нРНК, нацеленные на один и тот же представляющий интерес локус гена, можно использовать в сочетании с сайт-направленной нуклеазой.

[386] В некоторых вариантах осуществления иллюстративные нРНК (например, онРНК) для применения с различными распространенными нуклеазами Cas, для которых требуются как crРНК, так и tracrРНК, включая Cas9 и Cas12b (C2c1), представлены в **таблице 18**. См., например, Jinek et al., Science (2012) 337 (6096):816-821; Dang et al., Genome Biology (2015) 16:280; Ran et al., Nature (2015) 520:186-191; Strecker et al., Nature Comm. (2019) 10:212. Для каждого иллюстративного нРНК показаны последовательности для различных частей нРНК, включая комплементарную область или спейсер, область повторов crРНК, тетрапетлю и tracrРНК. В некоторых вариантах осуществления нРНК содержит все или часть нуклеотидных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 94-97. В некоторых вариантах осуществления нРНК содержит все или часть нуклеотидных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 98-101. В некоторых вариантах осуществления нРНК содержит все или часть нуклеотидных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 102-105. В некоторых вариантах осуществления нРНК содержит все или часть нуклеотидных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 106-109.

[387] В некоторых вариантах осуществления нРНК содержит область повторов crРНК, содержащую, состоящую или по существу состоящую из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:103 или SEQ ID NO:108. В некоторых вариантах осуществления нРНК содержит тетрапетлю, содержащую, состоящую из или по существу состоящую из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO:96 или SEQ ID NO:107. В некоторых вариантах осуществления нРНК содержит tracrРНК, содержащую, состоящую или по существу состоящую из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:105 или SEQ ID NO:106.

Таблица 18. Иллюстративная структура и последовательность нРНК для CRISPR/Cas

SEQ ID NO:	Последовательность (5'→3')	Описание
94	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	Иллюстративная комплементарная область (спейсер) spCas9 1
95	guuuuagagcua	Иллюстративная область повторов crРНК spCas9 1
96	gaaa	Иллюстративная тетрапетля spCas9 1
97	uagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcuuuuuu	Иллюстративная tracrРНК spCas9 1
98	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	Иллюстративная комплементарная область (спейсер) spCas9 2
99	guuusagagcuaugcug	Иллюстративная область повторов crРНК spCas9 2
100	gaaa	Иллюстративная тетрапетля spCas9 2
101	cagcauagcaaguusaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcuuuuuu	Иллюстративная tracrРНК spCas9 2
102	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	Иллюстративная комплементарная область (спейсер) saCas9
103	guuuuaguacucug	Иллюстративная область повторов crРНК saCas9
104	gaaa	Иллюстративная тетрапетля saCas9
105	cagaaucuacuaaaacaaggcaaaaugccguguuuaucucgucaacuuguuggcgagauuuuuu	Иллюстративная tracrРНК saCas9
106	gucgucuauaggacggcgaggacaacgggaagugccaaugugcucuuuccaagagcaaacaccccguuggcuucaagaugaccgcucg	Иллюстративная tracrРНК AkCas12b
107	aaaa	Иллюстративная тетрапетля AkCas12b
108	cgagcggucugagaaguggcacu	Иллюстративная область повторов crРНК AkCas12b
109	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	Иллюстративная комплементарная область (спейсер)

		AkCas12b

s=c или g; n=любое основание

[388] В некоторых вариантах осуществления нРНК содержит комплементарную область, специфичную для представляющего интерес локуса гена-мишени, например, локуса B2M, локуса CIITA, локуса TRAC, локуса TRBC или локуса «безопасная гавань», выбранного из группы, состоящей из локус гена AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 и SHS231. Комплементарная область может связывать последовательность в любой области локуса гена-мишени, включая, например, CDS, экзон, интрон, последовательность, охватывающую часть экзона и часть соседнего интрона, или регуляторную область (например, промотор, энхансер). Если целевая последовательность представляет собой CDS, экзон, интрон или последовательность, охватывающую части экзона и интрона, CDS, экзон, интрон или границу экзона/интрона можно определить в соответствии с любым сплайс-вариантом гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления геномный локус, на который нацелена нРНК, расположен в пределах 4000 п.н., 3500 п.н., 3000 п.н., 2500 п.н., 2000 п.н., 1500 п.н., 1000 п.н. или 500 п.н. любого из локусов или их областей, как описано. Кроме того, в данном документе представлены композиции, содержащие одну или более нРНК, представленных в данном документе, и белок Cas или нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cas. В некоторых из этих вариантов осуществления одна или более нРНК и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок Cas, содержатся в векторе, например, вирусном векторе.

[389] В некоторых вариантах осуществления нРНК, используемые в данном документе для сайт-направленной вставки трансгена, содержат комплементарную область, которая распознает целевую последовательность в AAVS1. В некоторых из этих вариантов осуществления целевая последовательность расположена в интроне 1 AAVS1. AAVS1 расположен на хромосоме 19: обратная цепь 55090918-55117637, а интрон 1 AAVS1 (на основе транскрипта ENSG00000125503) расположен на хромосоме 19: обратная цепь 55117222-55112796. В определенных вариантах осуществления нРНК нацелены на локус генома в пределах 4000 п.н., 3500 п.н., 3000 п.н., 2500 п.н., 2000 п.н., 1500 п.н., 1000 п.н. или 500 п.н. от сайта, расположенного в любом месте хромосомы 19: 55117222-55112796. В определенных вариантах осуществления нРНК нацелены на локус генома в пределах 4000 п.н., 3500 п.н., 3000 п.н., 2500 п.н., 2000 п.н., 1500 п.н., 1000 п.н. или 500 п.н. от хромосомы 19: 55115674. В некоторых вариантах осуществления нРНК сконфигурирована для образования сайта рестрикции на хромосоме 19: 55115674 или в пределах 5, 10, 15, 20, 30, 40 или 50 нуклеотидов хромосомы 19: 55115674. В некоторых вариантах осуществления нРНК представляет собой GET000046, также известную как «sgAAVS1-1», описанную в Li et al., Nat. Methods 16:866-869 (2019). Эта нРНК содержит комплементарную область, содержащую, состоящую или по существу состоящую из последовательности нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:110, и нацелена на интрон 1 AAVS1 (также известный как PPP1R12C).

[390] В некоторых вариантах осуществления нРНК, используемые в данном документе для сайт-направленной вставки трансгена, содержат комплементарную область, которая распознает целевую последовательность в CLYBL. В некоторых из этих вариантов осуществления целевая последовательность расположена в интроне 2 CLYBL. CLYBL расположен на хромосоме 13: прямая цепь 99606669-99897134, а интрон 2 CLYBL (на основе транскрипта ENST00000376355.7) расположен на хромосоме 13: прямая цепь 99773011-99858860. В определенных вариантах осуществления нРНК нацелены на локус генома в пределах 4000 п.н., 3500 п.н., 3000 п.н., 2500 п.н., 2000 п.н., 1500 п.н., 1000 п.н. или 500 п.н. от сайта, расположенного в любом месте хромосомы 13: 99773011-99858860. В определенных вариантах осуществления нРНК нацелены на локус генома в пределах 4000 п.н., 3500 п.н., 3000 п.н., 2500 п.н., 2000 п.н., 1500 п.н., 1000 п.н. или 500 п.н. от хромосомы 13: 99822980. В некоторых вариантах осуществления нРНК сконфигурирована для образования сайта рестрикции на хромосоме 13: 99822980 или в пределах 5, 10, 15, 20, 30, 40 или 50 нуклеотидов хромосомы 13: 99822980. В определенных вариантах осуществления нРНК представляет собой GET000047, которая содержит комплементарную область, содержащую, состоящую или по существу состоящую из последовательности нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:111, и нацелена на интрон 2 CLYBL. Целевой сайт аналогичен целевому сайту TALEN, как описано в Cerbini et al., PLoS One, 10(1): e0116032 (2015).

[391] В некоторых вариантах осуществления нРНК, используемые в данном документе для сайт-направленной вставки трансгена, содержат комплементарную область, которая распознает целевую последовательность в CCR5. В некоторых из этих вариантов осуществления целевая последовательность расположена в экзоне 3 CCR5. CCR5 расположен на хромосоме 3: прямая цепь 46370854-46376206, а экзон 3 CCR5 (на основе транскрипта ENST00000292303.4) расположен на хромосоме 3: прямая цепь 46372892-46376206. В определенных вариантах осуществления нРНК нацелены на локус генома в пределах 4000 п.н., 3500 п.н., 3000 п.н., 2500 п.н., 2000 п.н., 1500 п.н., 1000 п.н. или 500 п.н. от сайта, расположенного в любом месте хромосомы 3: 46372892-46376206. В определенных вариантах осуществления нРНК нацелены на локус генома в пределах 4000 п.н., 3500 п.н., 3000 п.н., 2500 п.н., 2000 п.н., 1500 п.н., 1000 п.н. или 500 п.н. от хромосомы 3: 46373180. В некоторых вариантах осуществления нРНК сконфигурирована для образования сайта рестрикции на хромосоме 3: 46373180 или в пределах 5, 10, 15, 20, 30, 40 или 50 нуклеотидов хромосомы 3: 46373180. В некоторых вариантах осуществления нРНК представляет собой GET000048, также известную как «crCCR5_D», описанную в Mandal et al., Cell Stem Cell 15:643-652 (2014). Эта нРНК содержит комплементарную область, содержащую, состоящую или по существу состоящую из последовательности нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO:112, и нацелена на экзон 3 CCR5 (альтернативно аннотированный как экзон 2 в базе данных генома Ensembl). См. Gomez-Ospina et al., Nat. Comm. 10(1):4045 (2019).

[392] В определенных вариантах нРНК, используемых в данном документе, один

или более тиминов в последовательностях комплементарных областей, представленных в **таблице 19**, заменены урацилами.

Таблица 19. Иллюстративные последовательности комплементарных областей нРНК

SEQ ID NO:	**Последовательность нуклеиновой кислоты (5'→3')**	**Описание**
110	accccacagtggggccacta	Направляющая молекула GET000046
111	tgttggaaggatgaggaaat	Направляющая молекула GET000047
112	tcactatgctgccgcccagt	Направляющая молекула GET000048

[393] В некоторых вариантах осуществления предложены способы идентификации новых локусов и/или последовательностей нРНК для использования в подходах сайт-направленного редактирования генов, как описано. Например, для систем CRISPR/Cas, когда известна существующая нРНК для конкретного локуса (например, в пределах локуса «безопасная гавань»), можно использовать подход, основанный на последовательном продвижении сборки по геному, для выявления дополнительных локусов для целевой вставки трансгенов путем сканирования фланкирующих областей по обе стороны от локуса на наличие последовательностей PAM, которые, как правило, встречаются примерно через каждые 100 пар нуклеотидов (п.н.) по всему геному. Последовательность PAM будет зависеть от конкретной используемой нуклеазы Cas, поскольку разные нуклеазы обычно имеют разные соответствующие последовательности PAM. Фланкирующие области по обе стороны от локуса могут иметь длину от около 500 до 4000 п.н., например, около 500 п.н., около 1000 п.н., около 1500 п.н., около 2000 п.н., около 2500 п.н., около 3000 п.н., около 3500 п.н., или около 4000 п.н. Когда последовательность PAM идентифицируется в пределах диапазона поиска, можно разработать новую направляющую молекулу в соответствии с последовательностью этого локуса для использования в сайт-направленной вставке трансгенов. Хотя система CRISPR/Cas описана как иллюстративная, в этом методе идентификации новых локусов можно использовать любые описанные подходы к редактированию генов, включая те, которые используют ZFN, TALEN, мегануклеазы и транспозазы.

[394] В некоторых вариантах осуществления активность, стабильность и/или другие характеристики нРНК можно изменить путем включения химических модификаций и/или модификаций последовательности. Например, транзиентно экспрессируемые или доставленные нуклеиновые кислоты могут быть подвержены деградации, например, клеточными нуклеазами. Соответственно, нРНК, описанные в данном документе, могут содержать один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, которые обеспечивают стабильность по отношению к нуклеазам. Не будучи

связанными какой-либо конкретной теорией, считается, что некоторые модифицированные гРНК, описанные в данном документе, могут демонстрировать сниженный врожденный иммунный ответ при введении в популяцию клеток, в частности, в клетки по настоящей технологии. В контексте данного документа термин «врожденный иммунный ответ» включает клеточный ответ на экзогенные нуклеиновые кислоты, включая одноцепочечные нуклеиновые кислоты, как правило, вирусного или бактериального происхождения, который включает индукцию экспрессии и высвобождение цитокинов, особенно интерферонов, и гибель клеток. Другие распространенные химические модификации нРНК для улучшения стабильности, повышения устойчивости к нуклеазам и/или снижения иммунного ответа включают 2'-О-метильную модификацию, 2'-фтор модификацию, модификацию 2'-О-метилфосфотиоатной связи и модификацию 2'-О-метил 3'-тио-РАСЕ.

[395] Одной из распространенных модификаций 3’-конца является добавление поли-А-тракта, включающего один или более (и обычно 5-200) остатков аденина (А). Поли-А-тракт может содержаться в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей нРНК, или может быть добавлен к нРНК во время химического синтеза или после транскрипции in vitro с использованием полиаденозинполимеразы (например, поли(А)-полимеразы E. coli). In vivo поли-А-тракты могут быть добавлены к последовательностям, транскрибируемым с ДНК-векторов, посредством использования сигналов полиаденилирования. Примеры таких сигналов приведены в Maeder. Другие подходящие модификации нРНК включают, без ограничений, модификации, описанные в заявке на патент США № US 2017/0073674 A1 и международной публикации № WO 2017/165862 A1, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

[396] 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 SNP, связанного с заболеванием, в клетке путем замены его аллелем 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.

[397] 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.

[398] 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 аминокислот), и включают модифицированные аминокислоты (например, фосфорилированные, гликированные, гликозилированные, др.) и аналоги аминокислот. Иллюстративные полипептиды или белки включают генные продукты, встречающиеся в природе белки, гомологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги вышеперечисленных.

[399] 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 замену 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, чтобы включать фрагмент (например, ПЭГилирование, гликозилирование, липидирование, ацетилирование, блокирование концов и т. д.).

[400] В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает ядерный белок Cas. Иллюстративные 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.

[401] 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» или «функциональный фрагмент» относится к части пептидного или белкового фактора, которая сохраняет свою способность образовывать комплекс по меньшей мере с одной рибонуклеиновой кислотой (например, направляющей РНК (нРНК)) и расщеплять целевую полинуклеотидную последовательность. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть содержит комбинацию функционально связанных функциональных доменов белка Cas9, выбранных из группы которая включает ДНК-связывающий домен, по меньшей мере один РНК-связывающий домен, геликазный домен и эндонуклеазный домен. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть содержит комбинацию функционально связанных функциональных доменов белка Cpf1, выбранных из группы которая включает ДНК-связывающий домен, по меньшей мере один РНК-связывающий домен, геликазный домен и эндонуклеазный домен. 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 Cpf1 содержит функциональную часть RuvC-подобного домена.

[402] 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. Как применяется в данном документе, «проникающий в клетку

полипептид» и «проникающий в клетку пептид» относятся к полипептиду или пептиду, соответственно, которые облегчают захват молекулы клеткой. Проникающие в клетки полипептиды могут содержать выявляемую метку.

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

[404] В некоторых вариантах осуществления полипептид Cas содержит белок Cpf1 (Cas12a) или его вариант. В некоторых вариантах осуществления белок Cpf1 (Cas12a) содержит полипептид Cpf1, слитый с проникающим в клетку пептидом. В некоторых вариантах осуществления белок Cpf1 содержит полипептид Cpf1, слитый с PTD. В некоторых вариантах осуществления белок Cpf1 содержит полипептид Cpf1, слитый с доменом tat. В некоторых вариантах осуществления белок Cpf1 содержит полипептид Cpf1, слитый с олигоаргининовым доменом. В некоторых вариантах осуществления белок Cpf1 содержит полипептид Cpf1, слитый с доменом пенетратина. В некоторых вариантах осуществления белок Cpf1 содержит полипептид Cpf1, слитый с суперположительно заряженным GFP. Подробные описания белков Cpf1 можно найти, например, в Safari et al., Cell & Bioscience, 2019; 9, 36; doi.org/10.1186/s13578-019-0298-7.

[405] В некоторых вариантах осуществления белок Cas можно вносить в клетку, содержащую целевую полинуклеотидную последовательность, в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas. Процесс несения нуклеиновых кислот в клетки можно осуществлять любым подходящим способом. Подходящие методы включают трансфекцию, опосредованную фосфатом кальция или липидами, электропорацию и трансдукцию или инфекцию с применением 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 содержит

модифицированную мРНК, как описано в данном документе (например, синтетическую модифицированную мРНК).

[406] 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, как описано в данном документе, (например, синтетической модифицированной мРНК).

[407] Способы по настоящему изобретению 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 направляющую РНК, которая направляет белок Cas и гибридизуется с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота содержит направляющую РНК, которая направляет белок Cas и гибридизируются с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. В некоторых вариантах осуществления обе из одной до двух рибонуклеиновых кислот содержат направляющую РНК, которая направляет белок Cas и гибридизуется с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. Рибонуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть выбраны для гибридизации со множеством различных мотивов-мишеней, в зависимости от конкретной используемой системы CRISPR/Cas и целевой последовательности полинуклеотида, что будет понятно специалистам в данной области техники. Чтобы минимизировать гибридизацию с последовательностями нуклеиновых кислот, отличными от целевой полинуклеотидной последовательности также можно выбрать от одной до двух рибонуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления от одной до двух рибонуклеиновых кислот гибридизуются с целевым мотивом, который содержит по меньшей мере два несовпадения по сравнению со всеми другими геномными нуклеотидными последовательностями в клетке. В некоторых вариантах осуществления от одной до двух рибонуклеиновых кислот гибридизуются с целевым мотивом, который содержит по меньшей мере одно несовпадение по сравнению со всеми другими геномными нуклеотидными последовательностями в клетке. В некоторых вариантах осуществления от одной до двух рибонуклеиновых кислот предназначены для гибридизации с целевым мотивом, непосредственно примыкающим к мотиву дезоксирибонуклеиновой кислоты, распознаваемому белком Cas. В некоторых вариантах 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.

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

[409] В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, направляющие РНК) комплементарны и/или гибридизуются с последовательностями на одной и той же цепи целевой полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, направляющие РНК) комплементарны и/или гибридизуются с последовательностями на противоположных цепях целевой последовательности полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, направляющие РНК) не комплементарны и/или не гибридизуются с последовательностями на противоположных цепях целевой последовательности полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, направляющие РНК) комплементарны и/или гибридизуются с перекрывающимися целевыми мотивами целевой полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, направляющие РНК) комплементарны и/или гибридизуются для компенсации целевых мотивов целевой полинуклеотидной последовательности.

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

[411] Иллюстративные последовательности нРНК, пригодные для нацеливания на описанные в данном документе гены на основе CRISPR/Cas, представлены в **таблице 20** ниже. Последовательности можно найти в WO 2016/183041, поданной 9 мая 2016 г., описание которой, включая таблицы, приложения и перечень последовательностей, полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Таблица 20. Примеры последовательностей нРНК, пригодных для нацеливания на гены

Название гена	SEQ ID NO в WO2016183041	№ таблицы/приложения в 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
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-C	SEQ ID NO:3278-5183	Таблица 10, приложение 3
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

[412] В некоторых вариантах осуществления описанные клетки получают с использованием методологий нуклеаз на основе эффектора, подобного активатору транскрипции, (TALEN).

[413] Под «TALE-нуклеазой» (TALEN) подразумевается слитый белок, содержащий связывающий нуклеиновую кислоту домен, как правило, полученный 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 положениях 12 и 13 (RVD), которые специфичны для каждого нуклеотидного основания целевой последовательности нуклеиновой кислоты. Связывающие домены с аналогичными свойствами связывания нуклеиновых кислот модульного типа «основание за основанием» (MBBBD) также могут быть получены из новых модульных белков, недавно обнаруженных заявителем у другого вида бактерий. Преимущество новых модульных белков заключается в том, что они демонстрируют большую изменчивость последовательностей, чем повторы TAL. Предпочтительно RVD, связанные с распознаванием 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.

[414] В некоторых вариантах осуществления клетки подвергают манипуляциям с помощью цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN). «Связывающий белок с цинковыми пальцами » представляет собой белок или полипептид, который связывает ДНК, РНК и/или белок, предпочтительно специфичным для последовательности образом, в результате стабилизации структуры белка посредством координации иона цинка. Термин «связывающий белок с цинковыми пальцами» часто сокращенно называют «белок с цинковыми пальцами» или ZFP. Отдельные ДНК-связывающие домены обычно называют «пальцами». ZFP имеет по меньшей мере один палец, обычно два пальца, три пальца или шесть пальцев. Каждый палец связывает от двух до четырех пар оснований ДНК, как

правило, три или четыре пары оснований ДНК. ZFP связывается с последовательностью нуклеиновой кислоты, называемой целевым сайтом или целевым сегментом. Каждый палец обычно содержит приблизительно 30 аминокислот, хелатирующий цинк, ДНК-связывающий субдомен. Исследования показали, что одиночный цинковый палец этого класса состоит из альфа-спирали, содержащей два инвариантных гистидиновых остатка, координационно связанных с цинком, наряду с двумя цистеиновыми остатками одного бета очередь (см., например, Berg & Shi, Science 271:1081-1085 (1996)).

[415] В некоторых вариантах осуществления описанные клетки получают с использованием хоминг эндонуклеазы. Такие хоминг эндонуклеазы хорошо известны в данной области техники (B. L. Stoddard, Q Rev Biophys, 2005;38(1):49-95 2005). Хоминг эндонуклеазы распознают целевую последовательность ДНК и генерируют одно- или двухцепочечный разрыв. Хоминг эндонуклеазы являются высокоспецифичными, распознающими целевые участки ДНК длиной от 12 до 45 пар нуклеотидов (п.н.), как правило, в диапазоне от 14 до 40 п.н. Хоминг эндонуклеаза может, например, соответствовать эндонуклеазе LAGLIDADG, эндонуклеазе HNH или эндонуклеазе GIY-YIG. Предпочтительная хоминг эндонуклеаза по настоящему изобретению может представлять собой вариант I-CreI.

[416] В некоторых вариантах осуществления описанные клетки получают с использованием мегануклеазы. Мегануклеазы по определению представляют собой специфичные к последовательности эндонуклеазы, распознающие большие последовательности (Chevalier, B. S. and B. L. Stoddard, Nucleic Acids Res., 2001, 29, 3757-3774). Они могут расщеплять уникальные сайты в живых клетках, тем самым усиливая нацеливание на гены в 1000 и более раз вблизи сайта расщепления (Puchta et al., Nucleic Acids Res., 1993, 21, 5034-5040; Rouet et al., Mol. Cell. Biol., 1994, 14, 8096-8106; 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).

[417] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, получают с использованием РНК-сайленсинга или РНК-интерференции (РНКи) для нокдауна (например, снижения, элиминации или ингибирования) экспрессии полипептида, такого как иммуносупрессивный фактор, толерогенный фактор и т.п. Полезные методы РНКи включают те, которые используют синтетические молекулы РНКи, короткие интерферирующие РНК (киРНК), PIWI-взаимодействующие РНК (piРНК), короткие шпилечные РНК (кшРНК), микроРНК (миРНК) и другие способы осуществления транзиентного нокдауна, известные специалистам в данной области техники. Реагенты для РНК-интерференции, включая специфичные к последовательности кшРНК, киРНК, микроРНК и т.п., являются коммерчески доступными. Например, CIITA можно подвергнуть нокдауну в плюрипотентной стволовой клетке путем введения киРНК CIITA или трансдукции вируса, экспрессирующего кшРНК CIITA, в клетку. В некоторых

вариантах осуществления РНК-интерференция используется для снижения или ингибирования экспрессии по меньшей мере одного из генов, выбранных из группы, включающей CIITA, B2M и NLRC5.

1. Иллюстративные экспрессионные конструкции

[418] Для переноса экзогенных генов в представляющие интерес клетки используются хорошо известные рекомбинантные методики для получения рекомбинантных нуклеиновых кислот, как описано в данном документе. Доступны многие векторы, пригодные для экзогенной экспрессии полипептидов в целевых клетках. Векторы могут быть эписомальными, т.е. плазмиды, полученные из вирусов векторы, такие как цитомегаловирус, аденовирус и т.д., или могут быть интегрированы в геном целевой клетки путем гомологичной рекомбинации или случайной интеграции, например, векторы, полученные из ретровирусов, например, MMLV, HIV-1, ALV и т.п. В некоторых вариантах осуществления стволовых клеток предпочтительны лентивирусные векторы.

[419] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуносупрессивный фактор, могут быть функционально связаны с одной или более регуляторными последовательностями нуклеотидов в экспрессионной конструкции. Регуляторные нуклеотидные последовательности, как правило, подходят для клетки-хозяина и подлежат 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 либо природными промоторами, либо гибридными промоторами, которые объединяют элементы более чем одного промотора. Экспрессионная конструкция может присутствовать в клетке на эписоме, такой как плазмида, или экспрессионная конструкция может быть встроена 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.

[420] 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 B 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)). Непосредственный ранний промотор цитомегаловируса человека удобно получать в виде фрагмента рестрикционного фермента HindIII (Greenaway et al., Gene, 18: 355-360 (1982)). Вышеприведенные ссылки полностью включены посредством ссылки.

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

[422] После изменения наличие экспрессии любой молекулы, описанной в данном документе, можно проанализировать с использованием известных методик, таких как вестерн-блоты, анализы на основе ИФА, анализы методом FACS и т.п.

2. Гипоиммунные клетки

[423] В данном документе предложены гипоиммунные клетки, в том числе гипоиммунные стволовые клетки, клетки, дифференцированные из этих стволовых клеток, или первичные клетки (обозначаемые в данном документе как «HIP клетки»), сконструированные для экспрессии иммунорегуляторных белков и избегания отторжения иммунной системой реципиента-хозяина при введении субъекту-реципиенту в рамках аллогенной клеточной терапии. Введение защитных переключателей для модуляции активности таких клеток при введении субъекту-реципиенту является важной технологией для повышения безопасности этих видов клеточной терапии.

[424] Ключевой особенностью HIP клеток является экспрессия

иммуносупрессивных факторов, которые подавляют иммунный ответ клеток хозяина на трансплантированную популяцию клеток. В некоторых вариантах осуществления гипоиммунность клеток, которые вводят субъекту-реципиенту, достигается за счет сверхэкспрессии иммуносупрессивной молекулы, включая факторы гипоиммунитета, например, CD47, и ингибиторы комплемента, сопровождающейся репрессией или генетическим разрушением локусов HLA-I и HLA- II. Эти модификации скрывают клетку от эффекторных клеток иммунной системы реципиента, которые отвечают за удаление инфицированных, злокачественных или чужеродных клеток, таких как Т-клетки, В-клетки, NK-клетки и макрофаги. Маскировка клетки от иммунной системы позволяет существовать и выживать аллогенным клеткам в организме. Контролируемое удаление сконструированных клеток из организма имеет решающее значение для безопасности пациентов и может быть достигнуто путем демаскировки клеток для иммунной системы. Демаскировка служит защитным переключателем и может быть достигнуто за счет блокировки и/или интерференции оси CD47-SIRPα или их взаимодействия.

С. Анализы фенотипов гипоиммуногенности и сохранения плюрипотентности

[425] После получения гипоиммуногенных клеток или клеток, которые уклоняются от распознавания иммунной системой, их можно проанализировать на предмет их иммуногенности и/или сохранения плюрипотентности, как описано в WO2016183041, WO2018132783 и WO2018175390.

[426] В некоторых вариантах гипоиммуногенность оценивают с использованием ряда методик, как показано на Фиг. 13 и Фиг. 15 в WO2018132783. Эти методики включают трансплантацию аллогенным или ксеногенным хозяевам и мониторинг роста гипоиммуногенных плюрипотентных клеток (например, тератом), ускользающих от иммунной системы хозяина. В некоторых случаях производные гипоиммуногенных клеток трансдуцируются для экспрессии люциферазы, а затем могут отслеживаться с помощью биолюминесцентной визуализации. Подобным образом тестируют Т-клеточный и/или В-клеточный ответ животного-хозяина на такие клетки, чтобы подтвердить, что клетки не вызывают иммунную реакцию у животного-хозяина. Функцию Т-клеток оценивают с помощью Elispot, ELISA, FACS, ПЦР или масс-цитометрии (CYTOF). В-клеточный ответ или образование антител оценивают с помощью FACS или Luminex. Дополнительно или альтернативно клетки могут быть проанализированы на их способность уклоняться от реакций врожденного иммунитета, например, уничтожения NK-клетками, как показано в целом на Фиг. 14 и 15 WO2018132783.

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

некоторых случаях анализ активации Т-клеток включает совместное культивирование Т-клеток с описанными в данном документе клетками и определение уровней экспрессии маркеров активации Т-клеток в Т-клетках.

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

[429] 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.

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

[431] Как понятно специалистам в данной области техники, успешное снижение функции MHC 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.

[432] 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.

[433] Успешное снижение функции MHC 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.

[434] Кроме того, клетки можно исследовать, чтобы подтвердить, что комплекс HLA II не экспрессируется на клеточной поверхности. Опять же, этот анализ проводят

так, как это известно в данной области техники (см., например, Фиг. 21 в WO 2018132783) и обычно проводят с использованием вестерн-блоттинга или анализа методом FACS на основе коммерческих антител, которые связываются с человеческим HLA класса II, HLA-DR, DP и большинство антигенов DQ.

[435] В дополнение к снижению уровня HLA I и II (или MHC I и II) описанные клетки могут иметь пониженную восприимчивость к фагоцитозу макрофагов и уничтожению NK-клеток. Считается, что полученные клетки (не желая быть связанными теорией) избегают иммунных макрофагов и врожденных путей из-за экспрессии одного или более трансгенов CD47.

D. Дифференцировка стволовых клеток

[436] В настоящем изобретении предложены плюрипотентные клетки, которые можно дифференцировать в различные типы клеток для последующей трансплантации субъектам. Как будет понятно специалистам в данной области техники, способы дифференцировки зависят от желаемого типа клеток с использованием известных способов. Клетки можно дифференцировать в суспензии, а затем поместить в форму гелевой матрицы, такая как формы матригеля, желатина или фибрина/тромбина, для облегчения выживаемости клеток. В некоторых случаях дифференцировка анализируется, как известно в данной области, обычно путем оценки присутствия специфических для клеток маркеров.

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

[438] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные плюрипотентные клетки дифференцируют в бета-подобные клетки железы или островковые органоиды для трансплантации с целью лечения сахарного диабета I типа (СД I). Клеточные системы представляют собой многообещающий способ борьбы с СД I, см., *например*, Ellis et al., doi/10.1038/nrgastro.2017.93, включенный в данный документ посредством ссылки. Кроме того, Pagliuca et al. сообщает об успешной дифференцировке β-клеток из иПСК человека (см. doi/10.106/j.cell.2014.09.040, включенный в данный документ посредством ссылки во

всей своей полноте и, в частности, в отношении описанных там методов и реагентов для крупномасштабного производства функциональных β-клеток человека из плюрипотентных стволовых клеток человека). Кроме того, Vegas et al. показано получение β-клеток человека из плюрипотентных стволовых клеток человека с последующей инкапсуляцией во избежание иммунного отторжения хозяином; (doi:10.1038/nm.4030, полностью включенный в данный документ посредством ссылки и, в частности, для описанных там способов и реагентов для крупномасштабного производства функциональных человеческих β-клеток из плюрипотентных стволовых клеток человека).

[439] Дифференцировку анализируют, как это известно в данной области техники, обычно путем оценки присутствия ассоциированных с β-клетками или специфических маркеров, включая, но не ограничиваясь ими, инсулин. Дифференцировку также можно измерять функционально, например, путем измерения метаболизма глюкозы, см. в целом Muraro et al., doi:10.1016/j.cels.2016.09.002, полностью включенную в данный документ посредством ссылки, и конкретно для описанных там биомаркеров.

[440] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные клетки дифференцируются в пигментный эпителий сетчатки (RPE) для решения проблемы угрожающих зрению заболеваний глаза. Плюрипотентные стволовые клетки человека были дифференцированы в клетки RPE с использованием методов, изложенных в Kamao et al., Stem Cell Reports 2014:2:205-18, полностью включенных в данный документ посредством ссылки и, в частности, в отношении методов и реагентов, описанных там для методов дифференцировки и реагентов; см. также Mandai et al., doi:10.1056/NEJMoa1608368, также включенной во всей полноте в отношении методик создания слоев клеток RPE и трансплантации пациентам.

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

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

[443] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные клетки

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

[444] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные клетки дифференцируются в клетки-предшественники щитовидной железы и фолликулярные органоиды щитовидной железы, которые могут секретировать гормоны щитовидной железы для лечения аутоиммунного тиреоидита. Способы дифференцировки клеток щитовидной железы известны в данной области техники. *См., например,* Kurmann et al., doi:10.106/j.stem.2015.09.004, явным образом включенную в данный документ путем ссылки полностью и конкретно в отношении способов и реагентов для получения клеток щитовидной железы из плюрипотентных стволовых клеток человека, а также в отношении методов трансплантации. Дифференцировку можно анализировать, как это известно в данной области техники, обычно путем оценки присутствия ассоциированных с клетками щитовидной железы маркеров или специфических маркеров или путем оценки функций.

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

Е. Введение/трансплантация первичных клеток и/или клеток, полученных из первичных клеток

[446] В некоторых вариантах осуществления первичные клетки или их непервичные производные клеток трансплантируют или прививают с использованием методов, известных в данной области техники, которые зависят как от типа клеток, так и от конечного использования этих клеток. Как правило, клетки по настоящему изобретению можно вводить либо внутривенно, либо путем инъекции в определенные места тела пациента. При пересадке в определенные места клетки могут быть погружены в гелевую матрицу для предотвращения рассредоточения. В некоторых вариантах осуществления пациенту, получающему клетки, вводят иммуносупрессивный агент. В других вариантах осуществления пациенту, получающему клетки, не вводят иммуносупрессивный агент.

[447] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение популяции клеток, включающей дифференцированные клетки, полученные из сконструированных стволовых клеток, содержащих экзогенный иммунодепрессивный фактор. В полезных вариантах осуществления в данном документе предложен способ

лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение популяции клеток, включающей дифференцированные клетки, полученные из стволовых клеток, содержащих экзогенный CD47 человека. Как правило, безопасное и эффективное количество сконструированных клеток представляет собой, например, количество, которое будет вызывать желаемый терапевтический эффект у пациента при минимизации нежелательных побочных эффектов. В дополнительных вариантах осуществления пациенту вводят любой из блокирующих CD47-SIRPα агентов, описанных в данном документе, и, таким образом, минимизируют нежелательные побочные эффекты от введенных сконструированных клеток.

[448] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение популяции первичных Т-клеток, содержащих первичные Т-клетки, экспрессирующие экзогенный иммунный сигнальный фактор. В полезных вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения пациента, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение популяции первичных Т-клеток, содержащих первичные Т-клетки, содержащие экзогенный CD47 человека. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят любой из блокирующих CD47-SIRPα агентов, описанных в данном документе.

[449] В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят, когда клетки, введенные пациенту, подвергаются нежелательной экспансии или пролиферации у реципиента. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят, когда клетки, введенные пациенту, находятся в неподходящем месте в организме реципиента. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят, когда клетки, введенные пациенту, подвергаются злокачественной трансформации. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят, когда клетки, введенные пациенту, индуцируют синдром высвобождения цитокинов. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят, когда клетки, введенные пациенту, вызывают нейротоксичность. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят, когда клетки, введенные пациенту, вызывают токсичность, такую как целевую внеопухолевую токсичность.

[450] В одном аспекте описанный способ включает введение одной или более доз популяции CD47 сконструированных клеток (например, популяции клеток, экзогенно экспрессирующих CD47) субъекту-реципиенту, нуждающемуся в этом, и последующее введение блокирующего CD47-SIRPα агента. В некоторых вариантах осуществления субъект-реципиент получает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доз популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления пациент получает начальную дозу популяции CD47 сконструированных клеток, а затем пациенту вводят блокирующий CD47-SIRPα агент. В конкретных вариантах осуществления пациенту вводят начальную дозу популяции CD47 сконструированных клеток, затем блокирующий CD47-SIRPα агент, и затем

последующую популяцию CD47 сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят начальную дозу популяции CD47 сконструированных клеток, а затем первое введение блокирующего CD47-SIRPα агента, а затем последующую популяцию CD47 сконструированных клеток, а затем второе введение блокирующего CD47-SIRPα агента. Начальная доза популяции CD47 сконструированных клеток включает одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) инфузий или инъекций клеток. Последующая доза популяции CD47 сконструированных клеток включает одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) инфузий или инъекций клеток.

[451] В другом аспекте способ включает проведение схемы лечения, включающей цикл лечения, включающий введение популяции сконструированных клеток, а затем введение блокирующего CD47-SIRPα агента. В некоторых вариантах осуществления схема лечения включает один или более (например, 1, 2, 3, 4 или более) циклов лечения, так что каждый цикл лечения включает введение популяции сконструированных клеток, а затем введение блокирующего CD47-SIRPα агента. В некоторых вариантах осуществления стадия введения популяции сконструированных клеток субъекту-реципиенту включает введение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доз популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления субъекту-реципиенту вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доз популяции клеток перед введением блокирующего CD47-SIRPα агента.

[452] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение популяции CD47 сконструированных клеток, а затем введение блокирующего CD47-SIRPα агента, через определенный промежуток времени. В некоторых случаях определенный промежуток времени составляет по меньшей мере 1 неделю или более. В некоторых случаях определенный промежуток времени составляет по меньшей мере 1 месяц или более. В некоторых случаях определенный промежуток времени заканчивается, если у субъекта-реципиента проявляется нежелательное явление, вызванное введенными клетками. В некоторых вариантах осуществления определенный промежуток времени заканчивается, если введенные клетки подвергаются нежелательной экспансии или пролиферации у реципиента. В определенных вариантах осуществления определенный промежуток времени заканчивается, если введенные клетки находятся в неподходящем месте в организме реципиента. В конкретных вариантах осуществления определенный промежуток времени заканчивается, если введенные клетки претерпевают злокачественную трансформацию. В некоторых вариантах осуществления определенный промежуток времени заканчивается, если введенные клетки индуцируют синдром высвобождения цитокинов. В других вариантах осуществления определенный промежуток времени заканчивается, если введенные клетки индуцируют нейротоксичность. В конкретных вариантах осуществления определенный промежуток времени, когда введенные клетки индуцируют токсичность, например, целевую внеопухолевую токсичность.

[453] В некоторых вариантах осуществления способ включает несколько циклов

терапии блокирующим CD47-SIRPα агентом. В некоторых случаях схема лечения включает введение одной или более доз блокирующего CD47-SIRPα агента, таким образом, чтобы количество вводимых клеток и их производных (например, вводимых клеток и любых клеток, полученных из таких клеток у субъекта-реципиента) уменьшалось по меньшей мере на 10% (например, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более). В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят таким образом, что по существу все введенные клетки подвергаются гибели и/или клиренсу (например, фагоцитозу).

IV. Блокирующие CD47-SIRPα агенты

[454] Внедрение защитных переключателей повышает безопасность клеточной терапии, например, с использованием модифицированных клеток, содержащих CD47. В данном документе описаны способы снижения эффекта ускользания от иммунного ответа для CD47 в таких клетках, привитых субъекту-реципиенту. В некоторых вариантах осуществления субъекта-реципиента лечат терапевтическим агентом, которое ингибирует или блокирует взаимодействие CD47 и SIRPα. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент (например, агент, который блокирует, ингибирует, снижает, антагонизирует, нейтрализует или интерферирует CD47-SIRPα), включает агент, выбранный из группы, которая включает антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, биспецифическое антитело, которое связывает CD47, слитый белок иммуноцитокина, который связывает CD47, содержащий CD47 слитый белок, антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, биспецифическое антитело, которое связывает SIRPα, слитый белок иммуноцитокина, который связывает SIRPα, содержащий SIRPα слитый белок, и их комбинацию. В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ, включающий введение блокирующего CD47-SIRPα агента пациенту, которому ранее вводили клетки, содержащие экзогенно экспрессирующиеся белки CD47. Таким образом, не желая быть связанными теорией, считается, что клетки больше не могут ускользать от иммунного распознавания и, таким образом, распознаются иммунными клетками пациента и становятся мишенью для уничтожения и/или клиренса. В некоторых случаях врожденные иммунные клетки пациента активируются или мобилизуются для уменьшения количества ранее введенных клеток и их производных (например, потомства).

[455] Любой из блокирующих CD47-SIRPα агентов, описанных в данном документе, можно использовать для лечения пациента с патологическим состоянием или заболеванием, которое отвечает на клеточную терапию. Например, такое патологическое состояние или заболевание может характеризоваться наличием нездоровых клеток или тканей (например, больных клеток или тканей), которые могут быть заменены с помощью терапевтических методов, включающих здоровые клетки, включая клетки, не находящиеся в болезненном состоянии. В некоторых вариантах осуществления пациенту, имеющему патологическое состояние или заболевание, вводят клеточную терапию, которая, как ожидается, ослабит один или более симптомов патологического состояния

или заболевания. Любой из блокирующих CD47-SIRPα агентов можно использовать для лечения, уменьшения или ослабления побочных эффектов после введения популяции клеток, содержащих экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47. В некоторых вариантах осуществления агент применяют для регуляции эффекта клеточной терапии у пациента, для модулирования активности клеточной терапии у пациента или для уменьшения количества клеток, содержащих экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47, у пациента.

[456] В некоторых аспектах блокирующий CD47-SIRPα агент снижает у пациента-реципиента количество клеток, экзогенно экспрессирующих полипептиды CD47, включая, но не ограничиваясь ими, клетки, которые также экзогенно экспрессируют один или более химерных антигенных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент снижает количество клеток, экспрессирующих CD47, у пациента независимо от уровня экспрессии CAR такими клетками. В некоторых случаях уровень экспрессии CAR клетками меньше (например, на 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% меньше), чем уровень экспрессии контрольной CAR-T-клеткой, например, но не ограничиваясь этим, биоаналог тисагенлеклейсела, суррогат тисагенлеклейсела и т.п. В некоторых случаях уровень экспрессии CAR клетками выше (например, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 150%, 200%, 300% или более высокий процент), чем уровень экспрессии контрольной CAR-T-клеткой, например, но не ограничиваясь этим, биоаналог тисагенлеклейсела, суррогат тисагенлеклейсела и т.п.

А. CD47-связывающие блокирующие агенты

[457] В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в данном документе, блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой агент, который связывает CD47. Агент может представлять собой агент, который блокирует, нейтрализует, антагонизирует или интерферирует CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, которая включает антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, биспецифическое антитело, которое связывает CD47, и слитый белок иммуноцитокина, который связывает CD47.

[458] Подходящие антитела или их фрагменты, связывающие CD47, могут быть выбраны из группы, включающей магролимаб ((Hu5F9-G4)) (Forty Seven, Inc.; Gilead Sciences, Inc.), урабрелимаб, CC-90002 (Celgene; Bristol-Myers Squibb), IBI-188 (Innovent Biologics), IBI-322 (Innovent Biologics), TG-1801 (TG Therapeutics; также известен как NI-1701, Novimmune SA), ALX148 (ALX Oncology), TJ011133 (также известен как TJC4, I-Mab Biopharma), FA3M3, ZL-1201 (Zai Lab Co., Ltd), AK117 (Akesbio Australia Pty, Ltd.), AO-176 (Arch Oncology), SRF231 (Surface Oncology), GenSci-059 (GeneScience), C47B157 (Janssen Research and Development), C47B161 (Janssen Research and Development), C47B167 (Janssen Research and Development), C47B222 (Janssen Research and Development), C47B227 (Janssen Research and Development), Vx-1004 (Corvus Pharmaceuticals), HMBD004 (Hummingbird Bioscience Pte Ltd), SHR-1603 (Hengrui), AMMS4-G4 (Пекинский институт

биотехнологии), RTX-CD47 (Университет Гронингена), и IMC-002. (Samsung Biologics; ImmuneOncia Therapeutics). В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент не конкурируют за связывание CD47 с антителом, выбранным из группы, включающей магролимаб, урабрелимаб, CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801 (NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, и IMC-002. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент конкурируют за связывание CD47 с антителом, выбранным из магролимаба, урабрелимаба, CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801 (NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, и IMC-002. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, которая включает одноцепочечный фрагмент Fv (scFv) против CD47, Fab против CD47, наноантитело VHH против CD47, DARPin против CD47 и их варианты. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD47, Fab против CD47 и их варианты основаны на антигенсвязывающих доменах любых антител, выбранных из группы, включающей магролимаб, урабрелимаб, CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801 (NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, и IMC-002.

[459] Подходящие биспецифические антитела, которое связывает CD47, содержат первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD47, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген, выбранный из группы, включающей CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD30, CD33, CD38, CD44, CD52, CD56, CD70, CD96, CD97, CD99, CD123, CD279 (PD-1), EGFR, HER2, CD117, c-Met, PTHR2, HAVCR2 (TIM3) и антиген, экспрессируемый на раковой клетке.

[460] В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой слитый белок иммуноцитокина, содержащий цитокин и либо антигенсвязывающий домен, либо антитело, либо его фрагмент, которое связывает CD47.

[461] Подробные описания иллюстративных CD47-связывающих молекул (например, антигенсвязывающие домены, антитела, наноантитела, диатела, белки-миметики антител (например, DARPin) и их фрагменты, которые распознают или связывают CD47), включая последовательности тяжелой цепи, легкой цепи, области VH, области VL, CDR и каркасных областей можно найти, например, в WO2009091601; WO2011143624; WO2013119714; WO201414947; WO2014149477; WO2015138600; WO2016033201; WO2017049251; Pietsch et al., Blood Cancer J, 2017, 7(2), e536; van Brommel et al., 2018, 7(2), e1386361; Yu et al., Biochimie, 2018, 151, 54-66; и Andrechak et al., Phil Trans R Soc, 2019, 374, 20180217; раскрытия, такие как перечни последовательностей, описания и фигуры, включены в данный документ во всей своей полноте.

B. SIRPα-связывающие блокирующие агенты

[462] В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент, вводимый субъекту-реципиенту, представляет собой агент, который связывает SIRPα. Агент может представлять собой агент, блокирующий, нейтрализующий, антагонизирующий или инактивирующий SIRPα. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, которая включает, но не ограничивается ими, антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, биспецифическое антитело, которое связывает SIRPα, и слитый белок иммуноцитокина, который связывает SIRPα.

[463] Полезные антитела или их фрагменты, которые связывают SIRPα, могут быть выбраны из группы, которая включает, но не ограничивается ими, ADU-1805 (Aduro Biotech Holdings), OSE-172 (OSE Immunotherapys; также известно как BI 765063 от Boehringer Ingelheim), CC -95251 (Celgene; Bristol-Myers Squibb), KWAR23 (Университет имени Леланда Стэнфорда-младшего) и P362 (Университет имени Леланда Стэнфорда-младшего). В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент не конкурируют за связывание SIRPα с антителом, выбранным из группы, включающей ADU-1805, CC-95251, OSE-172 (BI 765063), KWAR23 и P362. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент конкурируют за связывание SIRPα с антителом, выбранным из группы, включающей ADU-1805, CC-95251, OSE-172 (BI 765063), KWAR23 и P362.

[464] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, которая включает одноцепочечный фрагмент Fv (scFv) против SIRPα, Fab против SIRPα, наноантитело VHH против SIRPα, DARPin против SIRPα и их варианты. В некоторых вариантах осуществления scFv против SIRPα, Fab против SIRPα и их варианты основаны на антигенсвязывающих доменах любых антител, выбранных из группы, включающей ADU-1805, CC-95251, OSE-172 (BI 765063), KWAR23, и P362.

[465] В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело, которое связывает SIRPα, и антигенсвязывающий домен, который связывает антиген, выбранный из группы, включающей CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD30, CD33, CD38, CD44, CD52, CD56, CD70, CD96, CD97, CD99, CD123, CD279 (PD-1), EGFR, HER2, CD117, C-Met, PTHR2, HAVCR2 (TIM3), и антиген, экспрессируемый на раковой клетке. В некоторых случаях биспецифическое антитело связывает SIRPα и ассоциированный с опухолью антиген. В некоторых случаях биспецифическое антитело связывает SIRPα и антиген, экспрессируемый на поверхности иммунной клетки.

[466] В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой слитый белок иммуноцитокина содержит цитокин и либо антигенсвязывающий домен, либо антитело, либо его фрагмент, которые связывают SIRPα.

[467] Подробные описания иллюстративных SIRPα-связывающих молекул

(например, антигенсвязывающие домены, антитела, наноантитела, диатела, белки-миметики антител (например, DARPin) и их фрагменты, которые распознают или связывают SIRPα), включая последовательности тяжелой цепи, легкой цепи, области VH, области VL, CDR и каркасных областей можно найти, например, в WO2019226973; WO2018190719; WO2018057669; WO2017178653; WO2016205042; WO2016033201; WO2016022971; WO2015138600; и WO2013109752; раскрытия, включая перечни последовательностей, описания и фигуры, включены в данный документ во всей своей полноте.

C. CD47- и/или SIRPα-содержащие слитые белки

[468] Как описано в данном документе, блокирующий CD47-SIRPα агент может содержать CD47-содержащий слитый белок, который связывает SIRPα. В некоторых вариантах осуществления такой CD47-содержащий слитый белок, который связывает SIRPα, представляет собой агент, вводимый субъекту-реципиенту. В некоторых вариантах осуществления CD47-содержащий слитый белок содержит внеклеточный домен CD47 или его варианты, которые связывают SIRPα. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит область Fc. Подробные описания иллюстративных слитых белков CD47, включая последовательности, можно найти, например, в US 20100239579, раскрытие которой включено в данный документ полностью, включая перечень последовательностей, описание и фигуры.

[469] В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент может содержать SIRPα-содержащий слитый белок, который связывает CD47. Последовательность SIRPα представлена в SEQ ID NO:129 (UniProt P78324). Как правило, SIRPα-содержащие слитые белки содержат домен SIRPα, включающий любой из (a) иммуноглобулин-подобных доменов SIRPα человека (например, дистальной к мембране (D1) петли, содержащей домен IgV SIRP, (b) первой проксимальной к мембране петли, содержащей домен IgC, и (c) второй проксимальной к мембране петли, содержащей домен IgC). В некоторых случаях домен SIRPα связывается с CD47. В некоторых вариантах осуществления SIRPα-содержащий слитый белок содержит внеклеточный домен SIRPα или его варианты, которые связывают CD47. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит область Fc, включая, помимо прочего, область Fc IgG1 человека (например, UniProtKB/Swiss-Prot P01857, SEQ ID NO:130) или область Fc IgG4 (например, UniProt P01861, SEQ ID NO:131; GenBank CAC20457.1, SEQ ID NO:132). Необязательно область Fc может содержать одну или более замен. В некоторых вариантах осуществления SIRPα-содержащие слитые белки выбраны из группы, которая включает TTI-621 (Trillium Therapeutics), TTI-622 (Trillium Therapeutics) и ALX148 (ALX Oncology). TTI-621 (SEQ ID NO:133) представляет собой слитый белок, состоящий из N-концевого V-домена SIRPα человека, слитого с областью Fc IgG1 человека (Petrova et al. Clin Cancer Res 23(4):1068-1079 (2017)), в то время как TTI-622 (SEQ ID NO:134) представляет собой слитый белок, состоящий из N-концевого V-домена SIRPα человека, слитого с областью Fc IgG4 человека с одной заменой.

Таблица 21. Иллюстративные последовательности слитых белков SIRPα, IgG1/IgG4 и CD47

SEQ ID NO:	Последовательность	Описание
129	MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGE EELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVG PIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSES TKRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKGS PDTEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAARA TPQHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNGNELS DFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTREDVH SQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPT LEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLT WLENGNVSRTETASTVTENKDGTYNWMSW LLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSH DLKVSAHPKEQGSNTAAENTGSNERNIYIVV GVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSS TRLHEPEKNAREITQVQSLDTNDITYADLNLP KGKKPAPQAAEPNNHTEYASIQTSPQPASEDT LTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYAS VQVPRK	SIRPα (UniProt P78324)
130	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	IgG1 человека (UniProtKB/Swiss-Prot P01857)
131	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK	IgG4 человека (UniProt P01861)
132	ASFKGPSVFPLVPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSCALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVRVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPEDNYKTTPPVLDSDGS	IgG4 человека (GenBank CAC20457.1)

	FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	
133	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPV GPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSE STKRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKG SPDTEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	TTI-621
134	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPV GPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSE STKRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKG SPDTEFKSGAGTELSVRAKPSESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	TTI-622

[470] TTI-621, TTI-622 и другие родственные слитые белки описаны в публикации PCT № WO14/94122, содержание которой включено данный документ посредством ссылки в отношении указанных белков. AL148 представляет собой слитый белок, состоящий из N-концевого домена D1 SIRPα, слитого с модифицированным доменом Fc IgG1 человека (Kauder et al. PLoS One (13(8):e0201832 (2018)). Подробные описания иллюстративных слитых белков SIRPα, включая последовательности, можно найти, например, в публикации PCT Nos. WO14/94122; WO16/23040; WO17/27422; WO17/177333; и WO18/176132, раскрытие которых настоящим включено в данный документ во всей своей полноте, включая перечни последовательностей, описание и фигуры.

[471] SIRPα-содержащие слитые белки, включая TTI-621, разрабатываются для лечения злокачественного новообразования, например, гемобластозов, отдельно или в комбинации с другими лекарственными средствами для лечения злокачественного новообразования. Исследование фазы 1 по оценке дозировки и безопасности (NCT02663518) внутривенного введения TTI-621 у пациентов с рецидивирующим/рефрактерным гемобластозом и отдельными солидными опухолями показало, что TTI-621 хорошо переносится и продемонстрировал активность как в качестве монотерапии, так и в комбинации с другими агентами для лечения злокачественного новообразования (Ansell et al. Clin Cancer Res 27(8):2190-2199 (2021)). На начальном этапе повышения дозы субъекты получали TTI-621 в дозах 0,05, 0,1, 0,3, 1, 3 и 10 мг/кг для оценки безопасности и максимально переносимой дозы (MTD). На этапе

повышения дозы субъекты получали MTD 0,2 мг/кг в виде монотерапии или 0,1 мг/кг в комбинации с ритуксимабом или ниволумабом.

V. Использование блокирующих CD47-SIRPα агентов и связанных с ними способов

[472] В данном документе описаны способы и композиции для применения блокирующих CD47-SIRPα агентов для уменьшения или элиминации популяции клеток, сконструированных для экспрессии толерогенного фактора, такого как CD47, при этом популяция клеток ранее вводилась субъекту. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток дополнительно конструируют для экспрессии по меньшей мере одного CAR. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток дополнительно конструируют для экспрессии дополнительного фактора. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток дополнительно конструируют для экспрессии по меньшей мере одного CAR и дополнительного фактора. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой первичные клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки дифференцируются из плюрипотентных клеток, таких как индуцированные плюрипотентные клетки (иПСК). В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой аллогенные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой островковые клетки поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления островковые клетки поджелудочной железы дифференцируются из плюрипотентных клеток, таких как иПСК. В некоторых вариантах осуществления островковые клетки поджелудочной железы представляют собой первичные островковые клетки поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления островковые клетки поджелудочной железы представляют собой аллогенные островковые клетки поджелудочной железы.

[473] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления клетки дифференцируются из иПСК. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой дифференцированные клетки. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из сердечных клеток, нервных клеток, эндотелиальных клеток, Т-клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы, клеток кожи, клеток крови, первичных клеток и эпителиальных клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой первичные клетки. В некоторых вариантах осуществления первичные клетки представляют собой Т-клетки или островковые клетки поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления первичные клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления

первичные клетки представляют собой островковые клетки поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы для экспрессии по меньшей мере одного дополнительного фактора, выбранного из группы, состоящей из CD16, CD24, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, ингибитора C1, FASL, IDO1, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IL-10, IL-35, PD-1, PD-L1, серпина b9, CCl21, Mfge8, и их комбинации.

[474] В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD16. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD24. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD35. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD39. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD46. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD52. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD55. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD59. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD200. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CCL22. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CTLA4-Ig. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой ингибитор C1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой FASL. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой IDO1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой HLA-C. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой HLA-E. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой тяжелую цепь HLA-E. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой HLA-G. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой IL-10. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой IL-35. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой PD-1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой PD-L1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой серпин b9. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CCl21. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой Mfge8. В некоторых вариантах осуществления клетки имеют сниженную экспрессию молекул MHC класса I HLA и/или MHC класса II HLA.

[475] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию Т клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления

клетки имеют сниженную экспрессию молекул MHC класса I HLA и/или MHC класса II HLA. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию Т-клеток (i), сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47, и по меньшей мере одного химерного антигенного рецептора (CAR) и (ii) имеющих сниженную экспрессию молекул MHC класса I HLA, молекул MHC класса II HLA, Т-клеточного рецептора (TCR) альфа и/или TCR бета. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию Т-клеток, имеющих сниженную экспрессию молекул HLA MHC класса I, молекул HLA MHC класса II, и TCR альфа и сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47 и химерного антигенного рецептора CD19 (CAR). В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию Т-клеток, имеющих сниженную экспрессию молекул HLA MHC класса I, молекул HLA MHC класса II, и TCR бета и сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47 и химерного антигенного рецептора CD19 (CAR). В некоторых вариантах осуществления CAR связывает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD38, CD123, CD138, BCMA и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления экспрессия MHC класса I и/или MHC класса II подавлена. В некоторых вариантах осуществления сниженная экспрессия MHC класса I HLA опосредована сниженной экспрессией B2M, а сниженная экспрессия MHC класса II опосредована сниженной экспрессией CIITA. В некоторых вариантах осуществления экспрессия B2M и/или CIITA подавлена. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает антиген CD19 и представляет собой CAR к CD19. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает антиген CD20 и представляет собой CAR к CD20. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает антиген CD22 и представляет собой CAR к CD22. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает антиген CD38 и представляет собой CAR к CD38. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает антиген CD123 и представляет собой CAR к CD123. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает антиген CD138 и представляет собой CAR к CD138. В некоторых вариантах осуществления CAR связывает антиген BCMA и представляет собой CAR к BCMA.

[476] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой первичные клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки являются аллогенными. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки дифференцируются из иПСК. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки сконструированы таким образом, чтобы они имели сниженную экспрессию TCRα и/или TCRβ. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки сконструированы таким образом, чтобы они имели сниженную

экспрессию цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA4), и/или белка программируемой смерти клеток (PD1).

[477] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию Т клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки дополнительно сконструированы для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR). В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR к CD19, выбранный из группы, состоящей из тисагенлеклейсела, лизокабтагена маралейцела, аксикабтагена цилолейцела и брексукабтагена аутолейцела. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 представляет собой тисагенлеклейсел. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 представляет собой лизокабтаген. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 представляет собой маралейцел. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 представляет собой аксикабтаген. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 представляет собой цилолейцел. В некоторых вариантах осуществления CD19 CAR представляет собой брексукабтаген аутолейцел. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR к CD19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:117. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:116. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки сконструированы так, чтобы они экспрессировали по меньшей мере один дополнительный фактор, выбранный из группы, состоящей из CD16, CD24, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, ингибитора C1, FASL, IDO1, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IL-10, IL-35, PD-1, PD-L1, серпина b9, CCl21, Mfge8 и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD16. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD24. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD35. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD39. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD46. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD52. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD55. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD59. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD200. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CCL22. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CTLA4-Ig. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой ингибитор C1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой FASL. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой IDO1. В

некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой HLA-C. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой HLA-E. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой тяжелую цепь HLA-E. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой HLA-G. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой IL-10. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой IL-35. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой PD-1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой PD-L1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой серпин b9. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CCl21. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой Mfge8. В некоторых вариантах осуществления CAR и ген, кодирующий экзогенный полипептид CD47, вводили в Т-клетки в бицистронном векторе. В некоторых вариантах осуществления бицистронный вектор вводили в Т-клетки через лентивирус. В некоторых вариантах осуществления CAR и ген, кодирующий экзогенный полипептид CD47, находятся под контролем одного промотора.

[478] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, представляет собой способ уменьшения популяции клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47, у субъекта, включающий: (a) введение субъекту первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента; (b) определение первого результата первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, введенного в (a); (c) необязательно введение второй дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, на основании первого результата в (b); и (d) необязательно определение второго результата для второй дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, введенного в (c). В некоторых вариантах осуществления клетки дифференцируются из иПСК. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой дифференцированные клетки. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из сердечных клеток, нервных клеток, эндотелиальных клеток, Т-клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы, клеток кожи, клеток крови, первичных клеток и эпителиальных клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой первичные клетки. В некоторых вариантах осуществления первичные клетки представляют собой Т-клетки или островковые клетки поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления первичные клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления первичные клетки представляют собой островковые клетки поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы для экспрессии по меньшей мере одного дополнительного фактора, выбранного из группы, состоящей из CD16, CD24, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, ингибитора C1, FASL, IDO1, HLA-C, HLA-E, тяжелой

цепи HLA-E, HLA-G, IL-10, IL-35, PD-1, PD-L1, серпина b9, CCl21, Mfge8, и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD16. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD24. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD35. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD39. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD46. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD52. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD55. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD59. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD200. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CCL22. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CTLA4-Ig. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой ингибитор C1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой FASL. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой IDO1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой HLA-C. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой HLA-E. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой тяжелую цепь HLA-E. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой HLA-G. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой IL-10. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой IL-35. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой PD-1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой PD-L1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой серпин b9. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CCl21. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой Mfge8. В некоторых вариантах осуществления клетки имеют сниженную экспрессию молекул MHC класса I HLA и/или MHC класса II HLA. В некоторых вариантах осуществления экспрессия MHC класса I и/или MHC класса II подавлена. В некоторых вариантах осуществления сниженная экспрессия MHC класса I HLA опосредована сниженной экспрессией B2M, а сниженная экспрессия MHC класса II опосредована сниженной экспрессией CIITA. В некоторых вариантах осуществления экспрессия B2M и/или CIITA подавлена.

[479] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, представляет собой способ уменьшения популяции клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47, у субъекта, включающий: (a) введение субъекту первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента; (b)

определение первого результата первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, введенного в (a); (c) необязательно введение второй дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, на основании первого результата в (b); и (d) необязательно определение второго результата для второй дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, введенного в (c). В некоторых вариантах осуществления первый результат и второй результат независимо выбраны из группы, состоящей из: (i) уменьшения количества клеток на около 10-100%, (ii) ослабления нежелательного явления на около 10-100% и (iii) комбинации (i) и (ii). В некоторых вариантах осуществления первый результат и/или второй результат представляет собой нежелательное явление. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление выбрано из группы, состоящей из гиперпролиферации, трансформации, опухолеобразования, синдрома высвобождения цитокинов, реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), связанного с иммунными эффекторными клетками синдрома нейротоксичности (ICANS), воспаления, инфекции, тошноты, рвоты, кровотечения, интерстициального пневмонита, респираторного заболевания, желтухи, потери веса, диареи, потери аппетита, судорог, боли в животе, веноокклюзионной болезни печени (VOD), отторжения трансплантата, поражения органов, бесплодия, гормональных изменений, образования с аномальным ростом, катаракты и посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства (PTLD). В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой гиперпролиферацию. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой трансформацию. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой образование опухоли. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой синдром высвобождения цитокинов. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ). В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой связанный с иммунными эффекторными клетками синдром нейротоксичности (ICANS). В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой воспаление. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой инфекцию. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой тошноту. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой рвоту. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой кровотечение. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой интерстициальный пневмонит. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой респираторное заболевание. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой желтуху. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой потерю веса. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой диарею. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой потерю аппетита. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой

судороги. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой боль в животе. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой веноокклюзионную болезнь печени (VOD). В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой отторжение трансплантата. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой повреждение органов. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой бесплодие. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой гормональные изменения. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой образование с аномальным ростом. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой катаракту. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание (PTLD).

[480] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, представляет собой способ уменьшения популяции клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47, у субъекта, включающий: (a) введение субъекту первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента; (b) определение первого результата первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, введенного в (a); (c) необязательно введение второй дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, на основании первого результата в (b); и (d) необязательно определение второго результата для второй дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, введенного в (c). В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 10-15%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 15-20%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 20-25%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 25-30%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 30-35%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 35-40%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 40-45%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 45-50%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 50-55%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 55-60%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 60-65%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 65-70%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 70-75%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 75-80%. В некоторых

вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 80-85%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 85-90%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 90-95%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает уменьшение количества клеток на около 95-100%.

[481] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, представляет собой способ уменьшения популяции клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47, у субъекта, включающий: (a) введение субъекту первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента; (b) определение первого результата первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, введенного в (a); (c) необязательно введение второй дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, на основании первого результата в (b); и (d) необязательно определение второго результата для второй дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, введенного в (c). В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 10-15%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 15-20%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 20-25%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 25-30%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 30-35%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 35-40%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 40-45%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 45-50%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 50-55%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 55-60%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 60-65%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 65-70%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 70-75%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 75-80%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 80-85%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 85-90%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 90-95%. В некоторых вариантах осуществления первый результат включает ослабление нежелательного явления на около 95-100%.

[482] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, представляет собой способ уменьшения популяции клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47, у субъекта, включающий: (a) введение субъекту первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента; (b) определение первого результата первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, введенного в (a); (c) необязательно введение второй дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, на основании первого результата в (b); и (d) необязательно определение второго результата для второй дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, введенного в (c). В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 10-15%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 15-20%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 20-25%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 25-30%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 30-35%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 35-40%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 40-45%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 45-50%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 50-55%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 55-60%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 60-65%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 65-70%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 70-75%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 75-80%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 80-85%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 85-90%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 90-95%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает уменьшение количества клеток на около 95-100%.

[483] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, представляет собой способ уменьшения популяции клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47, у субъекта, включающий: (a) введение субъекту первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента; (b) определение первого результата первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, введенного в (a); (c) необязательно введение второй дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, на основании первого результата в (b); и (d) необязательно определение второго

результата для второй дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, введенного в (c). В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 10-15%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 15-20%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 20-25%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 25-30%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 30-35%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 35-40%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 40-45%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 45-50%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 50-55%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 55-60%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 60-65%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 65-70%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 70-75%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 75-80%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 80-85%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 85-90%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 90-95%. В некоторых вариантах осуществления второй результат включает ослабление нежелательного явления на около 95-100%.

[484] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает: (a) количественное определение популяции клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47 у субъекта; (b) определение первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, который эффективен для уменьшения популяции клеток по меньшей мере на 20%; и (c) введение субъекту первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента. В некоторых вариантах осуществления клетки дифференцируются из иПСК. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой дифференцированные клетки. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из сердечных клеток, нервных клеток, эндотелиальных клеток, Т-клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы, клеток кожи, клеток крови, первичных клеток и эпителиальных клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой первичные клетки. В некоторых

вариантах осуществления первичные клетки представляют собой Т-клетки или островковые клетки поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления первичные клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления первичные клетки представляют собой островковые клетки поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы для экспрессии по меньшей мере одного дополнительного фактора, выбранного из группы, состоящей из CD16, CD24, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, ингибитора C1, FASL, IDO1, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IL-10, IL-35, PD-1, PD-L1, серпина b9, CCl21, Mfge8, и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD16. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD24. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD35. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD39. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD46. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD52. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD55. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD59. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD200. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CCL22. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CTLA4-Ig. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой ингибитор C1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой FASL. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой IDO1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой HLA-C. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой HLA-E. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой тяжелую цепь HLA-E. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой HLA-G. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой IL-10. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой IL-35. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой PD-1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой PD-L1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой серпин b9. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CCl21. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой Mfge8. В некоторых вариантах осуществления клетки имеют сниженную экспрессию молекул MHC класса I HLA и/или MHC класса II HLA. В некоторых вариантах осуществления экспрессия MHC класса I и/или MHC класса II подавлена. В некоторых вариантах осуществления сниженная экспрессия MHC класса I

HLA опосредована сниженной экспрессией B2M, а сниженная экспрессия MHC класса II опосредована сниженной экспрессией CIITA. В некоторых вариантах осуществления экспрессия B2M и/или CIITA подавлена.

[485] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает: (a) количественное определение популяции клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47 у субъекта; (b) определение первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, который эффективен для уменьшения популяции клеток по меньшей мере на 20%; и (c) введение субъекту первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента. В некоторых вариантах осуществления первая доза эффективна для снижения популяции клеток на около 20-30%. В некоторых вариантах осуществления первая доза эффективна для снижения популяции клеток на около 30-40%. В некоторых вариантах осуществления первая доза эффективна для снижения популяции клеток на около 40-50%. В некоторых вариантах осуществления первая доза эффективна для снижения популяции клеток на около 50-60%. В некоторых вариантах осуществления первая доза эффективна для снижения популяции клеток на около 60-70%. В некоторых вариантах осуществления первая доза эффективна для снижения популяции клеток на около 70-80%. В некоторых вариантах осуществления первая доза эффективна для снижения популяции клеток на около 80-90%. В некоторых вариантах осуществления первая доза эффективна для снижения популяции клеток на около 90-100%.

[486] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает: (a) количественное определение популяции клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47 у субъекта; (b) определение первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, который эффективен для уменьшения популяции клеток по меньшей мере на 20%; и (c) введение субъекту первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят: (i) 0,05, 0,1, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг; (ii) один раз каждые 12 часов, один раз каждые 24 часа, один раз каждые 36 часов или один раз каждые 48 часов; и/или (iii) от 1 дня до 3 недель. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая дозы одинаковы. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в дозе 0,05 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в дозе 0,1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в дозе 0,3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в дозе 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в дозе 3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в дозе 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в количестве от около 0,01 мг/кг до около 20 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в количестве от около 0,01 мг/кг до около 0,05 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в количестве от около

0,05 мг/кг до около 0,1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в количестве от около 0,1 мг/кг до около 0,5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в количестве от около 0,5 мг/кг до около 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в количестве от около 1 мг/кг до около 5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в количестве от около 5 мг/кг до около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в диапазоне от около 10 мг/кг до около 15 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в количестве от около 15 мг/кг до около 20 мг/кг.

[487] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает: (a) количественное определение популяции клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47 у субъекта; (b) определение первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, который эффективен для уменьшения популяции клеток по меньшей мере на 20%; и (c) введение субъекту первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 6 часов. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 12 часов. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 18 часов. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 24 часов. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 36 часов. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 48 часов. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 3 дня. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 4 дня. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 5 дней. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 6 дней. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 7 дней. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 8 недель. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 3 месяца. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 4 месяца. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 5 месяцев. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз

каждые от около 6 месяцев до около 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 18 месяцев. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 24 месяцев. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 3 года. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 4 года. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят один раз каждые 5 лет.

[488] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает: (a) количественное определение популяции клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47 у субъекта; (b) определение первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, который эффективен для уменьшения популяции клеток по меньшей мере на 20%; и (c) введение субъекту первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 1 дня до около 50 лет. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 1 дня до около 1 недели. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 1 недели до около 2 недель. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 2 недель до около 3 недель. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 3 недель до около 1 месяца. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 1 месяца до около 2 месяцев. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 2 месяцев до около 3 месяцев. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 3 месяцев до около 4 месяцев. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 4 месяцев до около 5 месяцев. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 5 месяцев до около 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 6 месяцев до около 1 года. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 1 года до около 2 лет. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 2 лет до около 3 лет. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 3 лет до около 4 лет. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 4 лет до около 5 лет. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 5 лет до около 10 лет. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 10 лет до около 15 лет. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 15 лет до около 20 лет. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 20 лет до около 30 лет. В некоторых вариантах

осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 30 лет до около 40 лет. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение от около 40 лет до около 50 лет. В некоторых вариантах осуществления первую дозу и/или вторую дозу вводят в течение всей жизни субъекта.

[489] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию островковых клеток поджелудочной железы, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию островковых клеток поджелудочной железы (i), сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47, и (ii) имеющих сниженную экспрессию молекул MHC класса I HLA и/или MHC класса II HLA. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию островковых клеток поджелудочной железы (i), сконструированных для экспрессии экзогенных полипептидов CD47, CD46 и CD59 и (ii) имеющих сниженную экспрессию молекул MHC класса I HLA и/или молекул MHC класса II HLA. В некоторых вариантах осуществления экспрессия MHC класса I и/или MHC класса II подавлена. В некоторых вариантах осуществления сниженная экспрессия MHC класса I HLA опосредована сниженной экспрессией B2M, а сниженная экспрессия MHC класса II опосредована сниженной экспрессией CIITA. В некоторых вариантах осуществления экспрессия B2M и/или CIITA подавлена. В некоторых вариантах осуществления островковые клетки поджелудочной железы сконструированы таким образом, чтобы они имели сниженную экспрессию CD142. В некоторых вариантах осуществления островковые клетки поджелудочной железы представляют собой первичные клетки. В некоторых вариантах осуществления островковые клетки поджелудочной железы дифференцируются из иПСК.

[490] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию островковых клеток поджелудочной железы, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления островковые клетки поджелудочной железы сконструированы для экспрессии по меньшей мере одного дополнительного фактора, выбранного из группы, состоящей из CD16, CD24, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, ингибитора C1, FASL, IDO1, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IL-10, IL-35, PD-1, PD-L1, серпина b9, CCl21, Mfge8, и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD16. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD24. В некоторых вариантах осуществления

дополнительный фактор представляет собой CD35. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD39. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD46. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD52. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD55. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD59. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CD200. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CCL22. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CTLA4-Ig. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой ингибитор C1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой FASL. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой IDO1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой HLA-C. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой HLA-E. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой тяжелую цепь HLA-E. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой HLA-G. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой IL-10. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой IL-35. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой PD-1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой PD-L1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой серпин b9. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой CCl21. В некоторых вариантах осуществления дополнительный фактор представляет собой Mfge8.

[491] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления ген, кодирующий экзогенный полипептид CD47, вводили в клетку посредством опосредованной гомологичной репарацией (HDR) вставки в геномный локус клетки. В некоторых вариантах осуществления геномный локус выбран из группы, состоящей из локуса B2M, локуса CIITA, локуса TRAC, локуса TRBC и локуса «безопасная гавань». В некоторых вариантах осуществления геномный локус представляет собой локус B2M. В некоторых вариантах осуществления геномный локус представляет собой локус CIITA. В некоторых вариантах осуществления геномный локус представляет собой локус TRAC. В некоторых вариантах осуществления геномный локус представляет собой локус TRBC. В некоторых вариантах осуществления геномный локус представляет собой локус «безопасная гавань». В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» выбран из группы, состоящей из локуса AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1,

HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26, и SHS231. В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» представляет собой локус AAVS1. В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» представляет собой локус ABO. В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» представляет собой локус CCR5. В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» представляет собой локус CLYBL. В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» представляет собой локус CXCR4. В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» представляет собой локус F3. В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» представляет собой локус FUT1. В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» представляет собой локус HMGB1. В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» представляет собой локус KDM5D. В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» представляет собой локус LRP1. В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» представляет собой локус MICA. В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» представляет собой локус MICB. В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» представляет собой локус RHD. В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» представляет собой локус ROSA26. В некоторых вариантах осуществления локус «безопасная гавань» представляет собой локус SHS231. В некоторых вариантах осуществления в клетке снижена экспрессия молекул MHC класса I HLA и/или молекул MHC класса II HLA. В некоторых вариантах осуществления экспрессия MHC класса I и/или MHC класса II подавлена. В некоторых вариантах осуществления сниженная экспрессия MHC класса I HLA опосредована сниженной экспрессией B2M, а сниженная экспрессия MHC класса II опосредована сниженной экспрессией CIITA. В некоторых вариантах осуществления экспрессия B2M и/или CIITA подавлена.

[492] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через один день после того, как субъекту вводили клетки. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через два дня после того, как субъекту ввели клетки. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через три дня после того, как субъекту ввели клетки. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через четыре дня после того, как субъекту ввели клетки. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через пять дней после того, как субъекту ввели клетки. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через шесть дней после того, как субъекту ввели клетки. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей

мере через одну неделю после того, как субъекту ввели клетки. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через две недели после того, как субъекту ввели клетки. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через три недели после того, как субъекту ввели клетки. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через один месяц после того, как субъекту ввели клетки. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через два месяца после того, как субъекту ввели клетки. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через три месяца после того, как субъекту ввели клетки. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через четыре месяца после того, как субъекту ввели клетки. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере пять месяцев после того, как субъекту ввели клетки. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере шесть месяцев после того, как субъекту ввели клетки. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через 1 год после того, как субъекту ввели клетки.

[493] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят после того, как у субъекта наблюдается нежелательное явление, связанное с введенными клетками. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление выбрано из группы, состоящей из гиперпролиферации, трансформации, опухолеобразования, синдрома высвобождения цитокинов, реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), связанного с иммунными эффекторными клетками синдрома нейротоксичности (ICANS), воспаления, инфекции, тошноты, рвоты, кровотечения, интерстициального пневмонита, респираторного заболевания, желтухи, потери веса, диареи, потери аппетита, судорог, боли в животе, вено окклюзионной болезни печени (VOD), отторжения трансплантата, поражения органов, бесплодия, гормональных изменений, образования с аномальным ростом, катаракты и посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства (PTLD). В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой гиперпролиферацию. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой трансформацию. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой образование опухоли. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой синдром высвобождения цитокинов. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ). В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой связанный с иммунными

эффекторными клетками синдром нейротоксичности (ICANS). В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой воспаление. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой инфекцию. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой тошноту. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой рвоту. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой кровотечение. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой интерстициальный пневмонит. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой респираторное заболевание. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой желтуху. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой потерю веса. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой диарею. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой потерю аппетита. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой судороги. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой боль в животе. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой веноокклюзионную болезнь печени (VOD). В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой отторжение трансплантата. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой повреждение органов. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой бесплодие. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой гормональные изменения. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой образование с аномальным ростом. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой катаракту. В некоторых вариантах осуществления нежелательное явление представляет собой посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание (PTLD).

[494] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент содержит CD47-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления CD47-связывающий домен содержит сигнальный регуляторный белок альфа (SIRPα) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент содержит домен Fc иммуноглобулина G (IgG). В некоторых вариантах осуществления домен Fc IgG включает домен Fc IgG1. В некоторых вариантах осуществления домен Fc IgG1 включает фрагмент человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из TTI-621, TTI-622 и ALX148. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой TTI-621, TTI-622 и ALX148. В

некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой TTI-622. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой ALX148. В некоторых вариантах осуществления домен Fc IgG включает домен Fc IgG4. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из MIAP410, B6H12 и магролимаба. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой MIAP410. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой B6H12. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой магролимаб.

[495] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят в дозе, эффективной для уменьшения популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток уменьшают на около 10-100%. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток уменьшают на около 10-20%. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток уменьшают на около 20-30%. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток уменьшают на около 30-40%. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток уменьшают на около 40-50%. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток уменьшают на около 50-60%. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток уменьшают на около 60-70%. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток уменьшают на около 70-80%. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток уменьшают на около 80-90%. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток уменьшают на около 90-100%. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток элиминируют. В некоторых вариантах осуществления уменьшение популяции клеток происходит посредством иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой опосредованное NK-клетками уничтожение клеток, опосредованное макрофагами уничтожение клеток, комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ) и/или антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ). В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой опосредованное NK-клетками уничтожение клеток. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой опосредованное макрофагами уничтожение клеток. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ) в отношении клеток. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) в отношении клеток.

[496] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных

для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту внутривенно, подкожно, внутрибрюшинно, внутримышечно или интракраниально. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту внутривенно. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту подкожно. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту внутрибрюшинно. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту интракраниально.

[497] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом от 1 до 20 дней в течение периода от 10 дней до 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом от 1 до 2 дней в течение периода от 10 дней до 6 месяцев, блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом от 2 до 3 дней в течение периода от 10 дней до 6 месяцев, блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом от 3 до 4 дней в течение периода от 10 дней до 6 месяцев, блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом от 4 до 5 дней в течение периода от 10 дней до 6 месяцев, блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом от 5 до 6 дней в течение периода от 10 дней до 6 месяцев, блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом от 6 до 7 дней в течение периода от 10 дней до 6 месяцев, блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом от 7 до 10 дней в течение периода от 10 дней до 6 месяцев, блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом от 10 до 15 дней в течение периода от 10 дней до 6 месяцев, блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом от 15 до 20 дней в течение периода от 10 дней до 6 месяцев.

[498] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом от 1 до 10 дней в течение периода 10-15 дней. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом от 1 до 15 дней в течение периода 15-20 дней. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом от 1 до 20 дней в течение периода 20-25 дней. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом 1-20 дней в течение периода 25-30 дней. В некоторых

вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом 1-20 дней в течение периода 1-2 месяцев. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом 1-20 дней в течение периода 2-3 месяцев. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом 1-20 дней в течение периода 3-4 месяцев. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом 1-20 дней в течение периода 4-5 месяцев. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом 1-20 дней в течение периода от 5-6 месяцев.

[499] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту: (i) 0,05, 0,1, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг; (ii) один раз каждые 12 часов, один раз каждые 24 часа, один раз каждые 36 часов или один раз каждые 48 часов; и/или (iii) от 1 дня до 3 недель. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят в дозе 0,05 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в дозе 0,1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в дозе 0,3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в дозе 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в дозе 3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в дозе 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в дозе от около 0,01 мг/кг до около 20 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в дозе от около 0,01 мг/кг до около 0,05 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в дозе от около 0,05 мг/кг до около 0,1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в дозе от около 0,1 мг/кг до около 0,5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в дозе от около 0,5 мг/кг до около 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в дозе от около 1 мг/кг до около 5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в дозе от около 5 мг/кг до около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в дозе от около 10 мг/кг до около 15 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в дозе от около 15 мг/кг до около 20 мг/кг.

[500] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-

SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 6 часов. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 12 часов. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 18 часов. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 24 часа. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 36 часов. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 48 часов. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 3 дня. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 4 дня. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 5 дней. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 6 дней. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 7 дня. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 6 недель. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 8 недель. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 3 месяца. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 4 месяца. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 5 месяцев. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые от около 6 месяцев до около 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 18 месяцев. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 24 месяцев. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 3 года. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 4 года. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту один раз каждые 5 лет.

[501] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления

блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 1 дня до около 50 лет. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 1 дня до около 1 недели. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 1 недели до около 2 недель. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 2 недель до около 3 недель. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 3 недель до около 1 месяца. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 1 месяца до около 2 месяца. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 2 месяцев до около 3 месяцев. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 3 месяцев до около 4 месяцев. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 4 месяцев до около 5 месяцев. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 5 месяцев до около 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 6 месяцев до около 1 года. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 1 года до около 2 лет. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 2 лет до около 3 лет. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 3 лет до около 4 лет. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 4 лет до около 5 лет. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 5 лет до около 10 лет. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 10 лет до около 15 лет. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 15 лет до около 20 лет. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 20 лет до около 30 лет. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 30 лет до около 40 лет. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение от около 40 лет до около 50 лет. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту в течение всей жизни субъекта.

[502] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, дополнительно включают введение субъекту IL-2.

[503] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, которое связывает CD47, биспецифического антитела, которое связывает CD47, слитого белка иммуноцитокина, которое связывает CD47, CD47-содержащего слитого белка, антитела или его фрагмента, которое связывает SIRPα, биспецифического антитела, которое связывает SIRPα, слитого белка иммуноцитокина, который связывает SIRPα, слитого белка, содержащего SIRPα, и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой антитело или его фрагмент, которое связывает CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой биспецифическое антитело, которое связывает CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой слитый белок иммуноцитокина, который связывает CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой слитый белок, содержащий CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой биспецифическое антитело, которое связывает SIRPα. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой слитый белок иммуноцитокина, который связывает SIRPα. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой слитый белок, содержащий SIRPα.

[504] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, которое связывает CD47, биспецифического антитела, которое связывает CD47, слитого белка иммуноцитокина, которое связывает CD47, CD47-содержащего слитого белка, антитела или его фрагмента, которое связывает SIRPα, биспецифического антитела, которое связывает SIRPα, слитого белка иммуноцитокина, который связывает SIRPα, слитого белка, содержащего SIRPα, и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбраны из группы, состоящей из магролимаба (Hu5F9-G4), CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801 (NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, и IMC-002. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляют собой магролимаб (Hu5F9-G4). В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47,

представляет собой CC-90002. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой IBI-188. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой IBI-322. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой TG-1801 (NI-1701). В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой ALX148. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой TJ011133. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой FA3M3. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой ZL1201. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой AK117. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой AO-176. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой SRF231. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой GenSci-059. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой C47B157. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой C47B161. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой C47B167. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой C47B222. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой C47B227. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой Vx-1004. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой HMBD004. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой SHR-1603. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой AMMS4-G4. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой RTX-CD47. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой IMC-002.

[505] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, которое связывает CD47, биспецифического антитела, которое связывает CD47, слитого белка иммуноцитокина, которое связывает CD47, CD47-содержащего слитого белка, антитела или его фрагмента, которое связывает SIRPα, биспецифического

антитела, которое связывает SIRPα, слитого белка иммуноцитокина, который связывает SIRPα, слитого белка, содержащего SIRPα, и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против CD47, фрагмента Fab против CD47, наноантитела VHH против CD47, DARPin против CD47 и их вариантов. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv) против CD47 и его варианты. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой Fab против CD47 и его варианты. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой наноантитело VHH против CD47 и его варианты. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, представляет собой DARPin против CD47 и его варианты.

[506] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, которое связывает CD47, биспецифического антитела, которое связывает CD47, слитого белка иммуноцитокина, которое связывает CD47, CD47-содержащего слитого белка, антитела или его фрагмента, которое связывает SIRPα, биспецифического антитела, которое связывает SIRPα, слитого белка иммуноцитокина, который связывает SIRPα, слитого белка, содержащего SIRPα, и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из ADU-1805, CC-95251, OSE-172 (BI 765063), KWAR23, и P362. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, представляет собой ADU-1805. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, представляет собой CC-95251. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, представляет собой OSE-172 (BI 765063). В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, представляет собой KWAR23. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, представляет собой P362.

[507] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, которое связывает CD47, биспецифического антитела, которое связывает CD47, слитого белка иммуноцитокина, которое связывает CD47, CD47-содержащего

слитого белка, антитела или его фрагмента, которое связывает SIRPα, биспецифического антитела, которое связывает SIRPα, слитого белка иммуноцитокина, который связывает SIRPα, слитого белка, содержащего SIRPα, и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против SIRPα, Fab против SIRPα, наноантитела VHH против SIRPα, DARPin против SIRPα и их вариантов. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv) против SIRPα и его варианты. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, представляет собой Fab против SIRPα и его варианты. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, представляет собой наноантитело VHH против SIRPα и его варианты. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, представляет собой DARPin против SIRPα и его варианты.

[508] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, которое связывает CD47, биспецифического антитела, которое связывает CD47, слитого белка иммуноцитокина, которое связывает CD47, CD47-содержащего слитого белка, антитела или его фрагмента, которое связывает SIRPα, биспецифического антитела, которое связывает SIRPα, слитого белка иммуноцитокина, который связывает SIRPα, слитого белка, содержащего SIRPα, и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления SIRPα-содержащий слитый белок содержит CD47-связывающий домен SIRPα, связанный с доменом Fc. В некоторых вариантах осуществления домен Fc содержит домен Fc или его часть, выбранные из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления домен Fc содержит домен Fc или его часть, которая представляет собой IgG1. В некоторых вариантах осуществления домен Fc содержит домен Fc или его часть, которая представляет собой IgG2. В некоторых вариантах осуществления домен Fc содержит домен Fc или его часть, которая представляет собой IgG3. В некоторых вариантах осуществления домен Fc содержит домен Fc или его часть, которая представляет собой IgG4.

[509] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления экзогенный полипептид CD47 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления экзогенный полипептид CD47 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых

вариантах осуществления экзогенный полипептид CD47 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления экзогенный полипептид CD47 содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности эндогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления экзогенный полипептид CD47 содержит аминокислотную последовательность, которая сходна аминокислотной последовательности эндогенного полипептида CD47. В некоторых вариантах осуществления экзогенный полипептид CD47 содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности эндогенного полипептида CD47.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[510] Вариант осуществления 1. Способ, включающий введение агента, блокирующего CD47 - сигнальный регуляторный белок альфа (SIRPα), пациенту, которому ранее вводили популяцию клеток, содержащую экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47.

[511] Вариант осуществления 2. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, которое связывает CD47, биспецифического антитела, которое связывает CD47, слитого белка иммуноцитокина, которое связывает CD47, CD47-содержащего слитого белка, антитела или его фрагмента, которое связывает SIRPα, биспецифического антитела, которое связывает SIRPα, слитого белка иммуноцитокина, который связывает SIRPα, слитого белка, содержащего SIRPα, и их комбинации.

[512] Вариант осуществления 3. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из магролимаба, (Hu5F9-G4), CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801 (NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, и IMC-002.

[513] Вариант осуществления 4. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против CD47, Fab против CD47, наноантитела VHH против CD47, DARPin против CD47 и их вариантов.

[514] Вариант осуществления 5. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из ADU-1805, CC-95251, OSE-172 (BI 765063), KWAR23, и P362.

[515] Вариант осуществления 6. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного

фрагмента Fv (scFv) против SIRPα, Fab против SIRPα, наноантитела VHH против SIRPα, DARPin против SIRPα и их вариантов.

[516] Вариант осуществления 7. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что SIRPα-содержащий слитый белок содержит CD47-связывающий домен SIRPα, связанный с доменом Fc.

[517] Вариант осуществления 8. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что домен Fc содержит домен Fc или его часть, выбранные из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[518] Вариант осуществления 9. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что введение блокирующего CD47-SIRPα агента снижает численность популяции клеток, остающихся жизнеспособными у пациента.

[519] Вариант осуществления 10. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что введение блокирующего CD47-SIRPα агента снижает количество клеток, экзогенно экспрессирующих пептиды CD47, у пациента.

[520] Вариант осуществления 11. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что введение блокирующего CD47-SIRPα агента происходит после того, как у пациента возникло нежелательное явление после введения популяции клеток.

[521] Вариант осуществления 12. Способ в соответствии с любым из приведенных выше или ниже вариантов осуществления,, отличающийся тем, что нежелательное явление выбрано из группы, состоящей из гиперпролиферации, трансформации, образования опухоли, синдрома высвобождения цитокинов, реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и связанного с иммунными эффекторными клетками синдрома нейротоксичности (ICANS).

[522] Вариант осуществления 13. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что введение блокирующего CD47-SIRPα агента проводят по меньшей мере через 1 неделю или более после введения популяции клеток.

[523] Вариант осуществления 14. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что введение блокирующего CD47-SIRPα агента проводят по меньшей мере через 1 месяц или более после введения популяции клеток.

[524] Вариант осуществления 15. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно имеют сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и/или MHC II.

[525] Вариант осуществления 16. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки

дополнительно имеют сниженную экспрессию одного или более комплексов TCR.

[526] Вариант осуществления 17. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно содержат один или более трансгенов, при этом трансген кодирует экзогенно экспрессируемый полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, CCL21, Mfge8 и Serpin B9.

[527] Вариант осуществления 18. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, состоящей из CD24, CD46, CD55, CD59, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, CD200, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9, и любой их комбинации.

[528] Вариант осуществления 19. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA.

[529] Вариант осуществления 20. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемый полипептид CD47 и дополнительно имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA.

[530] Вариант осуществления 21. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47, имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, выбранной из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, HLA-G, IDO1, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9 и любой их комбинации.

[531] Вариант осуществления 22. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47, имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, выбранной из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, HLA-G, IDO1, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9, и любой их комбинации.

[532] Вариант осуществления 23. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно имеют сниженный уровень экспрессии TCRα, TCRβ или обоих.

[533] Вариант осуществления 24. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки представляют собой дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток.

[534] Вариант осуществления 25. Способ по любому из вышеприведенных или

нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что плюрипотентные стволовые клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

[535] Вариант осуществления 26. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из клеток сердца, нервных клеток, эндотелиальных клеток, Т-клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы, клеток кожи, клеток крови и эпителиальных клеток.

[536] Вариант осуществления 27. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки включают клетки, полученные из первичных Т-клеток.

[537] Вариант осуществления 28. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, полученных из пула первичных Т-клеток, включающего первичные Т-клетки из 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.

[538] Вариант осуществления 29. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор (CAR).

[539] Вариант осуществления 30. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что CAR и экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 экспрессируются под контролем одного промотора.

[540] Вариант осуществления 31. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что CAR связывает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, CD22, CD38, CD123, CD138 и BCMA.

[541] Вариант осуществления 32. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

[542] Вариант осуществления 33. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA4), и/или белка программируемой смерти клеток (PD1).

[543] Вариант осуществления 34. Способ, включающий: (a) введение пациенту количества популяции клеток, содержащей экзогенно экспрессируемый CD47; и (b) введение пациенту количества блокирующего CD47-SIRPα агента, эффективного для снижения количества клеток и их производных у пациента.

[544] Вариант осуществления 35. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки

дополнительно имеют сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и/или MHC класса II.

[545] Вариант осуществления 36. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки имеют сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и MHC класса II.

[546] Вариант осуществления 37. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно имеют сниженную экспрессию одного или более комплексов TCR.

[547] Вариант осуществления 38. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, состоящей из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9, и любой их комбинации.

[548] Вариант осуществления 39. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно содержат один или более трансгенов, при этом трансген кодирует экзогенно экспрессируемый полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8 и Serpin B9.

[549] Вариант осуществления 40. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA.

[550] Вариант осуществления 41. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA.

[551] Вариант осуществления 42. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47, имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, выбранной из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9 и любой их комбинации.

[552] Вариант осуществления 43. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47, имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, выбранной из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9, и любой их комбинации.

[553] Вариант осуществления 44. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно имеют сниженный уровень экспрессии TCRα, TCRβ или обоих.

[554] Вариант осуществления 45. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки представляют собой дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток.

[555] Вариант осуществления 46. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что плюрипотентные стволовые клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

[556] Вариант осуществления 47. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из клеток сердца, нервных клеток, эндотелиальных клеток, Т-клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы, клеток кожи, клеток крови и эпителиальных клеток.

[557] Вариант осуществления 48. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки включают клетки, полученные из первичных Т-клеток.

[558] Вариант осуществления 49. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, полученных из пула первичных Т-клеток, включающего первичные Т-клетки из 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.

[559] Вариант осуществления 50. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор (CAR).

[560] Вариант осуществления 51. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что CAR и экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 экспрессируются под контролем одного промотора.

[561] Вариант осуществления 52. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что CAR связывает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, CD22, CD38, CD123, CD138 и BCMA.

[562] Вариант осуществления 53. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

[563] Вариант осуществления 54. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные

из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA4), и/или белка программируемой смерти клеток (PD1).

[564] Вариант осуществления 55. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, которое связывает CD47, биспецифического антитела, которое связывает CD47, слитого белка иммуноцитокина, которое связывает CD47, CD47-содержащего слитого белка, антитела или его фрагмента, которое связывает SIRPα, биспецифического антитела, которое связывает SIRPα, слитого белка иммуноцитокина, который связывает SIRPα, слитого белка, содержащего SIRPα, и их комбинации.

[565] Вариант осуществления 56. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из магролимаба, (Hu5F9-G4), CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801 (NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, и IMC-002.

[566] Вариант осуществления 57. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против CD47, Fab против CD47, наноантитела VHH против CD47, DARPin против CD47 и их вариантов.

[567] Вариант осуществления 58. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из ADU-1805, CC-95251, OSE-172 (BI 765063), KWAR23, и P362.

[568] Вариант осуществления 59. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против SIRPα, Fab против SIRPα, наноантитела VHH против SIRPα, DARPin против SIRPα и их вариантов.

[569] Вариант осуществления 60. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что SIRPα-содержащий слитый белок содержит CD47-связывающий домен SIRPα, связанный с доменом Fc.

[570] Вариант осуществления 61. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что домен Fc содержит домен Fc или его часть, выбранные из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[571] Вариант осуществления 62. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что введение блокирующего CD47-SIRPα агента происходит, когда у пациента возникает нежелательное явление после введения популяции клеток.

[572] Вариант осуществления 63. Способ в соответствии с любым из приведенных выше или ниже вариантов осуществления,, отличающийся тем, что нежелательное явление выбрано из группы, состоящей из гиперпролиферации, трансформации, образования опухоли, синдрома высвобождения цитокинов, реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и связанного с иммунными эффекторными клетками синдрома нейротоксичности (ICANS).

[573] Вариант осуществления 64. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что введение блокирующего CD47-SIRPα агента проводят по меньшей мере через 1 неделю или более после введения популяции клеток.

[574] Вариант осуществления 65. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что введение блокирующего CD47-SIRPα агента проводят по меньшей мере через 1 месяц или более после введения популяции клеток.

[575] Вариант осуществления 66. Способ, включающий: (a) введение пациенту популяции клеток, причем клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47; и (b) введение блокирующего CD47-SIRPα агента пациенту через временной интервал после стадии (a), при этом временной интервал составляет по меньшей мере 1 неделю или более.

[576] Вариант осуществления 67. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки имеют сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и/или MHC класса II.

[577] Вариант осуществления 68. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки имеют сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и MHC класса II.

[578] Вариант осуществления 69. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно имеют сниженную экспрессию одного или более комплексов TCR.

[579] Вариант осуществления 70. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, состоящей из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9, и любой их комбинации.

[580] Вариант осуществления 71. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно содержат один или более трансгенов, при этом трансген кодирует экзогенно экспрессируемый полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD24,

CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8 и Serpin B9.

[581] Вариант осуществления 72. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки экспрессируют экзогенные полипептиды CD47 и дополнительно имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA.

[582] Вариант осуществления 73. Способ в соответствии с любым из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки экспрессируют экзогенные полипептиды CD47 и дополнительно имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA.

[583] Вариант осуществления 74. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47, имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, выбранной из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9 и любой их комбинации.

[584] Вариант осуществления 75. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47, имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, выбранной из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9, и любой их комбинации.

[585] Вариант осуществления 76. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно имеют сниженный уровень экспрессии TCRα, TCRβ или обоих.

[586] Вариант осуществления 77. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки включают дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток.

[587] Вариант осуществления 78. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что плюрипотентные стволовые клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

[588] Вариант осуществления 79. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из клеток сердца, нервных клеток, эндотелиальных клеток, Т-клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы, клеток кожи, клеток крови и эпителиальных клеток.

[589] Вариант осуществления 80. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки включают клетки, полученные из первичных Т-клеток.

[590] Вариант осуществления 81. Способ по любому из вышеприведенных или

нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, полученных из пула первичных Т-клеток, включающего первичные Т-клетки из 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.

[591] Вариант осуществления 82. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор (CAR).

[592] Вариант осуществления 83. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что CAR и экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 экспрессируются под контролем одного промотора.

[593] Вариант осуществления 84. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что CAR связывает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, CD22, CD38, CD123, CD138 и BCMA.

[594] Вариант осуществления 85. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

[595] Вариант осуществления 86. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA4), и/или белка программируемой смерти клеток (PD1).

[596] Вариант осуществления 87. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что временной интервал составляет по меньшей мере 1 месяц или более.

[597] Вариант осуществления 88. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, которое связывает CD47, биспецифического антитела, которое связывает CD47, слитого белка иммуноцитокина, которое связывает CD47, CD47-содержащего слитого белка, антитела или его фрагмента, которое связывает SIRPα, биспецифического антитела, которое связывает SIRPα, слитого белка иммуноцитокина, который связывает SIRPα, слитого белка, содержащего SIRPα, и их комбинации.

[598] Вариант осуществления 89. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из магролимаба, (Hu5F9-G4), CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801 (NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, и IMC-002.

[599] Вариант осуществления 90. Способ по любому из вышеприведенных или

нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против CD47, Fab против CD47, наноантитела VHH против CD47, DARPin против CD47 и их вариантов.

[600] Вариант осуществления 91. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из ADU-1805, CC-95251, OSE-172 (BI 765063), KWAR23, и P362.

[601] Вариант осуществления 92. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против SIRPα, Fab против SIRPα, наноантитела VHH против SIRPα, DARPin против SIRPα и их вариантов.

[602] Вариант осуществления 93. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что SIRPα-содержащий слитый белок содержит CD47-связывающий домен SIRPα, связанный с доменом Fc.

[603] Вариант осуществления 94. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что домен Fc содержит домен Fc или его часть, выбранные из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[604] Вариант осуществления 95. Способ в соответствии с любым из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что на стадии (b) снижается численность популяции клеток, остающихся жизнеспособными у пациента.

[605] Вариант осуществления 96. Способ в соответствии с любым из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что на стадии (b) у пациента снижается количество клеток, экзогенно экспрессирующих пептиды CD47.

[606] Вариант осуществления 97. Способ в соответствии с любым из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, дополнительно включающий введение второй популяции клеток после стадии (b).

[607] Вариант осуществления 98. Способ модулирования активности клеточной терапии у пациента, при этом пациент получил по меньшей мере одну дозу терапевтически эффективной популяции клеток, содержащей экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47, причем способ включает введение пациенту блокирующего CD47-SIRPα агента в количестве, эффективном для модуляции активности популяции клеток.

[608] Вариант осуществления 99. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, которое связывает CD47, биспецифического антитела, которое связывает CD47, слитого белка иммуноцитокина, которое связывает CD47, CD47-содержащего слитого белка, антитела

или его фрагмента, которое связывает SIRPα, биспецифического антитела, которое связывает SIRPα, слитого белка иммуноцитокина, который связывает SIRPα, слитого белка, содержащего SIRPα, и их комбинации.

[609] Вариант осуществления 100. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из магролимаба, (Hu5F9-G4), CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801 (NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, и IMC-002.

[610] Вариант осуществления 101. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против CD47, Fab против CD47, наноантитела VHH против CD47, DARPin против CD47 и их вариантов.

[611] Вариант осуществления 102. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из ADU-1805, CC-95251, OSE-172 (BI 765063), KWAR23, и P362.

[612] Вариант осуществления 103. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против SIRPα, Fab против SIRPα, наноантитела VHH против SIRPα, DARPin против SIRPα и их вариантов.

[613] Вариант осуществления 104. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что SIRPα-содержащий слитый белок содержит CD47-связывающий домен SIRPα, связанный с доменом Fc.

[614] Вариант осуществления 105. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что домен Fc содержит домен Fc или его часть, выбранные из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[615] Вариант осуществления 106. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки имеют сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и/или MHC класса II.

[616] Вариант осуществления 107. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки имеют сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и MHC класса II.

[617] Вариант осуществления 108. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно имеют сниженную экспрессию одного или более комплексов TCR.

[618] Вариант осуществления 109. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, состоящей из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9, и любой их комбинации.

[619] Вариант осуществления 110. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно содержат один или более трансгенов, при этом трансген кодирует экзогенно экспрессируемый полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8 и Serpin B9.

[620] Вариант осуществления 111. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA.

[621] Вариант осуществления 112. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA.

[622] Вариант осуществления 113. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47, имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, выбранной из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9 и любой их комбинации.

[623] Вариант осуществления 114. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47, имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, выбранной из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9, и любой их комбинации.

[624] Вариант осуществления 115. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно имеют сниженный уровень экспрессии TCRα, TCRβ или обоих.

[625] Вариант осуществления 116. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что по меньшей мере одна доза терапевтически эффективной популяции клеток включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доз популяции.

[626] Вариант осуществления 117. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что модулирование

включает уменьшение количества терапевтически эффективной популяции клеток у пациента.

[627] Вариант осуществления 118. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки включают дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток.

[628] Вариант осуществления 119. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что плюрипотентные стволовые клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

[629] Вариант осуществления 120. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из клеток сердца, нервных клеток, эндотелиальных клеток, Т-клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы, клеток кожи, клеток крови и эпителиальных клеток.

[630] Вариант осуществления 121. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки включают клетки, полученные из первичных Т-клеток.

[631] Вариант осуществления 122. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, полученных из пула первичных Т-клеток, включающего первичные Т-клетки из 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.

[632] Вариант осуществления 123. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор (CAR).

[633] Вариант осуществления 124. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что CAR и экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 экспрессируются под контролем одного промотора.

[634] Вариант осуществления 125. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что CAR связывает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, CD22, CD38, CD123, CD138 и BCMA.

[635] Вариант осуществления 126. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

[636] Вариант осуществления 127. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA4), и/или белка программируемой смерти клеток (PD1).

[637] Вариант осуществления 128. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что активность популяции клеток у пациента включает нежелательную активность клеток.

[638] Вариант осуществления 129. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что нежелательная активность выбрана из группы, состоящей из гиперпролиферации, трансформации, образования опухоли, синдрома высвобождения цитокинов, реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и связанного с иммунными эффекторными клетками синдрома нейротоксичности (ICANS).

[639] Вариант осуществления 130. Способ контроля эффекта клеточной терапии у пациента, включающий: (a) введение пациенту композиции, содержащей популяцию клеток, при этом клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47; (b) после временного интервала, следующего за стадией (a), дальнейшее введение пациенту блокирующего CD47-SIRPα агента в количестве, эффективном для индукции иммунного ответа против популяции клеток, введенного на этапе (a), тем самым контролируя эффекты популяции клеток у пациента.

[640] Вариант осуществления 131. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки имеют сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и/или MHC класса II.

[641] Вариант осуществления 132. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки имеют сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и MHC класса II.

[642] Вариант осуществления 133. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно имеют сниженную экспрессию одного или более комплексов TCR.

[643] Вариант осуществления 134. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, состоящей из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9, и любой их комбинации.

[644] Вариант осуществления 135. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно содержат один или более трансгенов, при этом трансген кодирует экзогенно экспрессируемый полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8 и Serpin B9.

[645] Вариант осуществления 136. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат B

экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA.

[646] Вариант осуществления 137. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат В экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA.

[647] Вариант осуществления 138. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47, имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, выбранной из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9 и любой их комбинации.

[648] Вариант осуществления 139. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47, имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, выбранной из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9, и любой их комбинации.

[649] Вариант осуществления 140. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно имеют сниженный уровень экспрессии TCRα, TCRβ или обоих.

[650] Вариант осуществления 141. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки включают дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток.

[651] Вариант осуществления 142. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что плюрипотентные стволовые клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

[652] Вариант осуществления 143. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из клеток сердца, нервных клеток, эндотелиальных клеток, Т-клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы, клеток кожи, клеток крови и эпителиальных клеток.

[653] Вариант осуществления 144. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки включают клетки, полученные из первичных Т-клеток.

[654] Вариант осуществления 145. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, полученных из пула первичных Т-клеток, включающего первичные Т-клетки из 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.

[655] Вариант осуществления 146. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор (CAR).

[656] Вариант осуществления 147. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что CAR и экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 экспрессируются под контролем одного промотора.

[657] Вариант осуществления 148. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что CAR связывает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, CD22, CD38, CD123, CD138 и BCMA.

[658] Вариант осуществления 149. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

[659] Вариант осуществления 150. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA4), и/или белка программируемой смерти клеток (PD1).

[660] Вариант осуществления 151. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что временной интервал составляет по меньшей мере 1 неделю или более.

[661] Вариант осуществления 152. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что временной интервал составляет по меньшей мере 1 месяц или более.

[662] Вариант осуществления 153. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, которое связывает CD47, биспецифического антитела, которое связывает CD47, слитого белка иммуноцитокина, которое связывает CD47, CD47-содержащего слитого белка, антитела или его фрагмента, которое связывает SIRPα, биспецифического антитела, которое связывает SIRPα, слитого белка иммуноцитокина, который связывает SIRPα, слитого белка, содержащего SIRPα, и их комбинации.

[663] Вариант осуществления 154. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из магролимаба, (Hu5F9-G4), CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801 (NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, и IMC-002.

[664] Вариант осуществления 155. Способ по любому из вышеприведенных или

нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против CD47, Fab против CD47, наноантитела VHH против CD47, DARPin против CD47 и их вариантов.

[665] Вариант осуществления 156. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из ADU-1805, CC-95251, OSE-172 (BI 765063), KWAR23, и P362.

[666] Вариант осуществления 157. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против SIRPα, Fab против SIRPα, наноантитела VHH против SIRPα, DARPin против SIRPα и их вариантов.

[667] Вариант осуществления 158. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что SIRPα-содержащий слитый белок содержит CD47-связывающий домен SIRPα, связанный с доменом Fc.

[668] Вариант осуществления 159. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что домен Fc содержит домен Fc или его часть, выбранные из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[669] Вариант осуществления 160. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что перед проведением стадии (b) стадию (a) повторяют по меньшей мере 1-10 раз.

[670] Вариант осуществления 161. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что влияние популяции клеток у пациента включает побочный эффект или нежелательный эффект клеток.

[671] Вариант осуществления 162. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что нежелательный эффект выбран из группы, состоящей из гиперпролиферации, трансформации, образования опухоли, синдрома высвобождения цитокинов, реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и связанного с иммунными эффекторными клетками синдрома нейротоксичности (ICANS).

[672] Вариант осуществления 163. Способ контроля эффекта клеточной терапии у пациента, включающий введение блокирующего CD47-SIRPα агента пациенту, которому ранее вводили клетки, содержащие экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47.

[673] Вариант осуществления 164. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки имеют сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов МНС класса I и/или МНС класса II.

[674] Вариант осуществления 165. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки имеют

сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и MHC класса II.

[675] Вариант осуществления 166. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно имеют сниженную экспрессию одного или более комплексов TCR.

[676] Вариант осуществления 167. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, состоящей из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9, и любой их комбинации.

[677] Вариант осуществления 168. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно содержат один или более трансгенов, при этом трансген кодирует экзогенно экспрессируемый полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8 и Serpin B9.

[678] Вариант осуществления 169. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат B экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA.

[679] Вариант осуществления 170. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат B экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA.

[680] Вариант осуществления 171. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47, имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, выбранной из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9 и любой их комбинации.

[681] Вариант осуществления 172. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47, имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, выбранной из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9, и любой их комбинации.

[682] Вариант осуществления 173. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно имеют сниженный уровень экспрессии TCRα, TCRβ или обоих.

[683] Вариант осуществления 174. Способ по любому из вышеприведенных или

нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки включают дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток.

[684] Вариант осуществления 175. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что плюрипотентные стволовые клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

[685] Вариант осуществления 176. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из клеток сердца, нервных клеток, эндотелиальных клеток, Т-клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы, клеток кожи, клеток крови и эпителиальных клеток.

[686] Вариант осуществления 177. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки включают клетки, полученные из первичных Т-клеток.

[687] Вариант осуществления 178. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, полученных из пула первичных Т-клеток, включающего первичные Т-клетки из 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.

[688] Вариант осуществления 179. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор (CAR).

[689] Вариант осуществления 180. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что CAR и экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 экспрессируются под контролем одного промотора.

[690] Вариант осуществления 181. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что CAR связывает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, CD22, CD38, CD123, CD138 и BCMA.

[691] Вариант осуществления 182. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

[692] Вариант осуществления 183. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA4), и/или белка программируемой смерти клеток (PD1).

[693] Вариант осуществления 184. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, которое

связывает CD47, биспецифического антитела, которое связывает CD47, слитого белка иммуноцитокина, которое связывает CD47, CD47-содержащего слитого белка, антитела или его фрагмента, которое связывает SIRPα, биспецифического антитела, которое связывает SIRPα, слитого белка иммуноцитокина, который связывает SIRPα, слитого белка, содержащего SIRPα, и их комбинации.

[694] Вариант осуществления 185. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из магролимаба, (Hu5F9-G4), CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801 (NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, и IMC-002.

[695] Вариант осуществления 186. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против CD47, Fab против CD47, наноантитела VHH против CD47, DARPin против CD47 и их вариантов.

[696] Вариант осуществления 187. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из ADU-1805, CC-95251, OSE-172 (BI 765063), KWAR23, и P362.

[697] Вариант осуществления 188. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против SIRPα, Fab против SIRPα, наноантитела VHH против SIRPα, DARPin против SIRPα и их вариантов.

[698] Вариант осуществления 189. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что SIRPα-содержащий слитый белок содержит CD47-связывающий домен SIRPα, связанный с доменом Fc.

[699] Вариант осуществления 190. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что домен Fc содержит домен Fc или его часть, выбранные из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[700] Вариант осуществления 191. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что эффект ранее введенных клеток включает неблагоприятный эффект или нежелательный эффект у пациента.

[701] Вариант осуществления 192. Способ по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что нежелательный эффект выбран из группы, состоящей из гиперпролиферации, трансформации, образования опухоли, синдрома высвобождения цитокинов, реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и связанного с иммунными эффекторными клетками синдрома

нейротоксичности (ICANS).

[702] Вариант осуществления 193. Блокирующий CD47-SIRPα агент для лечения нежелательного эффекта после введения популяции клеток, содержащих экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47.

[703] Вариант осуществления 194. Блокирующий CD47-SIRPα агент для лечения нежелательного эффекта после введения популяции клеток, содержащих экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и MHC II.

[704] Вариант осуществления 195. Блокирующий CD47-SIRPα агент для лечения нежелательного эффекта после введения популяции клеток, содержащих экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и MHC II и одного или более комплексов TCR.

[705] Вариант осуществления 196. Применение блокирующего CD47-SIRPα агента в производстве лекарственного препарата для клеточной терапии у пациента, нуждающегося в этом, где пациенту вводили клетки, содержащие экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47.

[706] Вариант осуществления 197. Применение блокирующего CD47-SIRPα агента в производстве лекарственного препарата для клеточной терапии у пациента, нуждающегося в этом, где пациенту вводили клетки, содержащие экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеющие человеческие лейкоцитарные антигены MHC класса I и MHC II.

[707] Вариант осуществления 198. Применение блокирующего CD47-SIRPα агента в производстве лекарственного препарата для клеточной терапии у нуждающегося в этом пациента, где пациенту вводили клетки, содержащие экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеющие сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и MHC II и одного или более комплексов TCR.

[708] Вариант осуществления 199. Применение блокирующего CD47-SIRPα агента в производстве лекарственного препарата для модулирования активности клеточной терапии у пациента, причем пациент получил по меньшей мере одну дозу терапевтически эффективной популяции клеток, содержащей экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47.

[709] Вариант осуществления 200. Применение блокирующего CD47-SIRPα агента в производстве лекарственного препарата для модулирования активности клеточной терапии у пациента, при этом пациент получил по меньшей мере одну дозу терапевтически эффективной популяции клеток, которые включают экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и MHC II.

[710] Вариант осуществления 201. Применение блокирующего CD47-SIRPα агента в производстве лекарственного препарата для модулирования активности клеточной терапии у пациента, при этом пациент получил по меньшей мере одну дозу

терапевтически эффективной популяции клеток, которые включают экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и MHC II и одного или более комплексов TCR.

[711] Вариант осуществления 202. Применение блокирующего CD47-SIRPα агента в производстве лекарственного препарата для контроля эффекта клеточной терапии у пациента, при этом пациенту вводили клетки, содержащие экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47.

[712] Вариант осуществления 203. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, которое связывает CD47, биспецифического антитела, которое связывает CD47, слитого белка иммуноцитокина, которое связывает CD47, CD47-содержащего слитого белка, антитела или его фрагмента, которое связывает SIRPα, биспецифического антитела, которое связывает SIRPα, слитого белка иммуноцитокина, который связывает SIRPα, слитого белка, содержащего SIRPα, и их комбинации.

[713] Вариант осуществления 204. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из магролимаба, (Hu5F9-G4), CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801 (NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, и IMC-002.

[714] Вариант осуществления 205. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против CD47, Fab против CD47, наноантитела VHH против CD47, DARPin против CD47, и их вариантов.

[715] Вариант осуществления 206. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из ADU-1805, CC-95251, OSE-172 (BI 765063), KWAR23, и P362.

[716] Вариант осуществления 207. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против SIRPα, Fab против SIRPα, наноантитела VHH против SIRPα, DARPin против SIRPα и их вариантов.

[717] Вариант осуществления 208. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что SIRPα-содержащий слитый белок содержит CD47-связывающий домен SIRPα, связанный с доменом Fc.

[718] Вариант осуществления 209. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что домен Fc содержит домен Fc или его часть, выбранные из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[719] Вариант осуществления 210. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно имеют сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и/или MHC класса II.

[720] Вариант осуществления 211. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки имеют сниженную экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов MHC класса I и/или MHC класса II.

[721] Вариант осуществления 212. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, состоящей из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9, и любой их комбинации.

[722] Вариант осуществления 213. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно содержат один или более трансгенов, при этом трансген кодирует экзогенно экспрессируемый полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA- CCL21, Mfge8 и Serpin B9.

[723] Вариант осуществления 214. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA.

[724] Вариант осуществления 215. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA.

[725] Вариант осуществления 216. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA.

[726] Вариант осуществления 217. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47, имеют сниженные уровни экспрессии B2M и/или CIITA и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, выбранной из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9 и любой их комбинации.

[727] Вариант осуществления 218. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки содержат экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47, имеют сниженные уровни экспрессии B2M и CIITA и один или более дополнительных экзогенно экспрессируемых полипептидов, выбранных из группы, выбранной из CD24, CD46, CD55, CD59, CD200, DUX4, PD-L1, IDO1, HLA-G, FasL, CCL21, Mfge8, Serpin B9 и любой их комбинации.

[728] Вариант осуществления 219. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки дополнительно имеют сниженный уровень экспрессии TCRα, TCRβ или обоих.

[729] Вариант осуществления 220. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки представляют собой дифференцированные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток.

[730] Вариант осуществления 221. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что плюрипотентные стволовые клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

[731] Вариант осуществления 222. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из клеток сердца, нервных клеток, эндотелиальных клеток, Т-клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы, клеток кожи, клеток крови и эпителиальных клеток.

[732] Вариант осуществления 223. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки включают клетки, полученные из первичных Т-клеток.

[733] Вариант осуществления 224. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток,

полученных из пула первичных Т-клеток, включающего первичные Т-клетки из 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.

[734] Вариант осуществления 225. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, содержат химерный антигенный рецептор (CAR).

[735] Вариант осуществления 226. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что CAR и экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 экспрессируются под контролем одного промотора.

[736] Вариант осуществления 227. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что CAR связывает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, CD22, CD38, CD123, CD138 и BCMA.

[737] Вариант осуществления 228. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора.

[738] Вариант осуществления 229. Блокирующий CD47-SIRPα агент или применение по любому из вышеприведенных или нижеприведенных вариантов осуществления, отличающийся тем, что клетки, полученные из первичных Т-клеток, имеют сниженную экспрессию цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA4), и/или белка программируемой смерти клеток (PD1).

[739] Вариант осуществления 230. Блокирующий CD47-SIRPα агент для лечения нежелательного эффекта после введения популяции клеток, содержащих экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию B2M, CIITA и TCRα.

[740] Вариант осуществления 231. Блокирующий CD47-SIRPα агент для лечения нежелательного эффекта после введения популяции клеток, содержащих экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеющих сниженную экспрессию B2M, CIITA и TCRβ.

[741] Вариант осуществления 232. Применение блокирующего CD47-SIRPα агента в производстве лекарственного препарата для клеточной терапии у пациента, нуждающегося в этом, где пациенту вводили клетки, содержащие экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеющие сниженную экспрессию B2M, CIITA и TCRα.

[742] Вариант осуществления 233. Применение блокирующего CD47-SIRPα агента в производстве лекарственного препарата для клеточной терапии у пациента,

нуждающегося в этом, где пациенту вводили клетки, содержащие экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеющие сниженную экспрессию B2M, CIITA и TCRβ.

[743] Вариант осуществления 234. Применение блокирующего CD47-SIRPα агента в производстве лекарственного препарата для модулирования активности клеточной терапии у пациента, при этом пациент получил по меньшей мере одну дозу терапевтически эффективной популяции клеток, которые включают экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженную экспрессию B2M, CIITA и TCRα.

[744] Вариант осуществления 235. Применение блокирующего CD47-SIRPα агента в производстве лекарственного препарата для модулирования активности клеточной терапии у пациента, при этом пациент получил по меньшей мере одну дозу терапевтически эффективной популяции клеток, которые включают экзогенно экспрессируемые полипептиды CD47 и имеют сниженную экспрессию B2M, CIITA и TCRβ.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Блокада CD47 in vitro

[745] Способность блокирующих CD47 агентов (также называемых в данном документе блокирующими CD47-SIRPa агентами), устранять ингибирующий эффект CD47 в отношении уничтожения NK-клетками и макрофагами, оценивали на платформе XCELLIGENCE MP (ACEA BioSciences). 96-луночные планшеты E-plate (ACEA BioSciences) покрывали коллагеном (Sigma-Aldrich) и 4 × 105 HIP клетки человека (B2M-/-, CIITA-/-, CD47+) или клетки с двойным нокаутом (B2M-/-, CIITA-/ -) высевали в 100 мкл специфической для клеток среды. Клетки человека высевали и через день обрабатывали 100 мкг/мл антитела к CD47 MIP410 (BioXCell, Ливан, штат Нью-Гэмпшир) или изотипическим контролем IgG1 (BioXCell). После того как значение клеточного индекса достигало 0,7, добавляли человеческие NK-клетки или человеческие макрофаги (Lonza) в соотношении E:T 1:1, либо с 1 нг/мл человеческого IL-2 (PeproTech), либо без него. В качестве контроля уничтожения клетки обрабатывали 2% TRITON X100. Уничтожения стимулированными или нестимулированными NK-клетками (Фиг. 1A) или макрофагами (Фиг. 2A) HIP клеток, экспрессирующих CD47 не наблюдали, тогда как клетки с двойным нокаутом быстро уничтожались как NK-клетками (Фиг. 1B), так и макрофагами (Фиг. 2B). Напротив, HIP клетки, обработанные антителом к CD47, быстро уничтожались NK-клетками (Фиг. 1D) и макрофагами (Фиг. 2D), тогда как после обработки изотипическим контролем IgG1 уничтожения не наблюдали (Фиг. 1C и 2C). Этот пример демонстрирует, что блокада CD47 снимает защитный эффект CD47 против уничтожения NK-клетками и макрофагами.

Пример 2. Блокада CD47 in vivo

[746] [00297] У мышей NSG есть функциональные макрофаги, но отсутствуют другие иммунные клетки. Таким образом, 1 миллион человеческих NK-клеток вводили

внутривенно мышам NSG и одновременно этим же мышам подкожно вводили 50 тыс. HIP иПСК человека (B2M-/-, CIITA-/-, CD47+). 500 мкг/кг антитела к CD47 (MIP410; BioXCell) вводили подкожно ежедневно (n=5). Контрольные мыши получали изотипический контроль IgG1 (BioXCell) (n=3). Для биолюминесцентной визуализации (BLI) калиевую соль D-люциферина светлячка (375 мг/кг; Biosynth) растворяли в PBS (pH 7,4) (Gibco, Invitrogen) и вводили внутрибрюшинно (250 мкл на мышь) анестезированным мышам. Животных визуализировали с помощью устройства для визуализации AMI (Spectral Instruments). Биолюминесценцию представляющей интерес области (ROI) количественно определяли в единицах максимального количества фотонов в секунду на квадратный сантиметр на стерадиан (фотоны/сек/см^2/стерадиан). Максимальный сигнал из ROI измеряли с помощью программного обеспечения Living Image (MediaCybernetics). За мышами наблюдали на 0 день, 2 день и каждый 4-й день до тех пор, пока сигнал не достигал фонового уровня или объем тератомы не достигал >2000 мм^3. Биолюминесценция от HIP иПСК у мышей, которым вводили антитело изотипического контроля IgG1, увеличивалась в течение 25 дней, что указывает на выживаемость иПСК (Фиг. 3A). Напротив, биолюминесценция HIP иПСК быстро уменьшалась после введения антитела к CD47, опускаясь ниже фонового уровня к 4-му дню (Фиг. 3B). Этот пример демонстрирует, что блокада CD47 может индуцировать уничтожение гипоиммунных клеток, которые экспрессируют CD47.

Пример 3. Создание гипоиммуногенных CAR-T-клеток для уклонения от распознавания иммунной системой при аллогенной терапии

А. РЕФЕРАТ

[747] Готовые CAR-T-клетки могут иметь преимущества по сравнению со стратегиями с использованием аутологичных клеток, включая простоту производства, контроль качества и предотвращение заражение злокачественными клетками и дисфункции Т-клеток. Однако сильный иммунный ответ «хозяин против трансплантата» против гистонесовместимых Т-клеток предотвращает экспансию и персистенцию аллогенных CAR-T-клеток и снижает эффективность этого подхода. В данном документе описаны способы конструирования и получения CAR-T-клеток человека, ускользающих от иммунного ответа, с использованием новой гипоиммунной платформы для редактирования. Система основана, в частности, на обнаружении того, что Т-клетки теряют свою иммуногенность, когда гены человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса I и II инактивируются, а CD47 сверхэкспрессируется. Кроме того, было обнаружено, что нокаут TCR полезен для контроля риска развития реакции «трансплантат против хозяина».

[748] В этом примере описаны гипоиммуногенные CD19-специфические CAR-T-клетки (также называемые в данном документе HIP CD19 CAR-T-клетками) и влияние экзогенной экспрессии CD47 на активность таких клеток по сравнению с контрольными CD19-специфическими CAR-T клетками в экспериментах по оценке противоопухолевой эффективности in vitro. В экспериментах опухолевые клетки CD19+ использовали в

качестве целевых клеток, а HIP CD19CAR-T-клетки (такие как тестируемые и контрольные CAR-T-клетки) использовали в качестве эффекторных клеток. В описанных экспериментах HIP CD19CAR-T-клетки (также называемые «HIP CAR-T-клетки») представляли собой Т-клетки, содержащие (a) геномные модификации генов B2M, CIITA и TRAC и (b) трансгены, имеющие полинуклеотид, кодирующий CD19-специфический CAR, и полинуклеотид, кодирующий CD47. Такие HIP CD19CAR-T-клетки также обозначаются какB2M$^{-/-}$, CIITA$^{-/-}$,TRAC$^{-/-}$, CD19-специфические CAR-CD47 Т-клетки. Кроме того, в экспериментах контрольные CAR-T-клетки включали (a) иммуногенные Т-клетки, экспрессирующие полинуклеотид, кодирующий CD19-специфический CAR, включая Т-клетки, экспрессирующие ту же конструкцию CAR, что и тисагенлеклейсел или его биоаналог/суррогат, (b) иммуногенные Т-клетки, экспрессирующие полинуклеотиды, кодирующие CD19-специфический CAR и EGFRt, и (c) ложно-трансфицированные Т-клетки, а именно Т-клетки, которые были ложно-трансфицированными.

[749] При трансплантации аллогенным гуманизированным мышам HIP CD19CAR-Т-клетки (например, B2M$^{-/-}$, CIITA$^{-/-}$,TRAC$^{-/-}$, CD19-специфические CAR-CD47 Т-клетки) ускользали от иммунного распознавания Т- и В-клетками по сравнению с иммуногенными CD19-положительными CAR-Т-клетками, полученными от того же человека-донора. Анализы клеток врожденного иммунитета (например, NK-клеток или макрофагов) показали, что сверхэкспрессия CD47 защищает клетки HIP CD19CAR-T от уничтожения клеток врожденного иммунитета in vitro и in vivo. Уровни экспрессии CD47 были проанализированы для оценки пороговых уровней защиты с помощью метода проточной цитометрии для оценки количества связанных антител на клетку. Блокирующее антитело против CD47 сделало HIP CD19CAR-T-клетки восприимчивыми к уничтожению макрофагами и NK-клетками, что подтверждает важность сверхэкспрессии CD47 для ускользания от врожденного иммунного клиренса. Соответственно, использование блокирующего антитела против CD47 рассматривается как стратегия обеспечения защитного переключения на HIP CD19CAR-T-клетки, описанные в данном документе.

[750] *Ни изолированная сверхэкспрессия CD47, ни генетические модификации для инактивации генов B2M*, CIITA и TRAC не оказали никакого влияния на цитотоксический потенциал CAR-T-клеток. HIP CD19CAR-T-клетки (*например, B2M$^{-/-}$*, CIITA$^{-/-}$,TRAC$^{-/-}$, CD19-*специфические CAR*-CD47 Т-*клетки) сохраняли свою противоопухолевую активность в модели CD19+ опухоли in vitro*, а также у иммунодефицитных мышей NSG в диапазоне опухолевых клеток: соотношения HIP CD19CAR-T-клеток. Не оказалось, что введение модификаций генов гипоиммунногенности (*например, инактивация гена* B2M/CIITA/TRAC) не изменило их независимого от цитокинов роста по сравнению с иммуногенными CAR-T-клетками. Эти результаты демонстрируют, что HIP CD19CAR-T-клетки являются функционально уклоняющимися от иммунитета у аллогенных реципиентов с длительной цитотоксической противоопухолевой способностью. Соответственно, результаты демонстрируют, что HIP CD19CAR-T клетки могут обеспечивать универсальные иммунотерапевтические возможности для пациентов со

злокачественным новообразованием.

B. Способы

[751] Получение пан-Т-клеток со сконструированными CAR-CD47: Пан-Т-клетки оттаивали и культивировали в течение ночи в стандартной среде для Т-клеток с добавлением IL-2. Жизнеспособные Т-клетки подсчитывали и активировали частицами с CD3/CD28 при соотношении частицы:клетки 1:1. Трансдукцию Т-клеток выполняли с использованием CD19-специфического CAR и CD47-экспрессирующего лентивируса (например, лентивируса, экспрессирующего трансгены CD19-специфического CAR и CD47 под контролем одного промотора) при MOI 100 в присутствии протамина сульфата для получения сконструированных CD47 пан-Т-клеток. Кроме того, были созданы ложно-трансфицированные пан-Т-клетки, при этом Т-клетки были ложно-трансфицированы. Клетки размножали в стандартной среде для Т-клеток с добавлением IL-2 и замораживали в стандартной среде для замораживания для последующего применения.

[752] Получение пан-Т-клеток с двойным нокаутом B2M/CIITA и пан-Т-клеток с двойным нокаутом B2M/CIITA и сконструированными CAR-CD47: Замороженные ложно-трансфицированные Т-клетки, а именно Т-клетки, которые были ложно-трансфицированы, и Т-клетки со сконструированным CD47 оттаивали и культивировали в течение ночи, после чего клетки повторно активировали частицами с CD3/CD28. Частицы удаляли из клеток примерно через 4 дня. Комплексы рибонуклеопротеинов (RNP), содержащие Cas9 и направляющие РНК, нацеленные на B2M и CIITA, получали по стандартному протоколу. Т-клетки ресуспендировали в буфере для нуклеофекции и добавляли к комплексам RNP перед электропорацией с использованием стандартного устройства для электропорации клеток. После электропорации клетки восстанавливали в стандартной среде для Т-клеток с добавлением IL-2. Эффективность редактирования оценивали с помощью анализа CD47, HLA-ABC и HLA-DR методом FACS.

[753] Цитокин-независимый анализ роста: сконструированные Т-клетки дважды промывали в 1×PBS перед использованием и ресуспендировали в стандартной среде для Т-клеток в течение ночи перед использованием в анализе. Клетки ресуспендировали в стандартной культуральной среде с добавлением или без добавления IL-2 на 1 день. После этого жизнеспособные клетки подсчитывали два раза в неделю методом вытеснения трипанового синего. На всех стадиях анализа концентрация клеток корректировалась с помощью среды, дополненной IL-2.

[754] Культура NK-клеток: Первичные NK-клетки человека стимулировали человеческим IL-2 в стандартной среде для культивирования NK-клеток (например, RPMI 1640 с 10% термоинактивированной FCS и 1% пен./стрепт.) перед использованием клеток в анализах.

[755] Культура макрофагов: МКПК выделяли путем разделения, основанного на использовании градиента плотности фиколла, из свежей крови и ресуспендировали в стандартной среде для культивирования макрофагов (например, RPMI 1640 с 10% термоинактивированной FCS и 1% пен./стрепт.). Клетки высевали и культивировали в M-

CSF человека. Среду меняли каждый второй день. Начиная с 6-го дня в среду добавляли IL-2 человека примерно на 24 часа перед тем, как клетки использовали в экспериментальных анализах.

[756] Культура CD19+ опухоли: CD19+ опухолевые клетки культивировали в стандартных средах для культивирования клеток (например, RPMI 1640 с 10% термоинактивированной FCS и 1% пен./стрепт.) перед использованием в экспериментальных анализах.

[757] Уничтожение с помощью механизмов врожденной иммунной системы с использованием системы анализа клеток в реальном времени: Анализы уничтожения NK-клетками и анализы фагоцитоза макрофагами выполняли на приборе для анализа клеток в реальном времени (например, на платформе XCelligence® MP, Agilent). Вкратце, Т-клетки высевали в среду, специфичную для CD19+ опухолевых клеток. После того как значение клеточного индекса достигало 0,7, добавляли NK-клетки человека или макрофаги человека в соотношении E:T 1:1 с человеческим IL-2 для NK-клеток и без IL-2 для макрофагов. Некоторые лунки предварительно обрабатывали человеческим антителом, блокирующим CD47, или человеческим антителом к EGFR (например, цетуксимабом) и повторно в ходе анализа в реальном времени. Данные были стандартизированы и проанализированы с помощью программного обеспечения для анализа клеток в реальном времени.

[758] Примерно через 48 часов Т-клетки собирали и окрашивали компонентами анализа для оценки жизнеспособности клеток. Вкратце, клетки окрашивали кальцеином AM и гомодимером-1 этидия в соответствии с протоколом производителя. Анализ проводили с помощью проточной цитометрии, и результаты выражали в виде процента мертвых клеток.

[759] Уничтожение CD19+ опухолевых клеток in vitro с использованием системы анализа клеток в реальном времени: Анализы уничтожения CD19+ опухолевых клеток in vitro проводили на приборе для анализа клеток в реальном времени (например, на платформе XCelligence® MP, Agilent). Вкратце, Т-клетки высевали в среду, специфичную для CD19+ опухолевых клеток. После того, как значение клеточного индекса достигало 0,7, добавляли человеческие NK-клетки или макрофаги человека с соотношением E:T 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1, 1:1, 3:1 или 7:1 в стандартной среде для Т-клеток. Данные были стандартизированы и проанализированы с помощью программного обеспечения для анализа клеток в реальном времени.

[760] Анализ цитотоксичности in vivo с адоптивным переносом: (1) Немодифицированные Т-клетки и модифицированные B2M-/-CIITA-/- Т-клетки или (2) немодифицированные Т-клетки и модифицированные B2M-/-CIITA-/- CD47 tg Т-клетки смешивали и окрашивали различными флуорофорными красителями с использованием набора для многоцветного мечения клеток. Клетки разводили солевым раствором и IL-2 человека. Затем клетки объединяли либо с первичными NK-клетками человека, либо с макрофагами человека и вводили внутрибрюшинно иммунодефицитным мышам NSG.

Первичные NK-клетки человека перед инъекцией предварительно обрабатывали человеческим IL-2 in vitro. Приблизительно через 48 часов после инъекции перитонеальные клетки собирали у подопытных мышей и анализировали с помощью проточной цитометрии. Соотношение сравнивали между немодифицированными Т-клетками и модифицированными Т-клетками. Результаты показаны на Фиг. 5A-5B. Данные адоптивного переноса показали, что CAR-T-клетки, несущие инактивированные гены HLA-I/II, были уничтожены in vivo NK-клетками и макрофагами. Тем не менее, CAR-T-клетки, несущие инактивированные гены HLA-I/II и TCR и сверхэкспрессирующие CD47, не были уничтожены клетками врожденного иммунитета.

[761] Анализ методом иммуноферментных пятен ELISpot: гипоиммуногенные CAR-T-клетки или аллогенные CAR-T-клетки вводили гуманизированным мышам NSG-SGM3 с n=3 на группу. Реципиентные спленоциты выделяли из селезенки примерно через 6 дней после инъекции клеток и использовали в качестве иммунореактивных клеток. Донорские Т-клетки обрабатывали митомицином и использовали в качестве клеток-стимуляторов. Клетки-стимуляторы инкубировали с реципиентными иммунореактивными Т-клетками в течение 48 часов, а количество пятен IFN-γ подсчитывали, используя планшет-ридер ELISpot. Результаты показаны на Фиг. 6. Гипоиммуногенные CAR-T-клетки не индуцировали активацию Т-клеток, однако активированные аллогенные CAR-T-клетки были обнаружены у гуманизированных мышей.

[762] Анализ донорских специфических антител: сыворотки мышей-реципиентов (например, гуманизированных мышей NSG-SGM3, которым вводили гипоиммуногенные CAR-T-клетки или аллогенные CAR-T-клетки) подвергали декомплементации путем нагревания до 56°C в течение приблизительно 30 мин. Равные количества сыворотки и клеточной суспензии инкубировали в течение примерно 45 мин при 4°C. Клетки метили FITC-конъюгированным козьим антителом к IgM человека и анализировали с помощью проточной цитометрии. Результаты показаны на Фиг. 6. Гипоиммуногенные CAR-T-клетки не индуцировали донор-специфического связывания антител, однако было обнаружено связывание IgM с аллогенными CAR-T-клетками.

C. Результаты

[763] Гипоиммуногенные Т-клетки, описанные в данном документе, по-видимому, лишены иммуногенности в результате инактивации генов человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса I и II и TCR (например, нокаут генов B2M, CIITA и TRAC) и сверхэкспрессии CD47. Такие гипоиммунные Т-клетки были сконструированы для экспрессии CD19-специфических молекул CAR. Введение модификаций генов гипоиммунногенности не изменило цитокин-независимый рост клеток по сравнению с соответствующими иммуногенными CAR-T-клетками.

[764] Кроме того, воздействие блокирующего антитела против CD47 (например, магролимаба) приводило к тому, что гипоиммуногенные CAR-T-клетки (например, $B2M^{-/-}$, $CIITA^{-/-}$,$TRAC^{-/-}$, CD19-специфические CAR-CD47 Т-клетки) становились восприимчивыми к уничтожению макрофагами и NK-клетками, что подтверждает важность

сверхэкспрессии CD47 для ускользания от клиренса врожденного иммунитета. См., например, Фиг. 4A-4J и 5A-5B. Данные показали, что конструкции CD19-специфического CAR и CD47 экспрессировались на низких или высоких уровнях в экспериментальных клетках. Кроме того, такие конструкции экспрессировались под контролем одного промотора (например, одного конститутивного активного промотора). Результаты показали, что гипоиммуногенные CAR-T-клетки не были уничтожены клетками врожденного иммунитета в анализе in vitro. Напротив, блокирование CD47 макролимабом индуцировало уничтожение гипоиммуногенных CD19-специфических CAR-T-клеток клетками врожденного иммунитета in vitro. Как и ожидалось, уничтожения контрольных CAR-T-клеток (таких как T-клетки, экспрессирующие конструкции CAR-EGFRt или биоаналоги или суррогаты тисагенлеклейсела) клетками врожденного иммунитета обнаружено не было. Уничтожение контрольных клеток CAR-T, экспрессирующих конструкции CAR-EGFRt, врожденным иммунитетом индуцировали с использованием блокирующего антитела против EGFR (например, цетуксимаба). Данные также показали, что ложно-трансфицированные T-клетки, а именно T-клетки, которые были ложно-трансфицированы, не уничтожались NK-клетками и макрофагами в отсутствие или в присутствии магролимаба или цетуксимаба.

[765] Таким образом, лечение антителом к CD47 можно использовать в качестве стратегии безопасности для устранения гипоиммуногенной природы гипоиммуногенных CAR-T-клеток, описанных в данном документе, что позволяет организму субъекта-реципиента элиминировать их.

Пример 4. Введение блокирующих CD47-SIRPα агентов приводит к гибели гипоиммунных клеток in vitro и in vivo

[766] Исследования защитных механизмов с использованием гипоиммунных (B2M -/-, CIITA -/-, и CD47tg+) клеток in vitro и in vivo проводили с использованием описанных в данном документе протоколов.

А. Протоколы исследования защитных механизмов

1. Подкожная имплантация

[767] *клеток*. Здоровых самцов мышей NSG подвергали анестезии с помощью ингаляции изофлурана в камере для анестезии. Мышей под наркозом извлекали из камеры и помещали в положение лежа на спине. Место инъекции (правую паховую область) опрыскивали 70% EtOH. Клетки вводили подкожно проксимальнее паховой области.

[768] *Головной мозг*. За 24-48 часов до запланированной операции животным давали MediGel (Clear H2O, Портленд, штат Мэн) с карпрофеном (5 мг/кг/день). Рассчитанное количество было основано на стандартном потреблении. В каждую чашку MediGel (сукралоза) добавляли 1,5 мг карпрофена. Альтернативно, бупренорфин (0,05-0,1 мг/кг внутримышечно или внутрибрюшинно) два раза в сутки каждые 12 часов в течение трех дней или бупренорфин пролонгированного действия (0,5-1,0 мг/кг подкожно) вводили однократно перед началом операции. После операции бупренорфин пролонгированного действия или бупренорфин не применяли в комбинации с MediGel.

[769] В день операции животных подвергали анестезии и поддерживали ингаляцией изофлурана (3% и 1,5%, соответственно). Верх головы выбривали и очищали хлоргексидином и протирали 70% EtOH. Животное помещали на стереотаксический аппарат. Разрез был сделан по средней линии кожи головы, достаточно длинный, чтобы легко обнажить срединный шов от брегмы до ламбды.

[770] В заранее определенных координатах (как указано в атласе мозга Аллена или атласе мозга мыши Джорджа Паксиноса) череп просверливали насквозь, не проникая в твердую мозговую оболочку. Микродрель заменяли на микроинфузионный насос со шприцем Гамильтона и иглой. Иглу «опускали» на глубину, необходимую для достижения целевой области мозга, и выполняли инъекцию (дифференцированные стволовые клетки в 1 мкл-5 мкл солевого раствора). Разрез зашивали рассасывающимся швом, а мышь восстанавливалась на грелке. В течение 3 дней животные получали MediGel (гель сукралозы с карпрофеном).

2. Биолюминесцентная визуализация (BLI)

[771] Мышей подвергали анестезии посредством ингаляции изофлурана и инъецировали внутрибрюшинно (в/б) 250 мкл люциферина (45,45 мг/мл). Затем мышей помещали в носовой конус в биолюминесцентной камере (анестезию поддерживали на уровне 1,5% с 500 мл кислорода/мин). Мышей визуализировали в течение 180 секунд. Вокруг представляющей области (ROI) был нарисован круг, что позволяло получить показания в виде фотонов в секунду излучаемого света.

3. Дозирование антител (Ат)

[772] *Внутрибрюшинное дозирование.* Антитело (100 мкл) вводили в брюшную полость с вентральной поверхности, прокалывая кожный и мышечный слои.

[773] *Подкожное дозирование.* Мышей подвергали анестезии посредством ингаляции изофлурана и помещали в положение на спине. Место инъекции (правую паховую область) опрыскивали 70% EtOH и антитело (100 мкл) вводили в область имплантированных клеток.

[774] *Внутривенное дозирование.* Мышей согревали под тепловой лампой и вводили антитело в расширенную латеральную вену.

<u>В. иПСК человека: Магролимаб in vitro и in vivo</u>

[775] Как показано на Фиг. 7A-7B, уничтожение HIP иПСК человека NK-клетками и макрофагами происходило при добавлении антитела к CD47 магролимаба. HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток. Использовали местный изотипический контроль (IgG4) и лечение проводили в период с 0-го по 10-й день (Д0-Д10). Как показано на Фиг. 8A-B, HIP иПСК человека образовывали тератомы у мышей NSG с адоптивно перенесенными NK-клетками. Лечение изотипическим контролем IgG4 не влияло на выживаемость HIP.

[776] 5×10^4 HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом 1×10^6 человеческих NK-клеток. Использовали местный изотипический контроль (IgG4) и лечение проводили в период с 0-го по 10-й день (Д0-Д10). Как показано

на Фиг. 9A-B, блокирование CD47 in vivo приводило к уничтожению HIP иПСК. Лечение магролимабом было прекращено после 10 дня. иПСК не обнаруживались вновь при проверке в течение 6 месяцев последующего наблюдения.

С. иПСК человека: in vitro и in vivo MIAP410

[777] Блокирование CD47 антителом к CD47 MIAP410 наблюдали in vitro в иммунных клетках человека. Как показано на Фиг. 10A-B, при добавлении антитела к CD47 MIAP410 наблюдали уничтожение HIP иПСК человека NK-клетками и макрофагами человека.

[778] Блокирование CD47 антителом к CD47 MIAP410 наблюдали in vivo. $2,5\times10^4$ HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом 1×10^6 человеческих NK-клеток. Использовали местный изотипический контроль (IgG1) и лечение проводили в период с 0-го по 10-й день (Д0-Д10). Как показано на Фиг. 11A-B, иПСК человека образовывали тератомы у мышей NSG с адоптивно перенесенными NK-клетками. Лечение изотипическим контролем IgG1 не влияло на выживаемость HIP.

[779] $1,5\times10^4$ HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом 1×10^6 человеческих NK-клеток. IL-2 вводили внутрибрюшинно (в/б) с NK-клетками для активации. Местное лечение низкими дозами (НД) (500 мкг) антитела к CD47 проводили в период Д0-Д10. Как показано на Фиг. 12A-B, блокирование CD47 in vivo приводило к уничтожению HIP иПСК. Лечение антителом к CD47 было прекращено после 10 дня. иПСК не обнаруживались вновь при проверке в течение 6 месяцев последующего наблюдения.

[780] $15,5\times10^4$ HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом 1×10^6 человеческих NK-клеток (без активации IL-2). Местное лечение антителом к CD47 MIAP410 в высокой дозе (ВД; 1 мг) проводили на Д0, Д1 и Д3. Как показано на Фиг. 13A-B, блокирование CD47 in vivo приводило к уничтожению HIP иПСК. Лечение антителом к CD47 проводили 3 раза (на Д0, Д1, Д3). иПСК не обнаруживались вновь ни у одной мыши при проверке в течение 6 месяцев последующего наблюдения.

[781] $16,5\times10^4$ HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом 1×10^6 человеческих NK-клеток (без активации IL-2). Лечение антителом к CD47 в высокой дозе (1 мг) проводили на Д0, Д1, Д3 путем внутрибрюшинного введения. Как показано на Фиг. 14A-B, блокирование CD47 in vivo приводило к уничтожению HIP иПСК. Лечение антителом к CD47 проводили 3 раза (на Д0, Д1, Д3) путем внутрибрюшинного введения. иПСК не обнаруживались вновь ни у одной мыши при проверке в течение 6 месяцев последующего наблюдения.

[782] Блокирование CD47 антителом к CD47 MIAP410 наблюдали in vivo в головном мозге. 5×10^4 HIP иПСК человека вводили интракраниально мышам NSG с адоптивным переносом 1×10^6 человеческих NK-клеток. Как показано на Фиг. 15A-B, иПСК человека образовывали тератомы у мышей NSG с адоптивно перенесенными NK-клетками. Лечение изотипическим контролем IgG4 путем интракраниального введения не

влияло на выживаемость HIP. Лечение местным изотипическим контролем IgG4 в высокой дозе (1 мг) проводили на Д0, Д1 и Д3.

[783] 5×10^4 HIP иПСК человека вводили интракраниально мышам NSG с адоптивным переносом 1×10^6 человеческих NK-клеток. Местное лечение антителом к CD47 в высокой дозе (1 мг) проводили на Д0, Д1, Д3. Как показано на Фиг. 16A-B, интракраниальное блокирование CD47 приводило к уничтожению HIP иПСК в головном мозге. Лечение антителом к CD47 прекращали после трех введений. иПСК не обнаруживались вновь, когда мышей проверяли в течение 40 дней последующего наблюдения.

[784] 5×10^4 HIP иПСК человека вводили интракраниально мышам NSG с адоптивным переносом 1×10^6 человеческих NK-клеток. Лечение антителом к CD47 в ВД (1 мг) проводили путем внутрибрюшинного введения на Д0, Д1 и Д3, при этом гематоэнцефалический барьер был нарушен инъекциями маннитола. Как показано на Фиг. 17A-B, интракраниальное блокирование CD47 приводило к уничтожению HIP иПСК в головном мозге. Лечение антителом к CD47 (внутрибрюшинно) прекращали после трех введений. иПСК не обнаруживались вновь при проверке в течение 40 дней последующего наблюдения у 4 из 5 мышей.

D. иПСК человека: IgG1Fc или IgG4Fc к SIRPα (слитые белки) in vitro и in vivo

[785] Слитые белки SIRPαFc изучали in vitro на предмет их действия на иПСК человека. Влияние на HIP CD19CAR-T-клетки изучали в отношении уничтожения, опосредованного NK-клетками, NK-клеточной АЗКЦ и КЗЦ (Фиг. 18A). Эффекты IgG1Fc SIRPα на HIP клетки изучали в отношении уничтожения, опосредованного NK-клетками, NK-клеточной АЗКЦ и КЗЦ (фиг. 18B). Влияние IgG4Fc SIRPα на HIP клетки (включая контроль уничтожения dKO) изучали в отношении уничтожения, опосредованного NK-клетками, NK-клеточной АЗКЦ и КЗЦ (Фиг. 18C). Влияние на HIP клетки изучали в отношении уничтожения, опосредованного макрофагами и макрофагальной АЗКЦ (Фиг. 18D). Влияние IgG1Fc к SIRPα на HIP клетки изучали в отношении уничтожения, опосредованного макрофагами и макрофагальной АЗКЦ (Фиг. 18E). Влияние IgG4Fc к SIRPα на HIP клетки (включая контроль уничтожения dKO) изучали в отношении уничтожения, опосредованного макрофагами и макрофагальной АЗКЦ (Фиг. 18F). Как и ожидалось, наблюдалось, что IgG4 опосредует уничтожение путем блокирования CD47. Кроме того, было обнаружено, что IgG1 дополнительно индуцирует КЗЦ и АЗКЦ.

[786] Блокирование CD47 и АЗКЦ с помощью IgG1Fc к SIRPα наблюдали in vivo. HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток. Местное лечение IgG1Fc к SIRPα (1 мг) проводили на Д0, Д1, Д3. Повторную инъекцию HIP иПСК человека выполняли на Д20 и Д40 с последующими инъекциями IgG1Fc к SIRPα (в течение 3 дней). Как показано на Фиг. 19A-B, лечение IgG1Fc к SIRPα приводила к гибели HIP иПСК неоднократно у всех мышей. Последующее наблюдение проводили в течение 6 месяцев.

[787] Блокирование CD47 с помощью IgG4Fc к SIRPα наблюдали in vivo. HIP иПСК

человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток. Местное лечение IgG4Fc к SIRPα (1 мг) проводили на Д0, Д1, Д3. Повторную инъекцию HIP иПСК человека выполняли на Д20 и Д40 с последующими инъекциями IgG4Fc к SIRPα (в течение 3 дней) (Фиг. 20A-B).

[788] Блокирование CD47 и АЗКЦ с помощью IgG1Fc к SIRPα наблюдали in vivo. HIP иПСК человека вводили интракраниально мышам NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека и микроглии человека. Местное лечение изотипическим контролем IgG1 (1 мг) проводили на Д0, Д1, Д3. Как показано на Фиг. 21A-B, HIP иПСК человека образовывали тератомы у мышей NSG с адоптивно перенесенными NK-клетками и микроглией. Лечение изотипическим контролем IgG1 не влияло на выживаемость HIP.

[789] Блокирование CD47 и АЗКЦ с помощью IgG1Fc к SIRPα наблюдали in vivo. HIP иПСК человека вводили интракраниально мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток и микроглии. Местное лечение IgG1Fc к SIRPα (1 мг) проводили на Д0, Д1, Д3. Как показано на Фиг. 22A-B, интракраниальное введение IgG1Fc к SIRPα приводило к уничтожению HIP иПСК в головном мозге.

[790] Блокирование CD47 и АЗКЦ с помощью IgG1Fc к SIRPα наблюдали in vivo. HIP иПСК человека вводили интракраниально мышам NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека и микроглии человека. Лечение изотипическим контролем IgG1 (1 мг) проводили на Д0, Д1, Д3 путем внутрибрюшинного введения. Как показано на Фиг. 23A-B, HIP иПСК человека образовывали тератомы у мышей NSG с адоптивно перенесенными NK-клетками и микроглией. Лечение изотипическим контролем IgG1 не влияло на выживаемость HIP путем внутрибрюшинного введения.

[791] Блокирование CD47 и АЗКЦ с помощью IgG1Fc к SIRPα наблюдали in vivo. HIP иПСК человека вводили интракраниально мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток и микроглии. Лечение IgG1Fc к SIRPα (1 мг) проводили на Д0, Д1, Д3 и вводили внутрибрюшинно, при этом гематоэнцефалический барьер был нарушен инъекциями маннитола. Как показано на Фиг. 24A-B, системный IgG1Fc к SIRPα индуцировал уничтожение HIP иПСК в головном мозге у 1 из 5 мышей. Внутрибрюшинное введение оказалось менее эффективным по сравнению с местным введением.

[792] Блокирование CD47 с помощью IgG4Fc к SIRPα наблюдали in vivo. HIP иПСК человека вводили интракраниально мышам NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека и микроглии человека. Местное лечение изотипическим контролем IgG4 (1 мг) проводили на Д0, Д1, Д3. Как показано на Фиг. 25A-B, HIP иПСК человека образовывали тератомы у мышей NSG с адоптивно перенесенными NK-клетками и микроглией. Лечение изотипическим контролем IgG4 не влияло на выживаемость HIP. Мышей подвергали эвтаназии из-за размера тератомы/симптомов на Д16 и Д20.

[793] Блокирование CD47 с помощью IgG4Fc к SIRPα наблюдали in vivo. HIP иПСК человека вводили интракраниально мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток и микроглии. Местное лечение IgG4Fc к SIRPα (1 мг) проводили на Д0, Д1, Д3.

Как показано на Фиг. 26A-B, интракраниальное введение IgG4Fc к SIRPα приводило к гибели HIP иПСК в головном мозге у 1 из 5 мышей. IgG1Fc оказался более эффективным.

[794] HIP иПСК человека подкожно инъецировали мышам NSG вместе с адоптивным переносом человеческих NK-клеток и антителом к SIRPα путем подкожного введения, смешанных в дозе 1 мг на Д0, Д1 и Д3. Повторную инъекцию HIP иПСК человека проводили на Д20 50000 клеток (50 тыс.) подкожно (в левый бок) вместе с 1 мг B6H12 на Д20 (смешанный), Д21 и Д23. Повторную инъекцию HIP иПСК человека проводили на Д40 в виде 50 тысяч подкожно (в верхнюю часть средней части грудной клетки) вместе с 1 мг B6H12 на Д40 (смешанный), Д41 и Д43 (Фиг. 27).

E. Т-клетки с CAR к CD19 человека: IgG1Fc или IgG4Fc к SIRPα (слитые белки) in vitro и in vivo

[795] Функциональная конечная точка: (a) уничтожение Т-клеток NK-клетками или макрофагами; и (b) индукция уничтожения HIP Т-клеток антителами к CD47 (магролимабом/слитым белком IgG1/слитым белком IgG4), что подтвердило актуальность CD47 для защиты от уничтожения NK-клетками/макрофагами. Регистрацию показателей in vitro проводили с помощью Xcelligence.

Таблица 22. Типы и группы клеток

1	HIP-CAR
2	CAR к EGFRt
3	CAR к EGFRt+tKO*
4	Ложно-трансфицированные Т-клетки (т. е. Т-клетки, которые были ложно-трансфицированы)

* подтверждена значимость CD47 в отношении защиты от уничтожения NK-клетками/макрофагами

[796] Блокирование CD47 с помощью IgG1Fc к SIRPα или IgG4Fc к SIRPα наблюдали in vitro. Изучали влияние на NK-клетках (Фиг. 28A), макрофаги (FIG. 28B), CD19 HIP CAR и Nk-клетки (Фиг. 29A), и CD19 HIP CAR и макрофагах (Фиг. 29B).

[797] Мышей NSG изучали на модели опухоли Nalm6. Адоптивный перенос человеческих NK-клеток и HIP CAR-Т-клеток человека осуществляли внутривенно со слитым белком и без него внутривенно. 100 ЕД/мл IL-2 размораживали в течение ночи перед сортировкой, а затем 100 ЕД/мл IL-2 в течение ночи после сортировки и перед инъекцией (Фиг. 30). Когда HIP CAR были устранены с помощью стратегии безопасности, опухоль Nalm-6 (Фиг. 31).

[798] Как показано на Фиг. 32, (a) у мышей, получавших лечение ложно-трансфицированными Т-клетками, а именно Т-клетками, которые были ложно-трансфицированы, развились опухоли; (b) у мышей, получавших лечение HIP CAR-Т-клетками, наблюдалось исчезновение опухоли; и (c) лечение слитым белком IgG1 и IgG4 приводила к уничтожению HIP CAR-Т-клеток из-за блокирования CD47, и поэтому рост опухоли оказался сопоставимым с группой ложно-трансфицированных Т-клеток. Слитые

белки IgG1 и IgG4 против CD47 элиминировали HIP CAR-T-клетки, что указывает на рост опухоли Nalm-6 (Фиг. 33 и 34).

F. Первичные HIP островки мыши: in vitro и in vivo MIAP410

[799] Блокирование антителом к CD47 MIAP410 наблюдали in vitro в первичных HIP островках мыши. Как показано на Фиг. 35A, уничтожение NK-клеток в результате MIAP410. Как показано на Фиг. 35B, наблюдали уничтожение макрофагов.

[800] Блокирование с помощью MIAP410 наблюдали in vivo в первичных HIP островках мыши. 1 мышь соответствовала примерно 150 кластерам островков. 1 островок соответствовал ~1500 клеток. При трансплантации использовали 300 кластеров на мышь (18-20 г), т.е. около 450000 клеток (450 тыс.) внутримышечно (в/м).

Таблица 23. Исследование HIP островковых клеток

Группа	**Линия клеток**	**N**	**Линия**	**Доза клеток**	**ROA**	**Безопасность**
1	Luc+ HIP* островки	5	BALB/c	300 кластеров	в/м	MIAP410, 5 мг; Д7, 8, 9, 10, пока клетки не погибнут
2	Luc+ HIP* островки	5	BALB/c	300 кластеров	в/м	Изотипический контроль IgG1

*HIP островок от B2M-/- мышей; CD47, доставляемый лентивирусом

[801] Диабет индуцировали в клетках мышей с помощью STZ. Через 6 дней аллогенные HIP островковые клетки (гаплотип MHC: $H2^b$; MOI 20 для luc и CD47 (промотор CAG)) вводили/трансплантировали мышам. (Фиг. 36). Было проведено исследование стратегии безопасности с использованием трансплантации первичных островков аллогенных мышей Balb/C. Как показано на Фиг. 37A-C, аллогенные HIP островки оставались функциональными и приводили к излечению диабета у аллогенных мышей. При внутримышечном введении 5 мг изотипического контроля IgG1 уничтожения HIP островков не наблюдали. Как показано на Фиг. 38A-C, HIP островки оставались функциональными у аллогенных мышей и приводили к излечению диабета при внутримышечной инъекции 5 мг MIAP410 на Д7-Д18. Когда использовали антитело к CD47 («стратегия безопасности»), HIP островки погибали, и у мышей снова развивался диабет.

Пример 5. Введение антитела к CD47 MIAP410 с доменом Fc IgG1 мыши блокирует CD47 в клетках человека in vivo с адоптивным переносом NK-клеток человека

[802] Следовали протоколам, описанным в Примере 4.

A. Отсутствие зависимости от IL-2

[803] Как показано на Фиг. 39A-B, когда HIP иПСК человека инъецировали мышам NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека и макрофагов человека, введение

MIAP410 с Fc изотипа IgG1 приводило к зависимому от времени уничтожению клетками врожденного иммунитета со стимуляцией IL-2 in vivo или без нее, возможно, за счет активации макрофагов NSG.

B. Изменение результатов в зависимости от того, когда начинается лечение

[804] Как показано на Фиг. 40A-B, местное подкожное введение более высокой дозы (ВД; три раза) MIAP410, начиная с 0-го дня (Д0), оказалось более эффективным, чем начало лечения на 11-й день. Внутрибрюшинная доза была столь же эффективна, как и местная доза на Д0, но не на Д11.

C. Местное лечение в головном мозге

[805] Как показано на Фиг. 41, местное лечение в головном мозге было столь же эффективным, как и местное подкожное лечение. Внутрибрюшинное лечение оказалось эффективным, когда гематоэнцефалический барьер был нарушен, что обеспечило более легкий доступ для MIAP410.

D. Блокирование CD47 in vivo при одновременном введении IL-2 приводит к гибели HIP иПСК

[806] Как показано на Фиг. 42A-B, HIP иПСК человека образовывали тератомы у мышей NSG с адоптивно перенесенными NK-клетками. Когда HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток, введение контроля Fc изотипа IgG1 не влияло на выживаемость HIP.

[807] Как показано на Фиг. 43A-B, когда HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека, местное введение низкой дозы в 500 мг MIAP410 с Fc изотипа IgG1 с одновременным введением IL-2 с NK-клетками для активации приводило к уничтожению HIP иПСК. Лечение антителом MIAP410 проводили в период от Д0 до Д10 и прекращалось после 10-го дня (Д10). Было замечено, что иПСК не обнаруживались вновь при последующем наблюдении через 6 месяцев после лечения.

[808] Как показано на Фиг. 44A-B, HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток, а MIAP410 с Fc изотипа IgG1 вводили местно (НД 500 мг) с одновременным введением IL-2 с NK-клетками для активации. Лечение антителом MIAP410 начинали на 3-й день (Д3) и проводили в период с Д3 по Д36. Для подгруппы мышей повторное лечение начинали на Д80. При последующем наблюдении через 6 месяцев после начала лечения было отмечено, что у 1 мыши были элиминированы иПСК, тогда как тератома развилась у 4 мышей, при повторном лечении у 1 мыши были элиминированы иПСК.

[809] Как показано на Фиг. 45A-B, HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток, а MIAP410 с Fc изотипа IgG1 вводили местно (НД 500 мг) с одновременным введением IL-2 с NK-клетками для активации. Лечение антителом MIAP410 начинали на 11-й день (Д11) и проводили в период с Д11 по Д36. При последующем наблюдении через 6 месяцев после начала лечения было отмечено, что иПСК были уничтожены у 1 мыши, а тератома развилась у 4 мышей.

Е. Блокирование CD47 in vivo без одновременного введения IL-2 приводит к гибели HIP иПСК

[810] Как показано на Фиг. 46A-B, когда HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека, местное введение НД 500 мг MIAP410 с Fc изотипа IgG1 приводило к уничтожению HIP иПСК. Лечение антителом MIAP410 начинали на 0 день (Д0) и проводили в период Д0-Д10, при этом лечение прекращали после Д16. При последующем наблюдении через 6 месяцев после начала лечения было отмечено, что иПСК не обнаруживались вновь у 4 мышей, тогда как у 1 мыши развилась тератома, которая была отрицательной по люциферазе.

[811] Как показано на Фиг. 47A-B, когда HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека, местное введение НД 500 мг MIAP410 с Fc изотипа IgG1 приводило к уничтожению HIP иПСК. Лечение антителом MIAP410 начинали на 3 день (Д3) и проводили в период Д3-Д11, при этом лечение прекращали после Д11. При последующем наблюдении через 6 месяцев после начала лечения было отмечено, что иПСК не обнаруживались вновь ни у одной из мышей.

[812] Как показано на Фиг. 48A-B, HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток, а MIAP410 с Fc изотипа IgG1 вводили местно (НД 500 мг). Лечение антителом MIAP410 начинали на 11 день (Д11) и проводили в период Д11-Д36, при этом лечение прекращали после Д36. При последующем наблюдении через 6 месяцев после начала лечения было отмечено, что иПСК были уничтожены у 1 мыши, а тератома развилась у 3 мышей.

[813] Как показано на Фиг. 49A-B, когда HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека, местное введение высокой дозы в 1 мг MIAP410 с Fc изотипа IgG1 приводило к уничтожению HIP иПСК. Лечение антителом MIAP410 проводили на Д0, Д1 и Д3. При последующем наблюдении через 120 дней после начала лечения было отмечено, что иПСК не обнаруживали вновь ни у одной мыши.

[814] Как показано на Фиг. 50A-B, HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток, а MIAP410 с Fc изотипа IgG1 вводили местно (ВД 1 мг). Лечение антителом MIAP410 проводили на Д11, Д12 и Д14. При последующем наблюдении через 44 дня после начала лечения было отмечено, что иПСК не обнаруживали вновь у 3 мышей, а тератомы развились у 2 мышей.

[815] Как показано на Фиг. 51A-B, когда HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека, внутрибрюшинное введение высокой дозы в 1 мг MIAP410 с Fc изотипа IgG1 приводило к уничтожению HIP иПСК. Лечение антителом MIAP410 проводили на Д0, Д1 и Д3. При последующем наблюдении через 100 дней после начала лечения было отмечено, что иПСК не обнаруживали вновь ни у одной мыши.

[816] Как показано на Фиг. 52A-B, HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток, а MIAP410 с Fc изотипа IgG1

вводили путем внутрибрюшинно (ВД 1 мг). Лечение антителом MIAP410 проводили на Д11, Д12 и Д14. При последующем наблюдении через 44 дня после начала лечения было отмечено, что иПСК не обнаруживали вновь у 1 мыши, а тератомы развились у 6 мышей.

Пример 6. Уничтожение гипоиммунных клеток человека у мышей in vivo с адоптивным переносом человеческих NK-клеток/микроглии или без него при лечении антителом к CD47 MIAP410 с доменом Fc IgG1 различается между телом и головным мозгом мыши

[817] Следовали протоколы, описанным в Примере 4.

[818] Как показано на Фиг. 53, когда клетки dKO человека (B2M-/CIITA-/-) вводили подкожно мышам NSG, иПСК человека уничтожались NK-клетками человека при адоптивном переносе NK-клеток человека, в то время как иПСК человека уничтожались макрофагами NSG, когда не проводили адоптивный перенос NK-клеток. Последнее предположительно связано с «ксеногенным распознаванием отсутствия аутоантигенных сигналов» макрофагами.

[819] Как показано на Фиг. 54**,** когда клетки dKO человека (B2M-/CIITA-/-) вводили в головной мозг мышей NSG, иПСК человека погибали при адоптивном переносе NK-клеток человека или микроглии человека. Однако иПСК человека не были уничтожены только микроглией NSG, когда не проводили адоптивный перенос NK-клеток человека или микроглии человека. Последнее, по-видимому, связано с отсутствием «ксеногенного распознавания отсутствия аутоантигенных сигналов» микроглией.

А. Распознавание отсутствия аутоантигенных сигналов в головном мозге зависит от аллогенной микроглии

[820] Как показано на Фиг. 55A-B, 5×10^4 клеток dKO человека (B2M-/-CIITA-/-) вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека или без него. При адоптивном переносе человеческих NK-клеток иПСК dKO человека убивали подкожно. Когда человеческие NK-клетки не переносились, иПСК dKO человека были уничтожены макрофагами NSG, предположительно посредством «ксеногенного распознавания отсутствия аутоантигенных сигналов».

[821] Как показано на Фиг. 56A-B, 5×10^4 клеток dKO человека (B2M-/-CIITA-/-) инъецировали в головной мозг мышей NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека или без него. ИПСК dKO человека были уничтожены в головном мозге при адоптивном переносе человеческих NK-клеток, но не с помощью микроглии NSG, когда перенос NK-клеток не проводили.

[822] Как показано на Фиг. 57A-B, когда 5×10^4 клеток dKO человека (B2M-/-CIITA-/-) инъецировали в головной мозг мышей NSG с адоптивным переносом микроглии человека, иПСК dKO человека уничтожались в головном мозге, предположительно, посредством аллогенного распознавания отсутствия аутоантигенных сигналов.

Пример 7. CD47 защищает гипоиммунные клетки человека в головном мозге мыши от уничтожения, опосредованного микроглией

[823] Следовали протоколы, описанным в Примере 4.

[824] Как показано на Фиг. 58, при совместном культивировании dKO человека дикого типа, dKO (B2M-/-CIITA-/-) или HIP 1.0 (B2M-/-CIITA-/- CD47 tg) с аллогенными человеческими макрофагами или микроглией, CD47 защищал клетки dKO как от уничтожения макрофагами, так и от уничтожения микроглией.

A. Различия в уничтожении клеток dKO микроглией и макрофагами

[825] Как показано на Фиг. 59, когда клетки dKO человека (B2M-/-CIITA-/-) совместно культивировали с аллогенными макрофагами человека или микроглией, или клетки dKO мыши (B2M-/-CIITA-/-) совместно культивировали с аллогенными мышиными макрофагами или микроглией, аллогенные макрофаги и микроглия распознавали отсутствие аутоантигенных сигналов и уничтожали клетки dKO.

[826] Как показано на Фиг. 60, когда клетки dKO человека (B2M-/-CIITA-/-) совместно культивировали с ксеногенными (межвидовыми) мышиными макрофагами или микроглией, или клетки dKO мыши (B2M-/-CIITA-/-) совместно культивировали с ксеногенными человеческими макрофагами или микроглией, ксеногенные макрофаги и микроглия не распознавали отсутствие аутоантигенных сигналов и, следовательно, не уничтожали клетки dKO.

B. Исследования дозирования

[827] Как показано на Фиг. 61A-B, когда HIP иПСК человека вводили интракраниально мышам NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека, местное введение высокой дозы (мышиный IgG1; 1 мг) местного изотипического контроля IgG1 на Д0, Д1 и Д3 не влияло на выживаемость HIP.

[828] Как показано на Фиг. 62A-B, когда иПСК человека HIP вводили интракраниально мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток, местное введение MIAP410 в высокой дозе (1 мг) на Д0, Д1 и Д3 приводило к уничтожению HIP иПСК в головном мозге. После 40-дневного последующего наблюдения было замечено, что иПСК больше не обнаруживали.

[829] Как показано на Фиг. 63A-B, когда HIP иПСК человека инъецировали интракраниально мышам NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека, внутрибрюшинное введение MIAP410 в высокой дозе (1 мг) на Д0, Д1 и Д3, при этом гематоэнцефалический барьер был нарушен инъекциями маннитола, приводило к уничтожению HIP иПСК в головном мозге. После 40-дневного последующего наблюдения было замечено, что иПСК не обнаруживали повторно у 4 из 5 мышей.

Пример 8. Введение антитела к CD47 B6H12 с доменом Fc IgG1 мыши блокирует CD47 в гипоиммунных клетках человека in vitro и/или in vivo

[830] Следовали протоколам, описанным в Примере 4.

[831] Введение антитела к CD47 B6H12 с доменом Fc IgG1 мыши блокирует CD47 в гипоиммунных клетках человека в присутствии человеческих NK-клеток и/или макрофагов in vitro. На Фиг. 64A (HIP иПСК человека и NK-клетки человека) и на Фиг. 64B (HIP иПСК человека и макрофаги человека) демонстрируют, что введение 100 мг/мл антитела к CD47 B6H12 in vitro для нацеливания на HIP иПСК человека приводило к

уничтожению NK-клетками человека и макрофагами человека.

[832] Введение антитело к CD47 B6H12 с доменом Fc мышиного IgG1 блокирует CD47 в гипоиммунных клетках человека in vivo с адоптивным переносом NK-клеток человека. Как показано на Фиг. 65, подкожное введение более высокой дозы (ВД) по 1 мг три раза оказалось более эффективным, чем непрерывное введение низкой дозы (500 мг) антитела к CD47 B6H12. Внутрибрюшинная доза оказалась неэффективной.

А. Изменение результатов в зависимости от того, когда начинается лечение

[833] Как показано на Фиг. 66A-B, HIP иПСК человека образовывали тератомы у мышей NSG с адоптивно перенесенными NK-клетками. Когда HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток, местное введение низкой дозы (500 мг) контроля Fc изотипа IgG4 в период Д0-Д40 не влияло на выживаемость HIP.

[834] Как показано на Фиг. 67A-B, HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток, и местно вводили антитело к CD47 B6H12 с Fc изотипа IgG1 (НД 500 мг). Лечение антителами B6H12 проводили в период Д0-Д96. Было замечено, что иПСК были элиминированы у 2 мышей, а тератомы развились у 3 мышей при последующем наблюдении через 6 месяцев после лечения.

[835] Как показано на Фиг. 68A-B, HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток, а B6H12 с Fc изотипа IgG1 вводили местно (НД 500 мг). Лечение антителами B6H12 проводили в период Д3-Д40. При последующем наблюдении через 40 дней от начала лечения у всех 4 мышей наблюдалось развитие тератомы.

[836] Как показано на Фиг. 69A-B, HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток, а B6H12 с Fc изотипа IgG1 вводили местно (НД 500 мг). Лечение антителами B6H12 проводили в период Д11-Д44. При последующем наблюдении через 160 дней от начала лечения у 4 из 5 мышей наблюдалось развитие тератомы.

[837] Как показано на Фиг. 70A-B, когда HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека, местное введение высокой дозы в виде 1 мг B6H12 с Fc изотипа IgG1 приводило к уничтожению HIP иПСК. Лечение антителом B6H12 проводили три раза на Д0, Д1 и Д3. При последующем наблюдении через 120 дней от начала лечения было отмечено, что иПСК не обнаружили вновь ни у одной мыши.

[838] Как показано на Фиг. 71A-B, когда HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека, местное введение ВД 1 мг B6H12 с Fc изотипа IgG1 приводило к уничтожению HIP иПСК. Лечение антителом B6H12 проводили три раза на Д3, Д4 и Д6. При последующем наблюдении через 100 дней от начала лечения было отмечено, что иПСК не обнаружили вновь ни у одной мыши.

[839] Как показано на Фиг. 72A-B, когда HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом NK-клеток человека, местное введение ВД 1 мг

B6H12 с Fc изотипа IgG1 приводило к уничтожению HIP иПСК. Лечение антителом B6H12 проводили трижды на Д11, Д12, Д14. При последующем наблюдении через 40 дней от начала лечения было отмечено, что иПСК не обнаружили вновь ни у одной мыши.

[840] Как показано на Фиг. 73A-B, HIP иПСК человека вводили подкожно мышам NSG с адоптивным переносом человеческих NK-клеток, а внутрибрюшинное введение B6H12 с Fc изотипа IgG1 (ВД 1 мг) выполняли три раза на Д0, Д1 и Д3. При последующем наблюдении через 120 дней от начала лечения у всех 4 мышей развилась тератома.

Пример 9. Введение флуцитозина и/или ганцикловира приводит к уничтожению гипоиммунных клеток in vitro и/или in vivo

[841] Следовали протоколам, описанным в Примере 4.

A. Синтетические препараты флуцитозин и ганцикловир, in vitro

[842] Синтетические препараты флуцитозин и ганцикловир изучали in vitro на предмет их действия на цитозиндезаминазу и аварийный переключатель HsVtk, соответственно. Было обнаружено, что все протестированные клоны имели достаточные уровни CD47 для защиты от уничтожения NK-клеток и макрофагов (Фиг. 74). Также были получены данные об уничтожении пролекарственными средствами (Фиг. 75).

B. Синтетический препарат флуцитозина in vivo

[843] Синтетический препарат флуцитозин был изучен in vivo на предмет его влияния на переключатель цитозиндезаминазы. HIP иПСК человека (клон 2G11 CyD) вводили подкожно мышам NSG группы 5. В качестве контроля использовали солевой раствор. Как показано на Фиг. 76A-B, иПСК HIP-CyD человека образовывали тератомы у мышей NSG (контроль солевым раствором). Лечение для мышей группы 5 было следующим: HIP чиПСК, клон 2G11 CyD, в разбавленном MG, подкожно, без лечения (солевой раствор, в/б, Д0).

[844] HIP иПСК человека (клон 2G11 CyD) вводили подкожно мышам NSG группы 1. Лечение флуцитозином в низкой дозе (200 мг/кг) проводили ежедневно путем внутрибрюшинного введения. Как показано на Фиг. 77A-B, дозирование флуцитозина в низкой дозе приводило к уничтожению иПСК HIP-CyD в течение 16-44 дней. Лечение для мышей группы 1 было следующим: 1×10^6 HIP чиПСК клон 2G11 CyD в разбавленном MG, п/к; лечение=200 мг/кг/день флуцитозина, в/б (Д0).

[845] HIP иПСК человека (клон 2G11 CyD) вводили подкожно мышам NSG группы 2. Лечение флуцитозином в высокой дозе (500 мг/кг) проводили ежедневно путем внутрибрюшинного введения. Как показано на Фиг. 78A-B, дозирование флуцитозина в высокой дозе приводило к уничтожению иПСК HIP-CyD в течение 16-32 дней с последующим наблюдением в течение 44 дней. Никаких существенных преимуществ высокой дозы по сравнению с низкой дозой не наблюдали. Лечение для мышей группы 2 было следующим: 1×10^6 HIP чиПСК клон 2G11 CyD в разбавленном MG, п/к; лечение=500 мг/кг/день флуцитозина, в/б (Д0).

[846] HIP иПСК человека (клон 2G11 CyD) вводили подкожно мышам NSG группы 3. Лечение флуцитозином в низкой дозе (200 мг/кг) начинали на 13-й день, а затем

производили ежедневное внутрибрюшинное введение препарата. как показано на Фиг. 79A-B, дозирование флуцитозина в низкой дозе приводило к уничтожению иПСК HIP-CyD в течение 3-11 дней после начала лечения. Мышей проверяли в течение 40 дней последующего наблюдения. Лечение для мышей группы 3 было следующим: 1×10^6 HIP чиПСК клон 2G11 CyD в разбавленном MG, п/к; лечение=200 мг/кг/день флуцитозина, в/б (Д13).

[847] HIP иПСК человека (клон 2G11 CyD) вводили подкожно мышам NSG группы 4. Лечение флуцитозином в высокой (500 мг/кг) проводили ежедневно путем внутрибрюшинного введения препарата, начиная с 13 дня. как показано на Фиг. 80A-B, дозирование флуцитозина в низкой дозе приводило к уничтожению иПСК HIP-CyD в течение 3-11 дней после начала лечения. Мышей проверяли в течение 40 дней последующего наблюдения. Никаких преимуществ высокой дозы сравнению с низкой дозой не наблюдали. Лечение для мышей группы 4 было следующим: 1×10^6 HIP чиПСК клон 2G11 CyD в разбавленном MG, п/к; лечение=500 мг/кг/день флуцитозина, в/б (Д13).

[848] HIP иПСК человека (клон 15; без аварийного переключателя) вводили подкожно мышам NSG группы 6. Лечение флуцитозином в высокой дозе (500 мг/кг) проводили ежедневно путем внутрибрюшинного введения. как показано на Фиг. 81A-B, выживаемость HIP иПСК человека, по-видимому, была снижена флуцитозином в высокой дозе, хотя в клетках не было аварийного переключателя. Группа была расширена для проверки данных (Фиг. 81C-D и Фиг. 81E-F). Лечение для мышей группы 6 было следующим: 1×10^6 HIP чиПСК клон 15 в разбавленном MG, п/к; лечение=500 мг/кг/день флуцитозина, в/б (Д0).

[849] Мышам NSG подкожно вводили 1×10^6 luc+ HIP иПСК (клон 2-G11 цитозиндезаминазы) человека. В этой контрольной группе лечение не проводили. как показано на Фиг. 82A-B, было замечено, что редактирование гена цитозиндезаминазы не влияло на иПСК, которые остались живыми у мышей NSG.

С. Синтетический препарат ганцикловира in vivo

[850] Синтетический препарат ганцикловир был изучен in vivo на предмет его воздействия на аварийный переключатель HsVtk. HIP иПСК человека (клон 1-B10 HSVTk) вводили подкожно мышам NSG группы 5. Контрольная группа получала солевой раствор. как показано на Фиг. 83A-B, выживаемость иПСК HIP-HsVtk человека, по-видимому, была снижена у мышей NSG, возможно, из-за редактирования аварийного переключателя. Лечение для мышей группы 5 было следующим: 1×10^6 HIP чиПСК luc+ клон 1-B10 HSVtk в разбавленном MG, п/к; без лечения (солевой раствор, в/б, Д0).

[851] HIP иПСК человека (клон 1-B10 HSVTk) вводили подкожно мышам NSG группы 1. Лечение ганцикловиром в низкой дозе (50 мг/кг) проводили ежедневно путем внутрибрюшинного введения. как показано на Фиг. 84A-B, дозирование ганцикловира в низкой дозе приводило к уничтожению иПСК HIP-HsVtk в течение 12-24 дней. Мышей проверяли в течение 44 дней последующего наблюдения. Лечение для мышей группы 1 было следующим: 1×10^6 HIP чиПСК luc+ клон 1-B10 HSVtk в разбавленном MG, п/к;

лечение включало 50 мг/кг/день ганцикловира, в/б (Д0).

[852] HIP иПСК человека (клон 1-B10 HSVTk) вводили подкожно мышам NSG группы 2. Лечение ганцикловиром в высокой дозе (75 мг/кг) проводили ежедневно путем внутрибрюшинного введения. как показано на Фиг. 85A-B, дозирование ганцикловира в высокой дозе приводило к уничтожению иПСК HIP-HsVtk в течение 12-16 дней. Мышей проверяли в течение 40 дней последующего наблюдения. Высокая доза оказалась в незначительной степени полезной. Лечение для мышей группы 2 было следующим: 1×10^6 HIP чиПСК luc+ клон 1-B10 HSVtk в разбавленном MG, п/к; лечение включало 75 мг/кг/день ганцикловира, в/б (Д0).

[853] HIP иПСК человека (клон 1-B10 HSVTk) вводили подкожно мышам NSG группы 3. Лечение ганцикловиром в низкой дозе (50 мг/кг) проводили ежедневно путем внутрибрюшинного введения препарата, начиная с 13 дня. как показано на Фиг. 86A-B, дозирование ганцикловира в низкой дозе приводило к уничтожению иПСК HIP-HsVtk в течение 7 дней после начала лечения. Мышей проверяли в течение 40 дней последующего наблюдения. Лечение для мышей группы 3 было следующим: 1×10^6 HIP чиПСК luc+ клон 1-B10 HSVtk в разбавленном MG, п/к; лечение включало 50 мг/кг/день ганцикловира, в/б (Д13).

[854] HIP иПСК человека (клон 1-B10 HSVTk) вводили подкожно мышам NSG группы 4. Лечение ганцикловиром в высокой дозе (75 мг/кг) проводили ежедневно путем внутрибрюшинного введения препарата, начиная с 13 дня. как показано на Фиг. 87A-B, дозирование ганцикловира в высокой дозе приводило к уничтожению иПСК HIP-HsVtk в течение 7 дней после начала лечения. Мышей проверяли в течение 40 дней последующего наблюдения. Очевидного преимущества высокой дозы по сравнению с низкой дозой не наблюдали. Лечение для мышей группы 4 было следующим: 1×10^6 HIP чиПСК luc+ клон 1-B10 HSVtk в разбавленном MG, п/к; лечение включало 75 мг/кг/день ганцикловира, в/б (Д13).

[855] HIP иПСК человека (клон 15; без аварийного переключателя) вводили подкожно мышам NSG группы 6. Лечение ганцикловиром в высокой дозе (75 мг/кг) проводили ежедневно путем внутрибрюшинного введения препарата, начиная с 0 дня. как показано на Фиг. 88A-B, лечение ганцикловиром в высокой дозе, по-видимому, не влияло на HIP иПСК без аварийного переключателя. Лечение для мышей группы 6 было следующим: 1×10^6 HIP чиПСК luc+ клон 15 в разбавленном MG, п/к; лечение включало 75 мг/кг/день ганцикловира, в/б (Д0).

[856] Мышам NSG подкожно вводили 1×10^6 luc+ HIP иПСК (клон 1-B10 HSVtk) человека. Лечение не проводили (пилотное исследование). как показано на Фиг. 89A-B, для контрольной группы редактирование HSVtk, по-видимому, не влияло на выживаемость иПСК у мышей NSG.

Заключение

[857] Приведенное выше подробное описание вариантов осуществления технологии не предназначено для того, чтобы быть исчерпывающим или ограничивать

технологию точными формами, раскрытыми выше. Хотя конкретные варианты осуществления и примеры технологии описаны выше в иллюстративных целях, в пределах объема технологии возможны различные эквивалентные модификации, как будет понятно специалистам в соответствующей области техники. Например, хотя стадии представлены в заданном порядке, в альтернативных вариантах осуществления стадии могут выполняться в другом порядке. Различные варианты осуществления, описанные выше, можно также объединять, получая дополнительные варианты осуществления.

[858] Из вышесказанного следует, что конкретные варианты осуществления технологии были описаны в настоящем документе в целях иллюстрации, но известные компоненты и функции не были показаны или описаны подробно, чтобы избежать излишнего углубления в описании вариантов осуществления технологии. Если позволяет контекст, термины в единственном или множественном числе могут также включать термин во множественном или единственном числе, соответственно. Кроме того, несмотря на то, что преимущества, связанные с некоторыми вариантами осуществления технологии, были описаны в контексте этих вариантов осуществления, другие варианты осуществления также могут демонстрировать такие преимущества, и не все варианты осуществления обязательно должны демонстрировать такие преимущества, чтобы подпадать в пределы объема технологии. Соответственно, изобретение и связанная с ним технология могут охватывать другие варианты осуществления, которые явно не показаны или не описаны в данном документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, причем субъекту ранее вводили популяцию клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47.

2. Способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию Т-клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47.

3. Способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию Т-клеток, (i) сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47, и по меньшей мере одного химерного антигенного рецептора (CAR), и (ii) имеющих сниженную экспрессию молекул HLA MHC класса I, молекул HLA MHC класса II, Т-клеточного рецептора (TCR) альфа и/или TCR бета.

4. Способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию Т-клеток, имеющих сниженную экспрессию молекул HLA MHC класса I, молекул HLA MHC класса II и TCR альфа, и сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47 и химерного антигенного рецептора CD19 (CAR).

5. Способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию островковых клеток поджелудочной железы, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47.

6. Способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию островковых клеток поджелудочной железы, (i) сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47, и (ii) имеющих сниженную экспрессию молекул HLA MHC класса I и/или молекул HLA MHC класса II.

7. Способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту блокирующего CD47-SIRPα агента, при этом субъекту ранее вводили популяцию островковых клеток поджелудочной железы, (i) сконструированных для экспрессии экзогенных полипептидов CD47, CD46 и CD59, и (ii) имеющих сниженную экспрессию молекул HLA MHC класса I и/или молекул HLA MHC класса II.

8. Способ уменьшения популяции клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47, у субъекта, включающий:

(a) введение субъекту первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента;

(b) определение первого результата для первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, введенного на стадии (a);

(c) необязательное введение второй дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, на основании первого результата, полученного на стадии (b); и

(d) необязательное определение второго результата для второй дозы блокирующего

CD47-SIRPα агента, введенного на стадии (c).

9. Способ, включающий:

(a) количественное определение популяции клеток, сконструированных для экспрессии экзогенного полипептида CD47 у субъекта;

(b) определение первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента, который эффективен в отношении уменьшения популяции клеток по меньшей мере на 20%; и

(c) введение субъекту первой дозы блокирующего CD47-SIRPα агента.

10. Способ по любому из пп. 2, 3 или 4, отличающийся тем, что Т-клетки представляют собой первичные клетки.

11. Способ по любому из пп. 2, 3 или 4, отличающийся тем, что Т-клетки являются аллогенными.

12. Способ по любому из пп. 2, 3 или 4, отличающийся тем, что Т-клетки дифференцируются из иПСК.

13. Способ по п. 2, отличающийся тем, что Т-клетки дополнительно сконструированы для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR).

14. Способ по любому из пп. 3, 4 или 13, отличающийся тем, что CAR представляет собой CAR к CD19, выбранный из группы, состоящей из тисагенлеклейцела, лизокабтагена маралейцела, аксикабтагена цилолейцела и брексукабтагена аутолейцела.

15. Способ по любому из пп. 3, 4 или 13, отличающийся тем, что CAR представляет собой CAR к CD19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что CAR к CD19 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 116.

17. Способ по любому из пп. 2, 3 или 4, отличающийся тем, что Т-клетки сконструированы для экспрессии по меньшей мере одного дополнительного фактора, выбранного из группы, состоящей из CD16, CD24, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, ингибитора C1, FASL, IDO1, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IL-10, IL-35, PD-1, PD-L1, серпина b9, CCl21, Mfge8 и их комбинации.

18. Способ по любому из пп. 5, 6 или 7, отличающийся тем, что островковые клетки поджелудочной железы сконструированы для экспрессии по меньшей мере одного дополнительного фактора, выбранного из группы, состоящей из CD16, CD24, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, ингибитора C1, FASL, IDO1, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IL-10, IL-35, PD-1, PD-L1, серпина b9, CCl21, Mfge8 и их комбинации.

19. Способ по любому из пп. 5, 6 или 7, отличающийся тем, что островковые клетки поджелудочной железы сконструированы таким образом, чтобы они имели сниженную экспрессию CD142.

20. Способ по любому из пп. 5, 6 или 7, отличающийся тем, что островковые клетки поджелудочной железы представляют собой первичные клетки.

21. Способ по любому из пп. 5, 6 или 7, отличающийся тем, что островковые

клетки поджелудочной железы дифференцируются из иПСК.

22. Способ по любому из пп. 3, 4 или 13, отличающийся тем, что CAR и ген, кодирующий экзогенный полипептид CD47, вводили в Т-клетки в бицистронном векторе.

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что бицистронный вектор вводили в Т-клетки через лентивирус.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что CAR и ген, кодирующий экзогенный полипептид CD47, находятся под контролем одного промотора.

25. Способ по п. 8, отличающийся тем, что первый результат и второй результат независимо выбраны из группы, состоящей из: (i) уменьшения количества клеток на около 10-100%, (ii) ослабления нежелательного явления на около 10-100% и (iii) комбинации (i) и (ii).

26. Способ по п. 8 или п. 9, отличающийся тем, что первую дозу и/или вторую дозу вводят:

(i) в количестве 0,05, 0,1, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг;

(ii) один раз каждые 12 часов, один раз каждые 24 часа, один раз каждые 36 часов или один раз каждые 48 часов; и/или

(iii) в течение периода от 1 дня до 3 недель.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что первая доза и вторая доза являются одинаковыми.

28. Способ по любому из пп. 1, 8 или 9, отличающийся тем, что клетки представляют собой первичные клетки.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что первичные клетки представляют собой Т-клетки или островковые клетки поджелудочной железы.

30. Способ по любому из пп. 1, 8 или 9, отличающийся тем, что клетки дифференцируются из иПСК.

31. Способ по любому из пп. 12, 21 или 30, отличающийся тем, что дифференцированные клетки выбраны из группы, состоящей из клеток сердца, нервных клеток, эндотелиальных клеток, Т-клеток, островковых клеток поджелудочной железы, клеток пигментного эпителия сетчатки, гепатоцитов, клеток щитовидной железы, клеток кожи, клеток крови, первичных клеток и эпителиальных клеток.

32. Способ по любому из пп. 1, 8 или 9, отличающийся тем, что клетки сконструированы для экспрессии по меньшей мере одного дополнительного фактора, выбранного из группы, состоящей из CD16, CD24, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, ингибитора C1, FASL, IDO1, HLA-C, HLA-E, тяжелой цепи HLA-E, HLA-G, IL-10, IL-35, PD-1, PD-L1, серпина b9, CCl21, Mfge8 и их комбинации.

33. Способ по любому из пп. 2, 3, 4 или 29, отличающийся тем, что Т-клетки сконструированы таким образом, чтобы они имели сниженную экспрессию TCRα и/или TCRβ.

34. Способ по любому из пп. 2, 3, 4 или 29, отличающийся тем, что Т-клетки

сконструированы таким образом, чтобы они имели сниженную экспрессию цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA4) и/или белка программируемой гибели клеток (PD1).

35. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что ген, кодирующий экзогенный полипептид CD47, вводили в клетку посредством опосредованной гомологичной репарацией (HDR) вставки в геномный локус клетки.

36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что геномный локус выбран из группы, состоящей из локуса B2M, локуса CIITA, локуса TRAC, локуса TRBC и локуса «безопасная гавань».

37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что локус «безопасная гавань» выбран из группы, состоящей из локуса AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 и SHS231.

38. Способ по любому из пп. 3, 4 или 13, отличающийся тем, что CAR связывает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD38, CD123, CD138, BCMA и их комбинации.

39. Способ по п. 8, отличающийся тем, что первый результат и/или второй результат представляет собой нежелательное явление.

40. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через один день после того, как субъекту ввели клетки.

41. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через одну неделю после того, как субъекту ввели клетки.

42. Способ по любому из пп. 1-7,отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент вводят по меньшей мере через один месяц после того, как субъекту ввели клетки.

43. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент вводят после того, как у субъекта развилось нежелательное явление, связанное с введенными клетками.

44. Способ по п. 39 или п. 43, отличающийся тем, что нежелательное явление выбрано из группы, состоящей из гиперпролиферации, трансформации, образования опухоли, синдрома высвобождения цитокинов, реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), связанного с иммунными эффекторными клетками синдрома нейротоксичности (ICANS - англ.: immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome), воспаления, инфекции, тошноты, рвоты, кровотечения, интерстициального пневмонита, респираторного заболевания, желтухи, потери веса, диареи, потери аппетита, судорог, боли в животе, веноокклюзионной болезни печени (VOD - англ.: veno-occlusive disease), отторжения трансплантата, поражения органов, бесплодия, гормональных изменений, образования с аномальным ростом, катаракты и посттрансплантационного лимфопролиферативного нарушения (PTLD - англ.: post-transplant lymphoproliferative

disorder).

45. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент содержит CD47-связывающий домен.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что CD47-связывающий домен содержит сигнальный регуляторный белок альфа (SIRPα) или его фрагмент.

47. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент содержит домен Fc иммуноглобулина G (IgG).

48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что домен Fc IgG включает домен Fc IgG1.

49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что домен Fc IgG1 содержит фрагмент человеческого антитела.

50. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из TTI-621, TTI-622 и ALX148.

51. Способ по п. 47, отличающийся тем, что домен Fc IgG включает домен Fc IgG4.

52. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент представляет собой антитело.

53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что антитело выбрано из группы, состоящей из MIAP410, B6H12 и магролимаба.

54. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент вводят в дозе, эффективной для уменьшения популяции клеток.

55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что популяция клеток уменьшается на около 10-100%.

56. Способ по п. 54, отличающийся тем, что популяция клеток элиминируется.

57. Способ по п. 54, отличающийся тем, что уменьшение популяции клеток происходит посредством иммунного ответа.

58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что иммунный ответ представляет собой опосредованное NK-клетками уничтожение клеток, опосредованное макрофагами уничтожение клеток, комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ) и/или антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ).

59. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту внутривенно, подкожно, внутрибрюшинно, внутримышечно или интракраниально.

60. Способ по п. 59, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент вводят субъекту с временным интервалом от 1 до 20 дней в течение периода от 10 дней до 6 месяцев.

61. Способ по п. 60, отличающийся тем, что субъекту вводят блокирующий CD47-SIRPα агент:

(i) в дозе 0,05, 0,1, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг;

(ii) один раз каждые 12 часов, один раз каждые 24 часа, один раз каждые 36 часов или один раз каждые 48 часов; и/или

(iii) в течение периода от 1 дня до 3 недель.

62. Способ по любому из пп. 1-9, дополнительно включающий введение субъекту IL-2.

63. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что блокирующий CD47-SIRPα агент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, которое связывает CD47, биспецифического антитела, которое связывает CD47, слитого белка иммуноцитокина, который связывает CD47, CD47-содержащего слитого белка, антитела или его фрагмента, которое связывает SIRPα, биспецифического антитела, которое связывает SIRPα, слитого белка иммуноцитокина, который связывает SIRPα, слитого белка, содержащего SIRPα, и их комбинации.

64. Способ по п. 63, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из магролимаба (Hu5F9-G4), CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801 (NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47 и IMC-002.

65. Способ по п. 63, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает CD47, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против CD47, Fab против CD47, нанотела VHH против CD47, DARPin против CD47 и их вариантов.

66. Способ по п. 63, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из ADU-1805, CC-95251, OSE-172 (BI 765063), KWAR23 и P362.

67. Способ по п. 63, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, которое связывает SIRPα, выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного фрагмента Fv (scFv) против SIRPα, Fab против SIRPα, наноантитела VHH против SIRPα, DARPin против SIRPα и их вариантов.

68. Способ по п. 63, отличающийся тем, что SIRPα-содержащий слитый белок содержит CD47-связывающий домен SIRPα, связанный с доменом Fc.

69. Способ по п. 68, отличающийся тем, что домен Fc содержит домен Fc или его часть, выбранные из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

70. Способ по любому из пп. 1, 2, 5, 8 или 9, отличающийся тем, что в клетках снижена экспрессия молекул HLA MHC класса I и/или молекул HLA MHC класса II.

71. Способ по любому из пп. 3, 4, 6, 7 или 70, отличающийся тем, что экспрессия MHC класса I и/или MHC класса II подавлена.

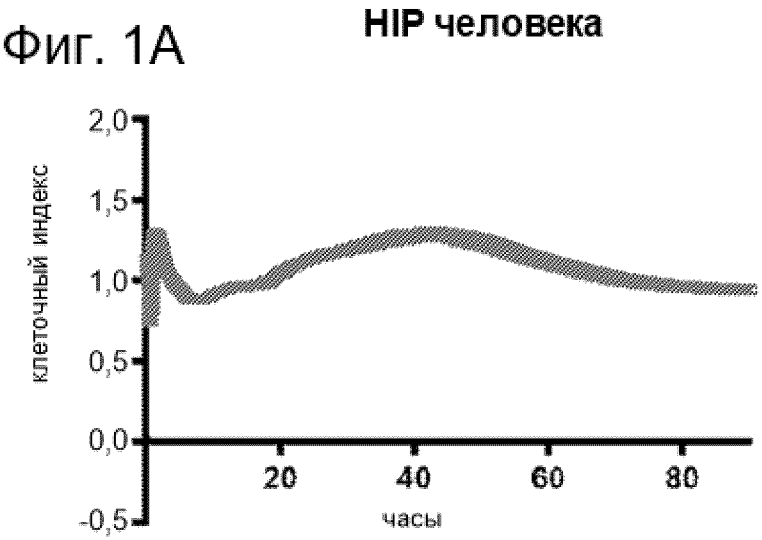
72. Способ по любому из пп. 3, 4, 6, 7, или 70, отличающийся тем, что сниженная экспрессия HLA MHC класса I опосредована сниженной экспрессией B2M, а сниженная экспрессия MHC класса II опосредована сниженной экспрессией CIITA.

73. Способ по п. 71, отличающийся тем, что экспрессия B2M и/или CIITA подавлена.

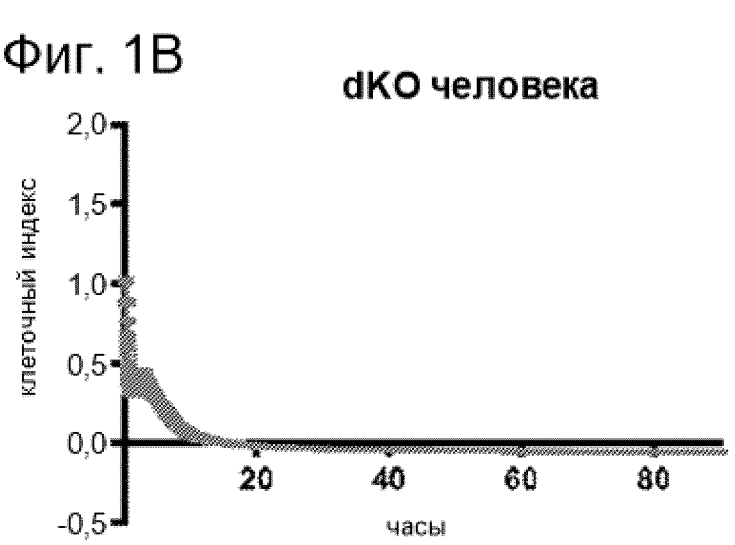
74. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что экзогенный полипептид CD47 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.

По доверенности

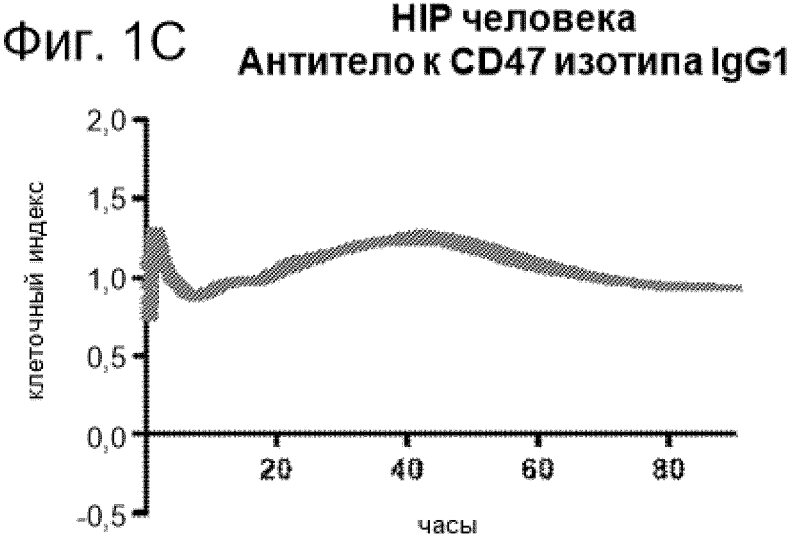
Фиг. 1A



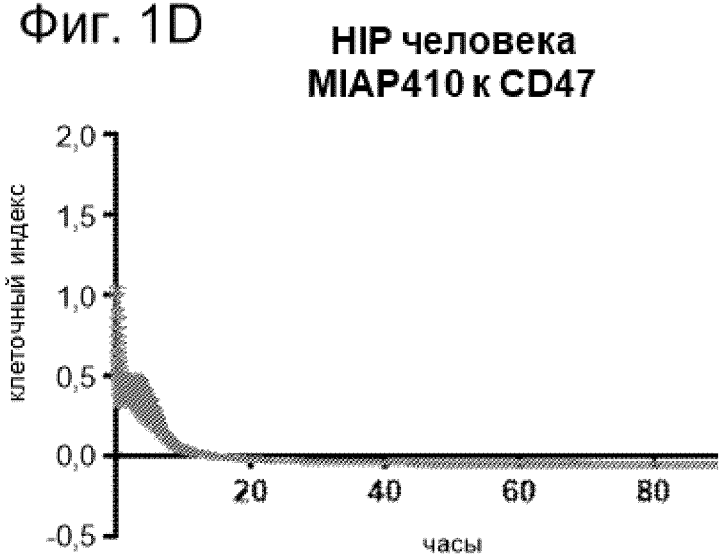
Фиг. 1B



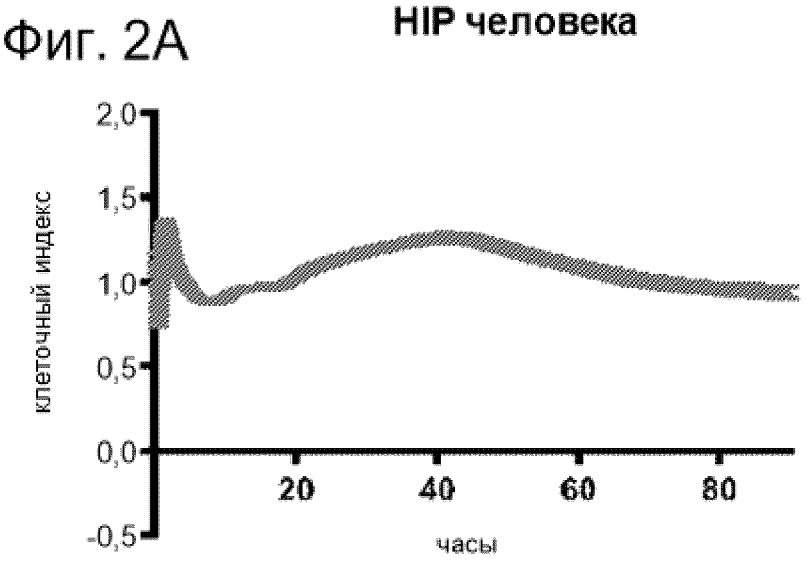
Фиг. 1C



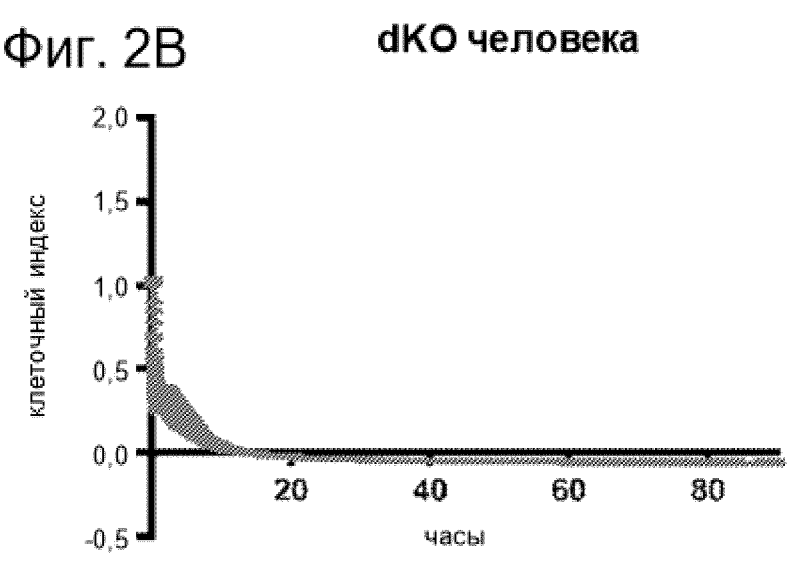
Фиг. 1D



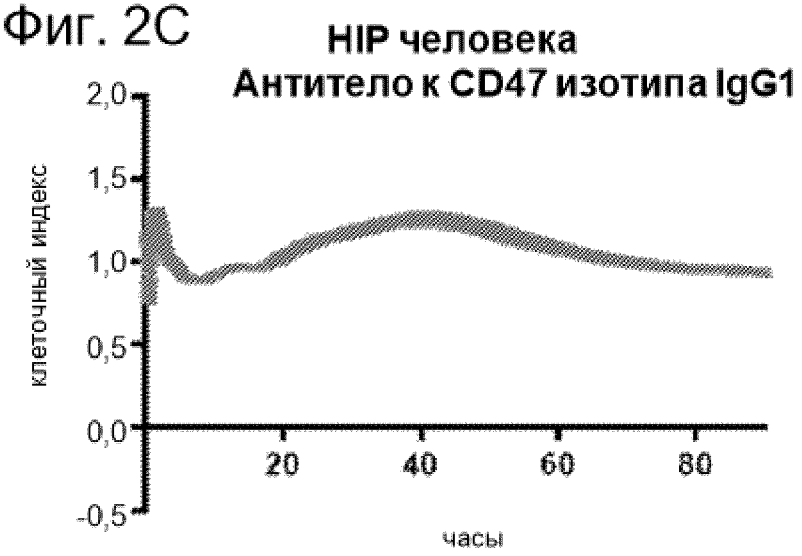
Фиг. 2A



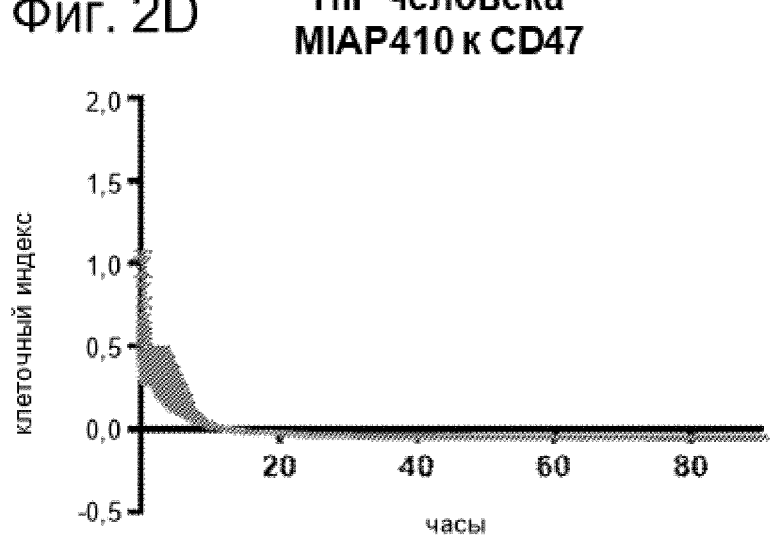
Фиг. 2B



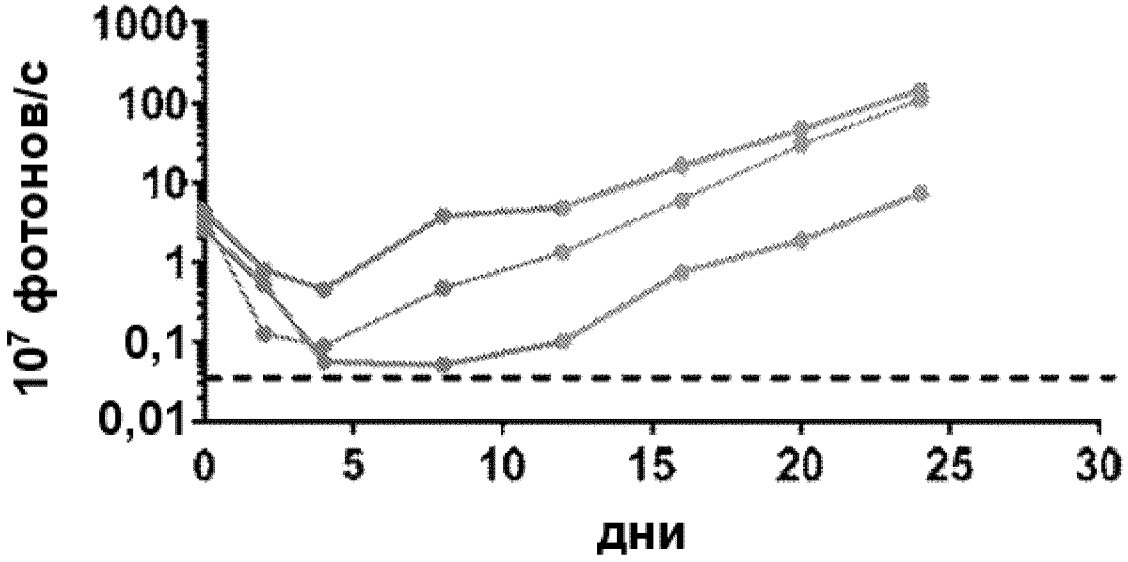
Фиг. 2C



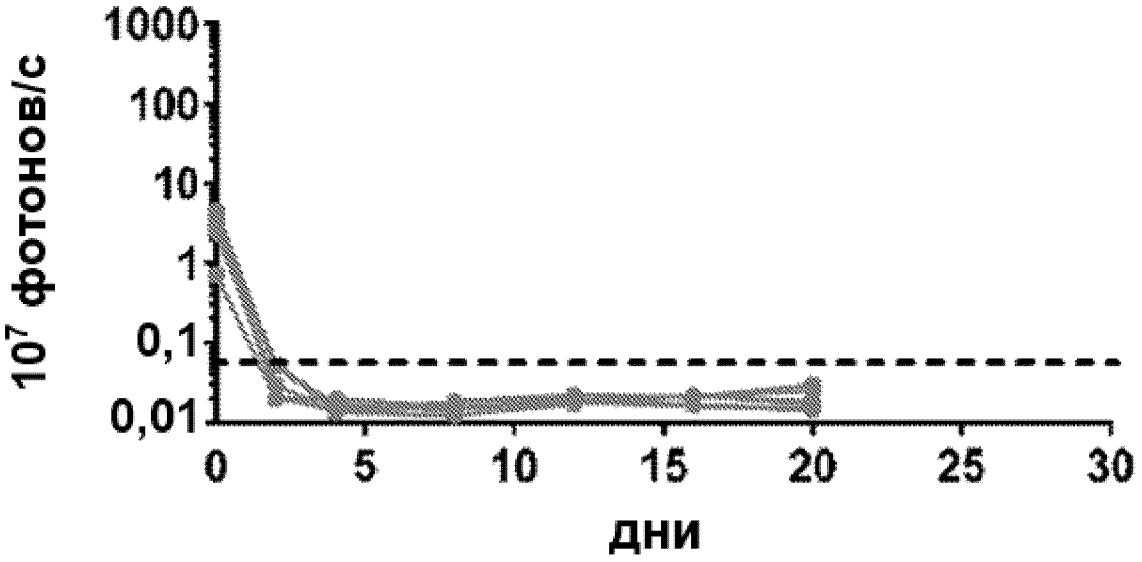
Фиг. 2D



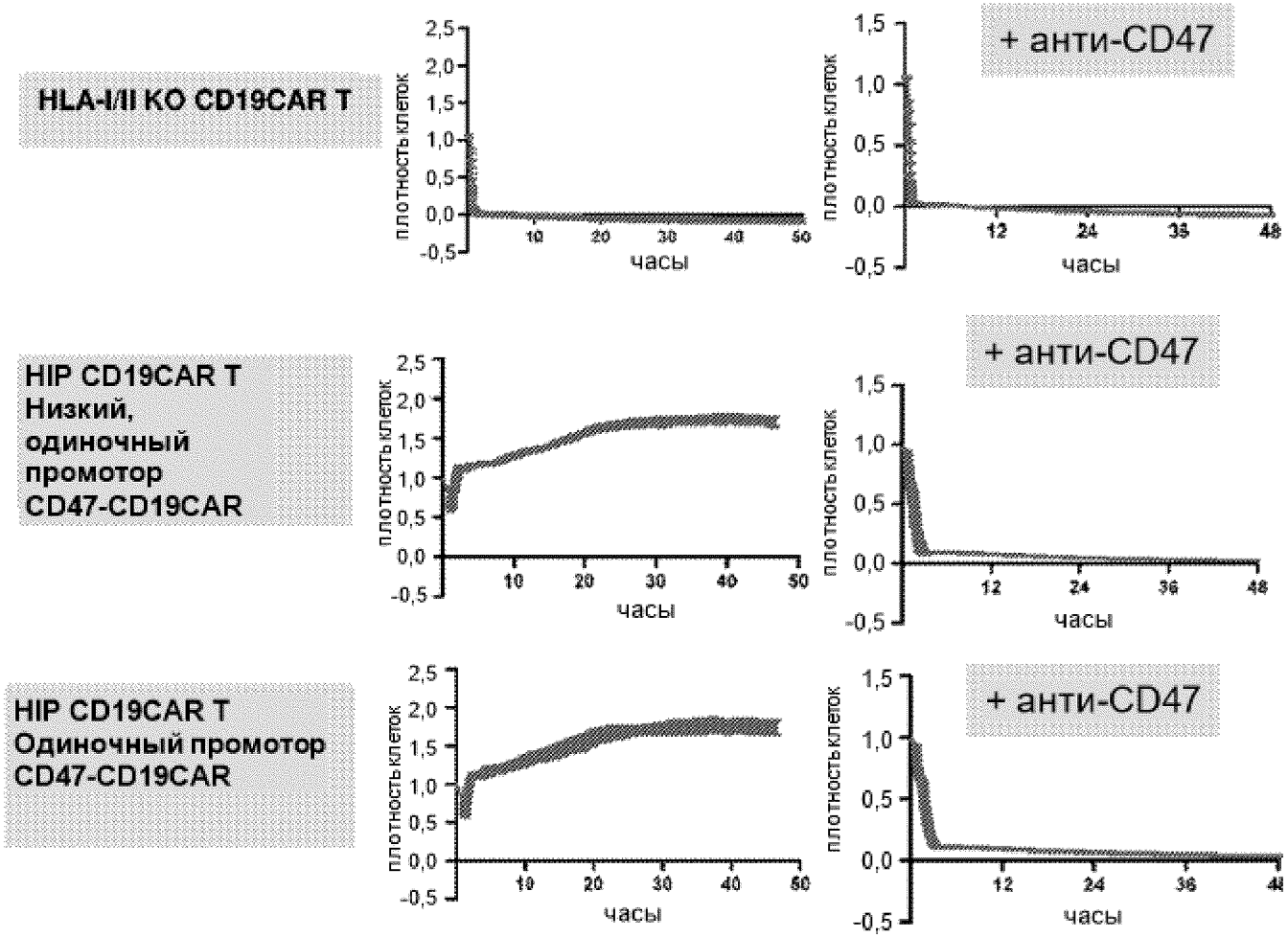
Фиг. 3A


1000
100
10
1
0,1
0,01
10^7 фотонов/с
0
5
10
15
20
25
30
дни

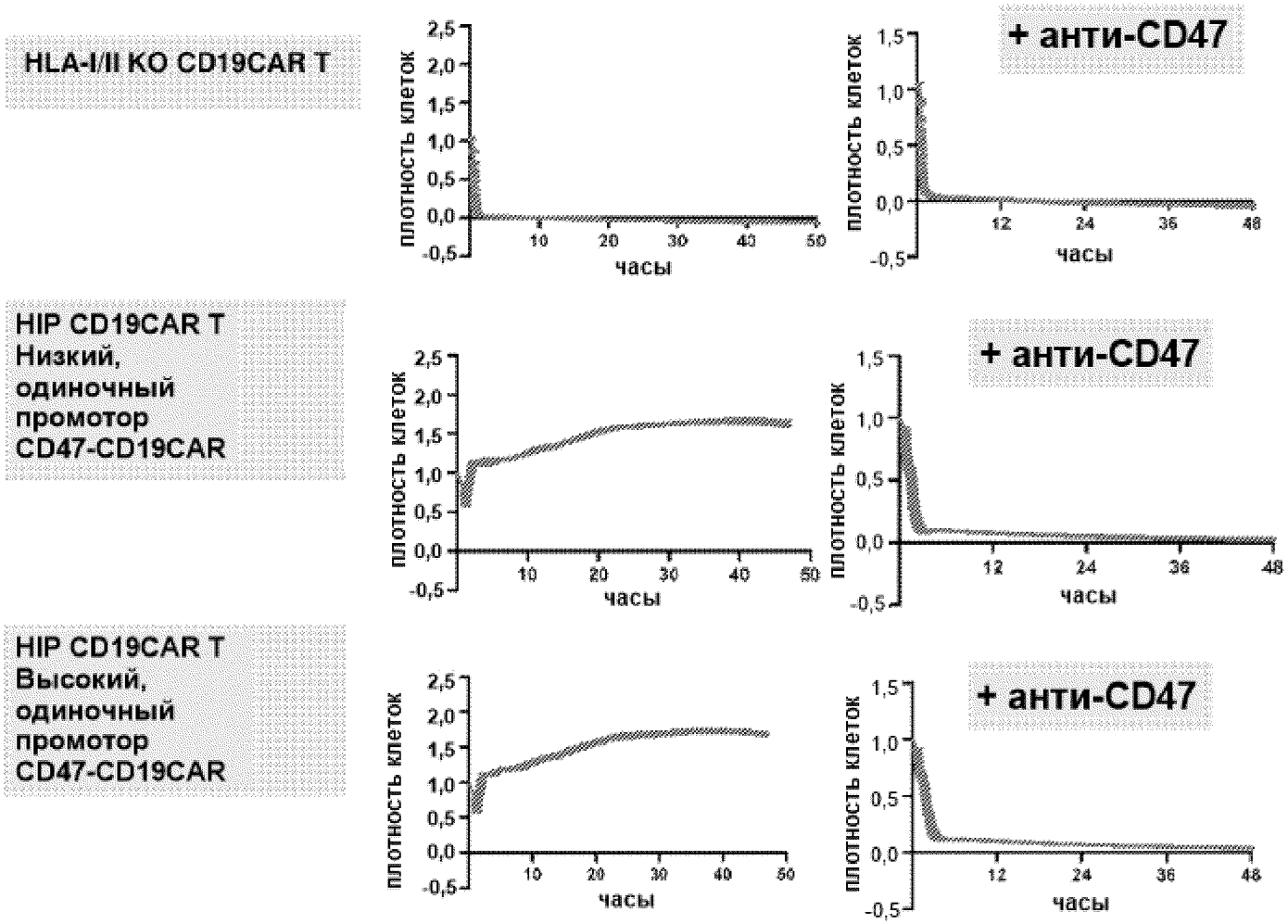
Фиг. 3B


1000
100
10
1
0,1
0,01
10^7 фотонов/с
0
5
10
15
20
25
30
дни

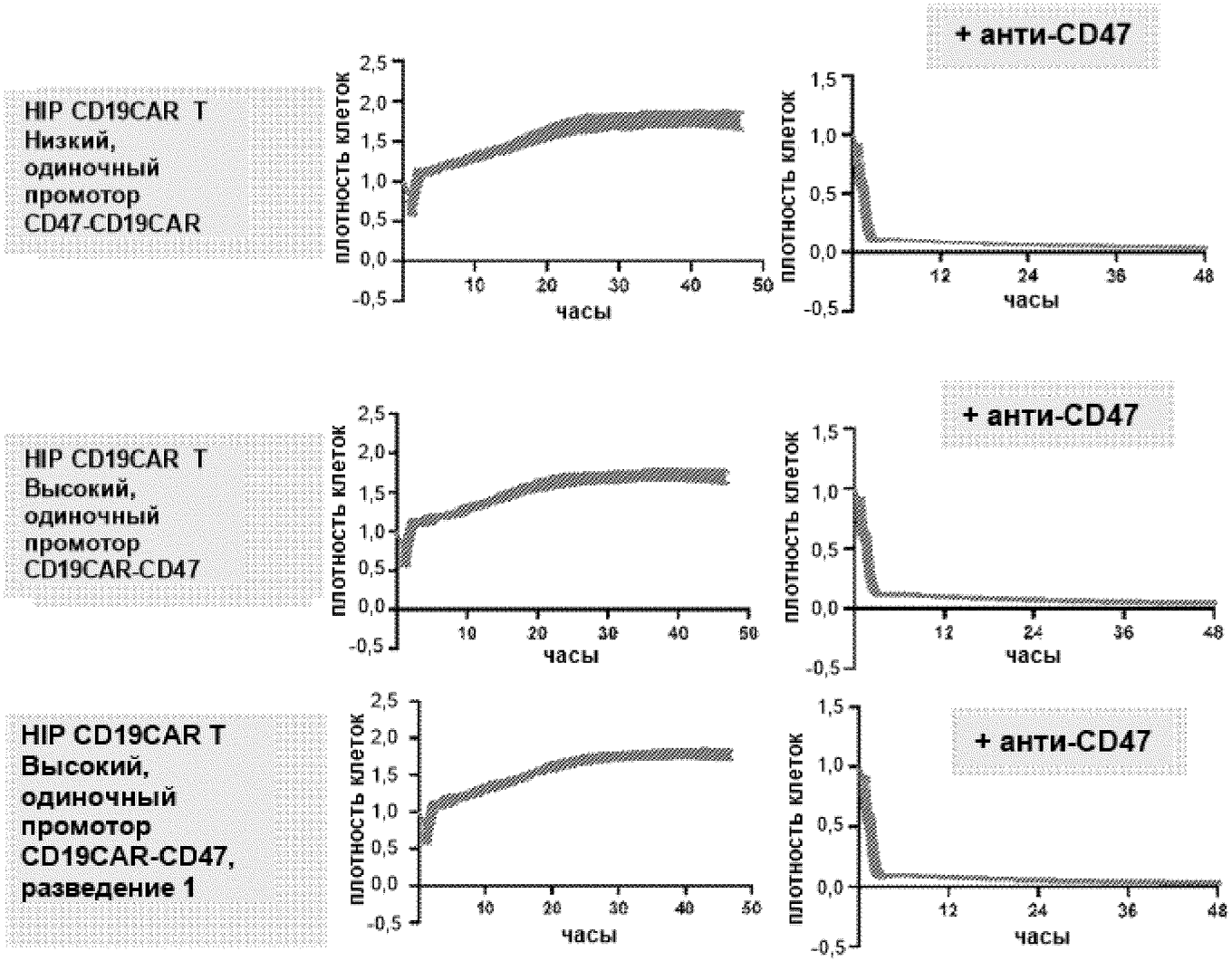
Фиг. 4А


HLA-I/II KO CD19CAR T
+ анти-CD47
HIP CD19CAR T
Низкий,
одиночный
промотор
CD47-CD19CAR
+ анти-CD47
HIP CD19CAR T
Одиночный промотор
CD47-CD19CAR
+ анти-CD47
плотность клеток
часы

Фиг. 4B


HLA-I/II KO CD19CAR T
HIP CD19CAR T
Низкий,
одиночный
промотор
CD47-CD19CAR
HIP CD19CAR T
Высокий,
одиночный
промотор
CD47-CD19CAR
+ анти-CD47
+ анти-CD47
+ анти-CD47
плотность клеток
часы
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
10
20
30
40
50
12
24
36
48

Фиг. 4C

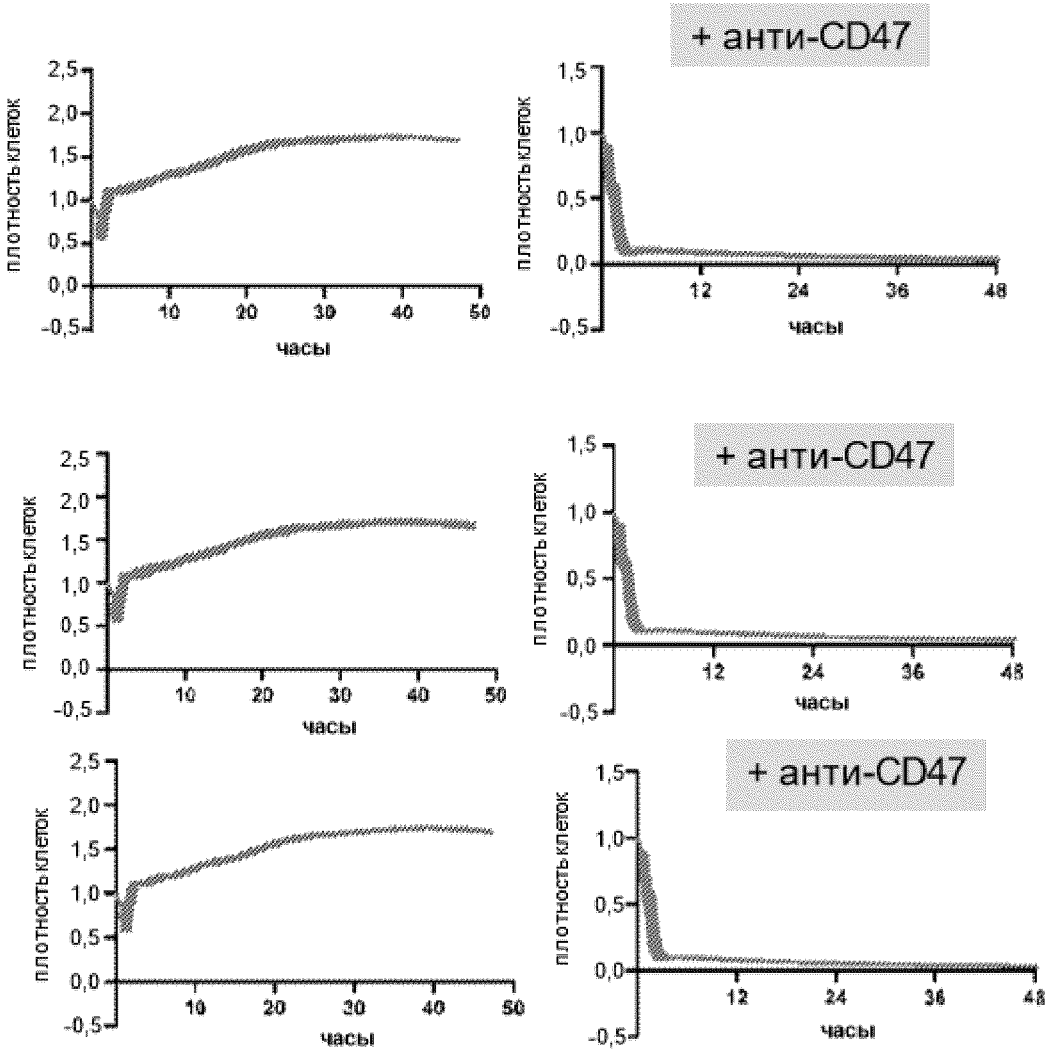

HIP CD19CAR T
Низкий,
одиночный
промотор
CD47-CD19CAR
+ анти-CD47
плотность клеток
часы
HIP CD19CAR T
Высокий,
одиночный
промотор
CD19CAR-CD47
+ анти-CD47
плотность клеток
часы
HIP CD19CAR T
Высокий,
одиночный
промотор
CD19CAR-CD47,
разведение 1
+ анти-CD47
плотность клеток
часы

Фиг. 4D

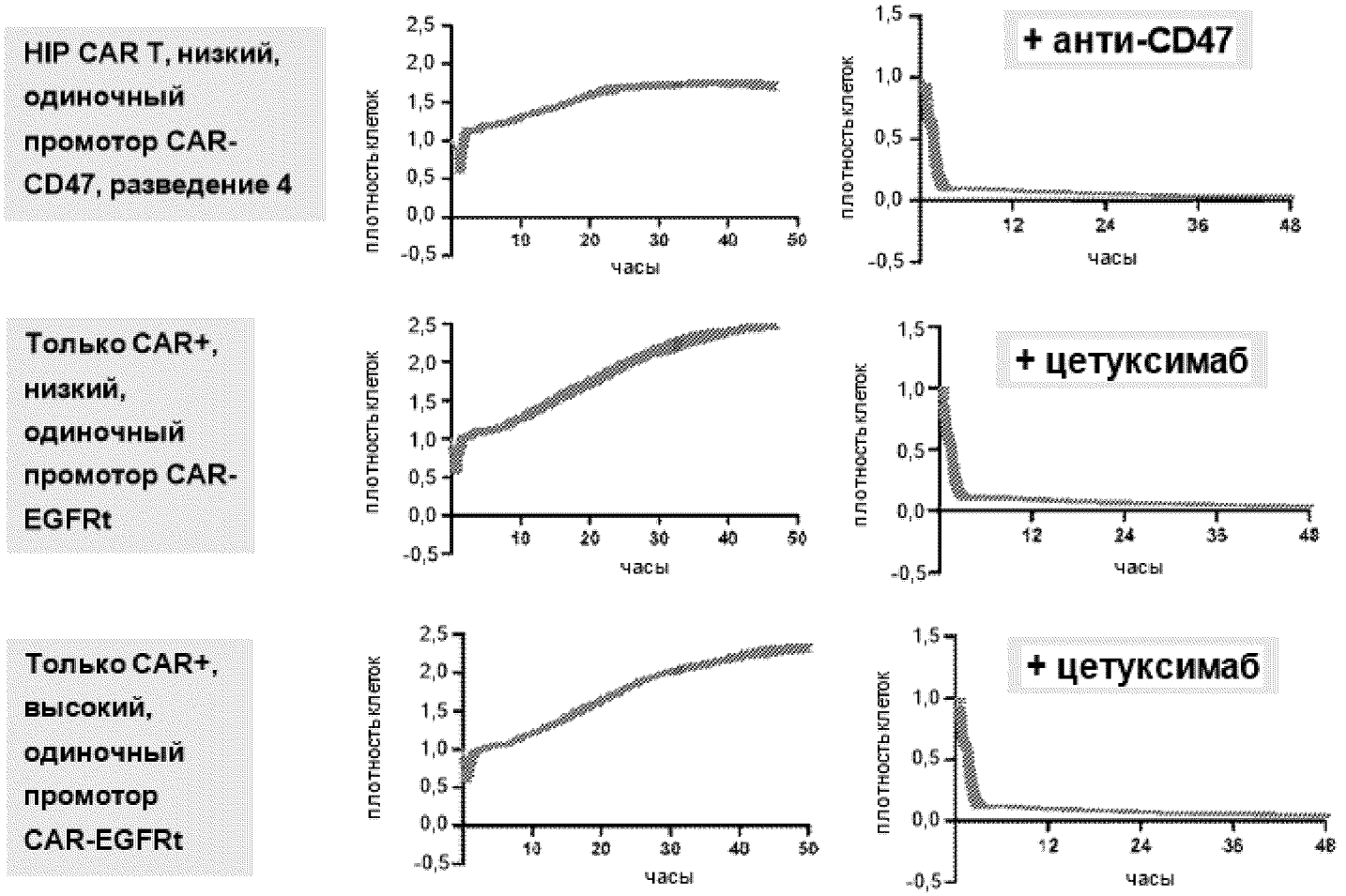
HIP CAR T, низкий, одиночный промотор CAR-CD47

HIP CAR T, высокий, одиночный промотор CAR-CD47

HIP CAR T, высокий, одиночный промотор CAR-CD47, разведение 1

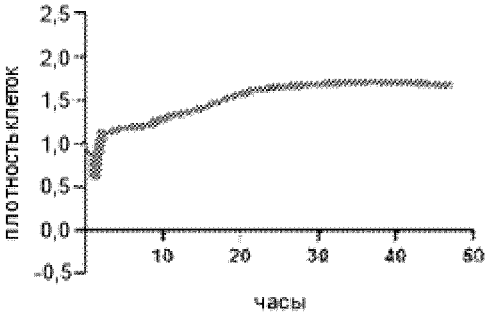


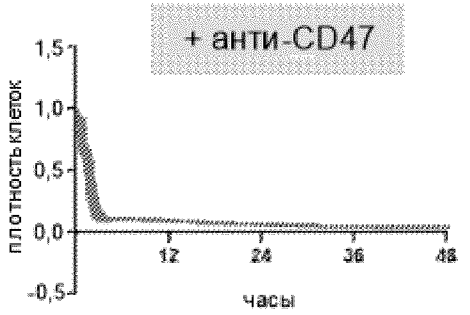
Фиг. 4E


HIP CAR T, низкий, одиночный промотор CAR-CD47, разведение 4
Только CAR+, низкий, одиночный промотор CAR-EGFRt
Только CAR+, высокий, одиночный промотор CAR-EGFRt
плотность клеток
часы
+ анти-CD47
+ цетуксимаб
+ цетуксимаб

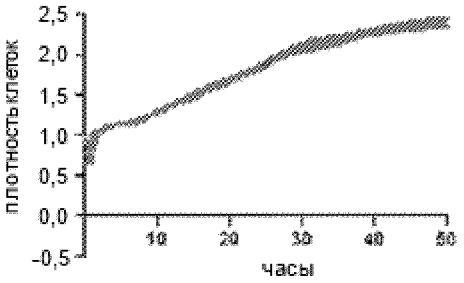
Фиг. 4F

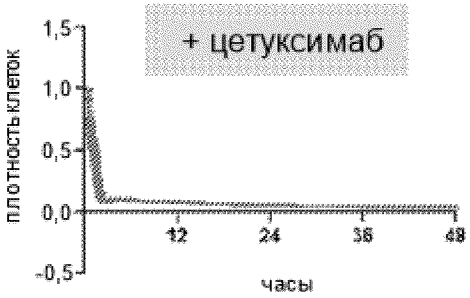
HIP CD19CAR T Низкий, одиночный промотор CD19CAR-CD47, разведение 4



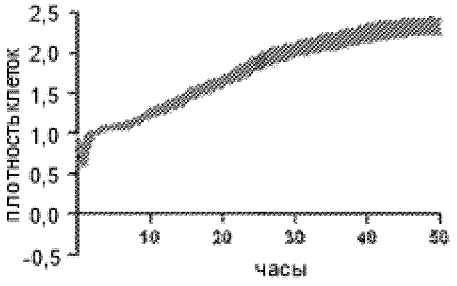


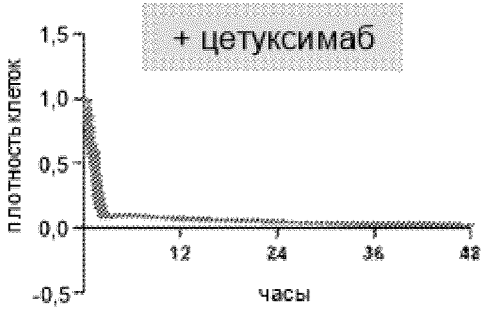
Только CD19CAR+, низкий, одиночный промотор CD19CAR-EGFRt





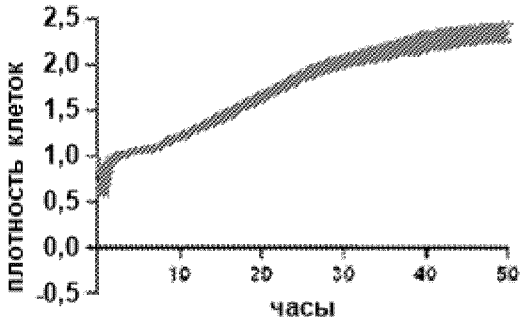
Только CD19CAR+, Высокий, одиночный промотор CD19CAR-EGFRt

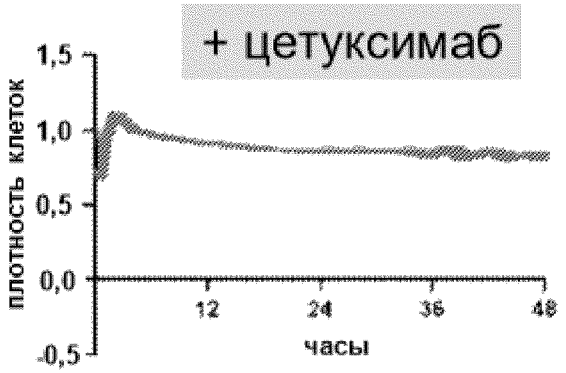




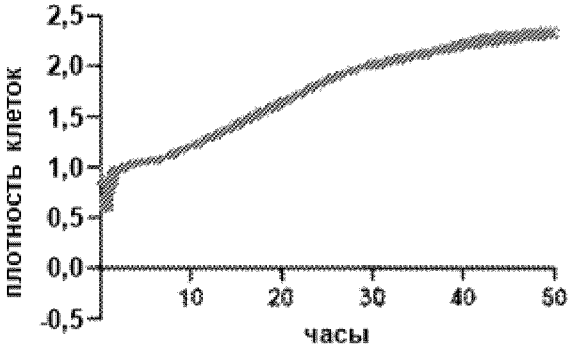
Фиг. 4G

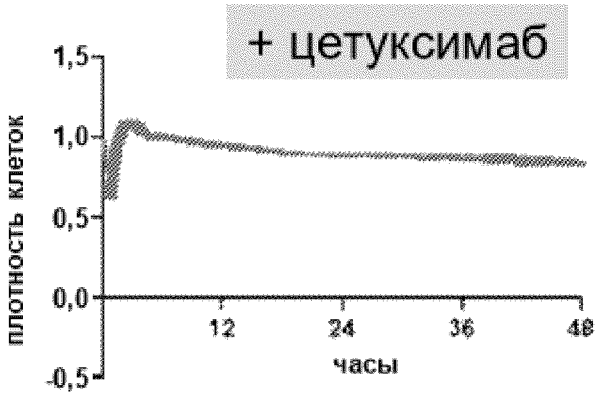
Только CD19CAR+, низкий, тисагенлеклейсел





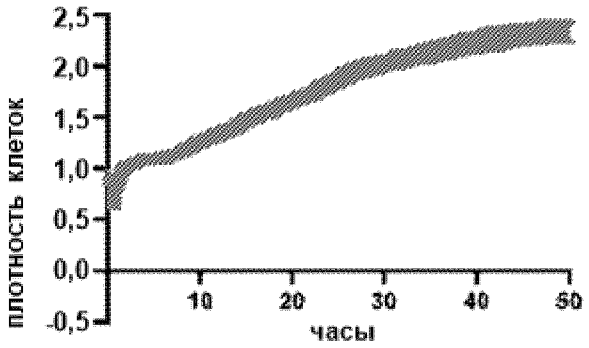
Только CD19CAR+, Высокий, тисагенлеклейсел

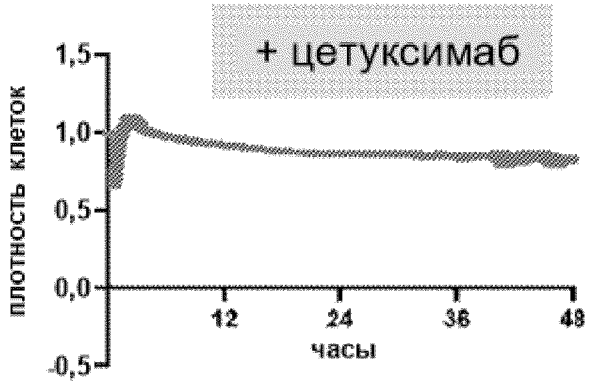




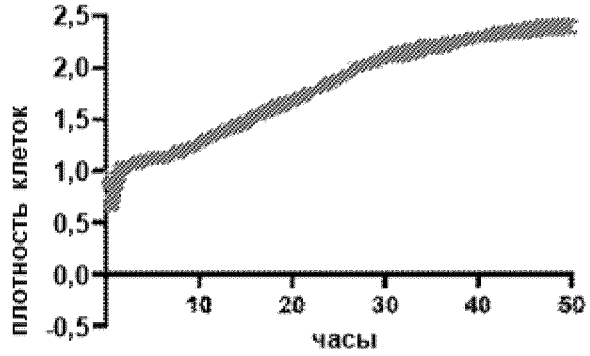
Фиг. 4H

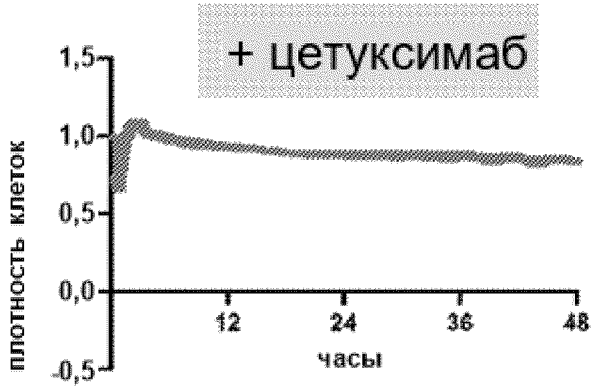
Только CD19CAR+, низкий, тисагенлеклейсел



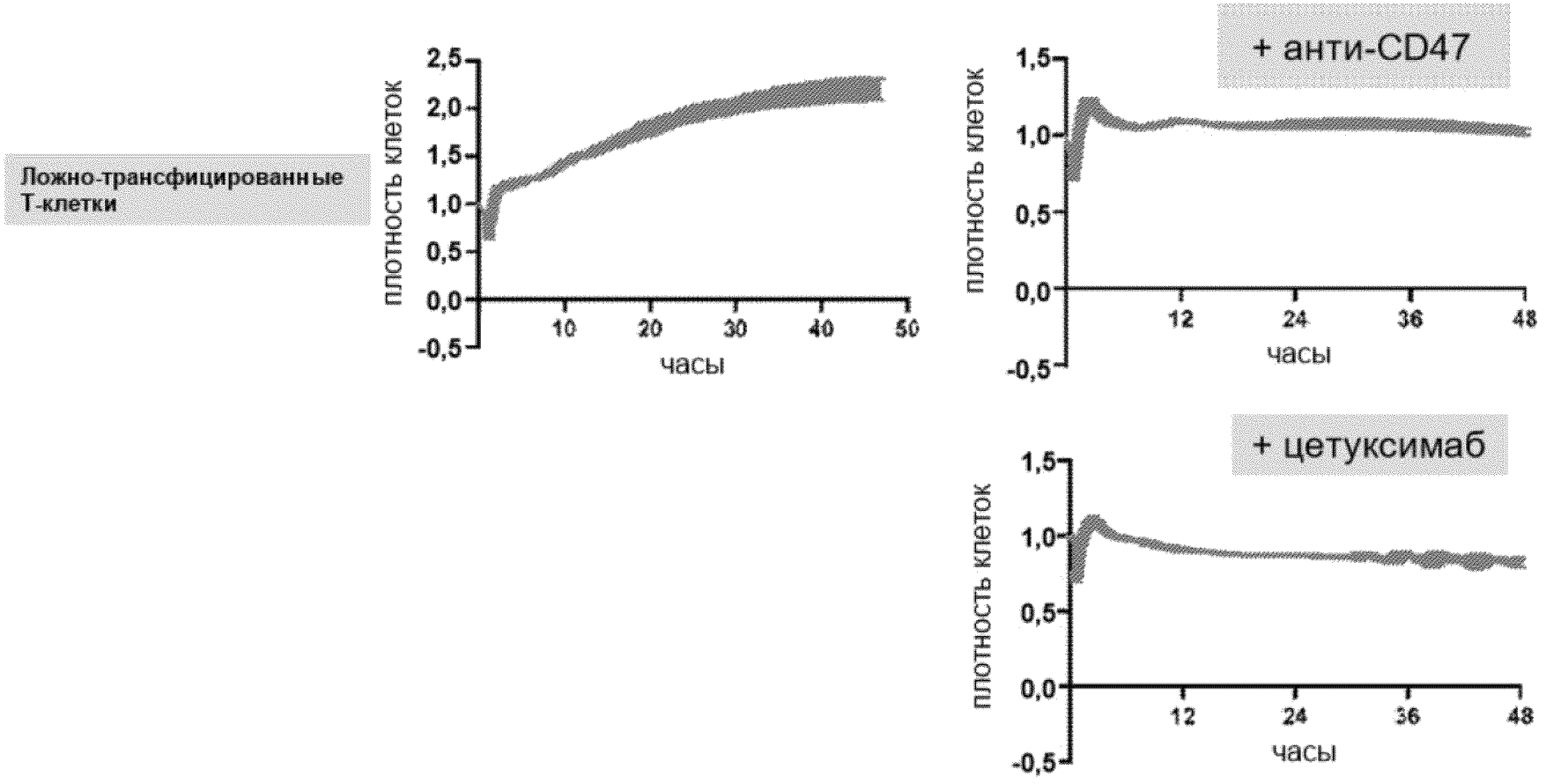


Только CD19CAR+, Высокий, тисагенлеклейсел

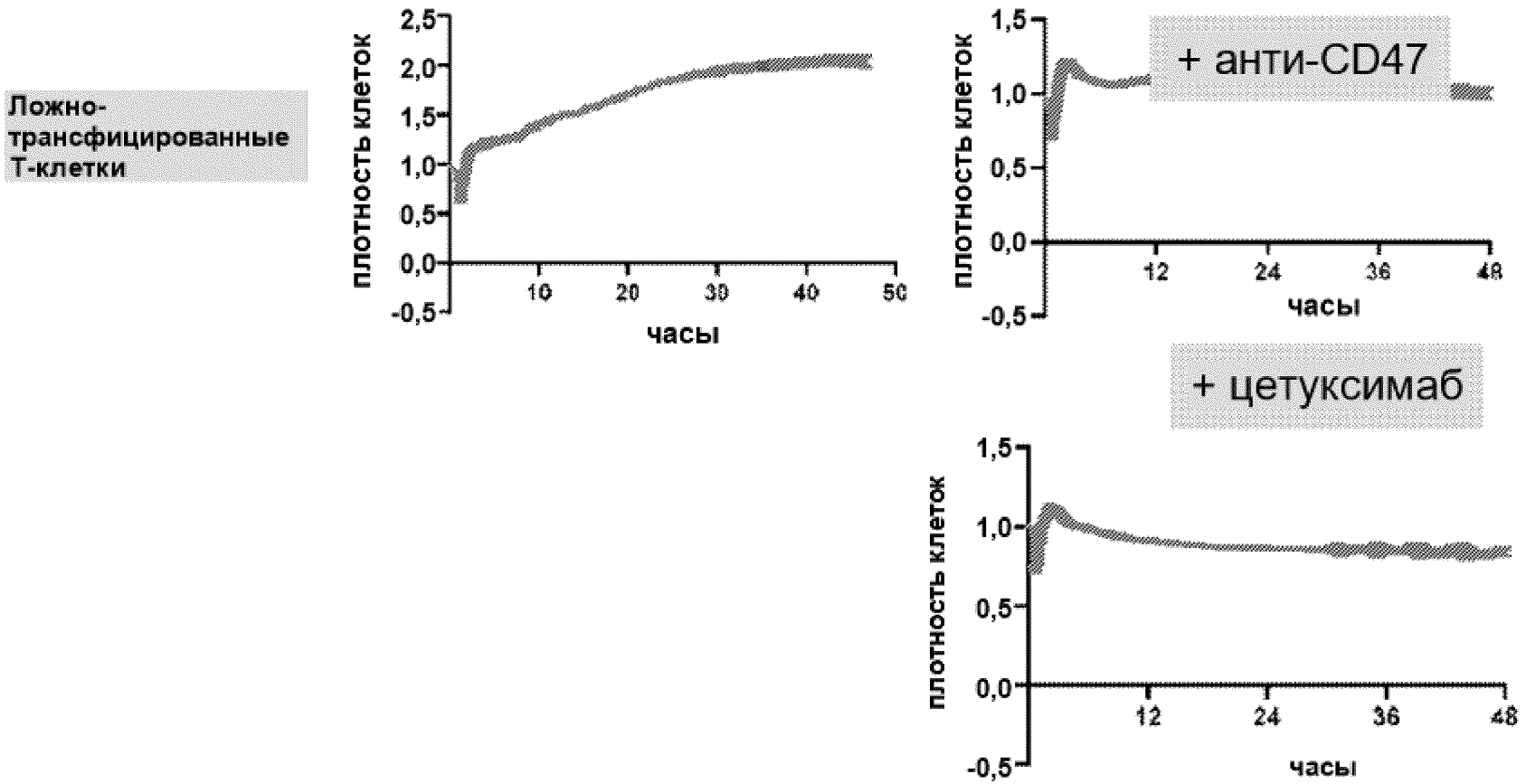




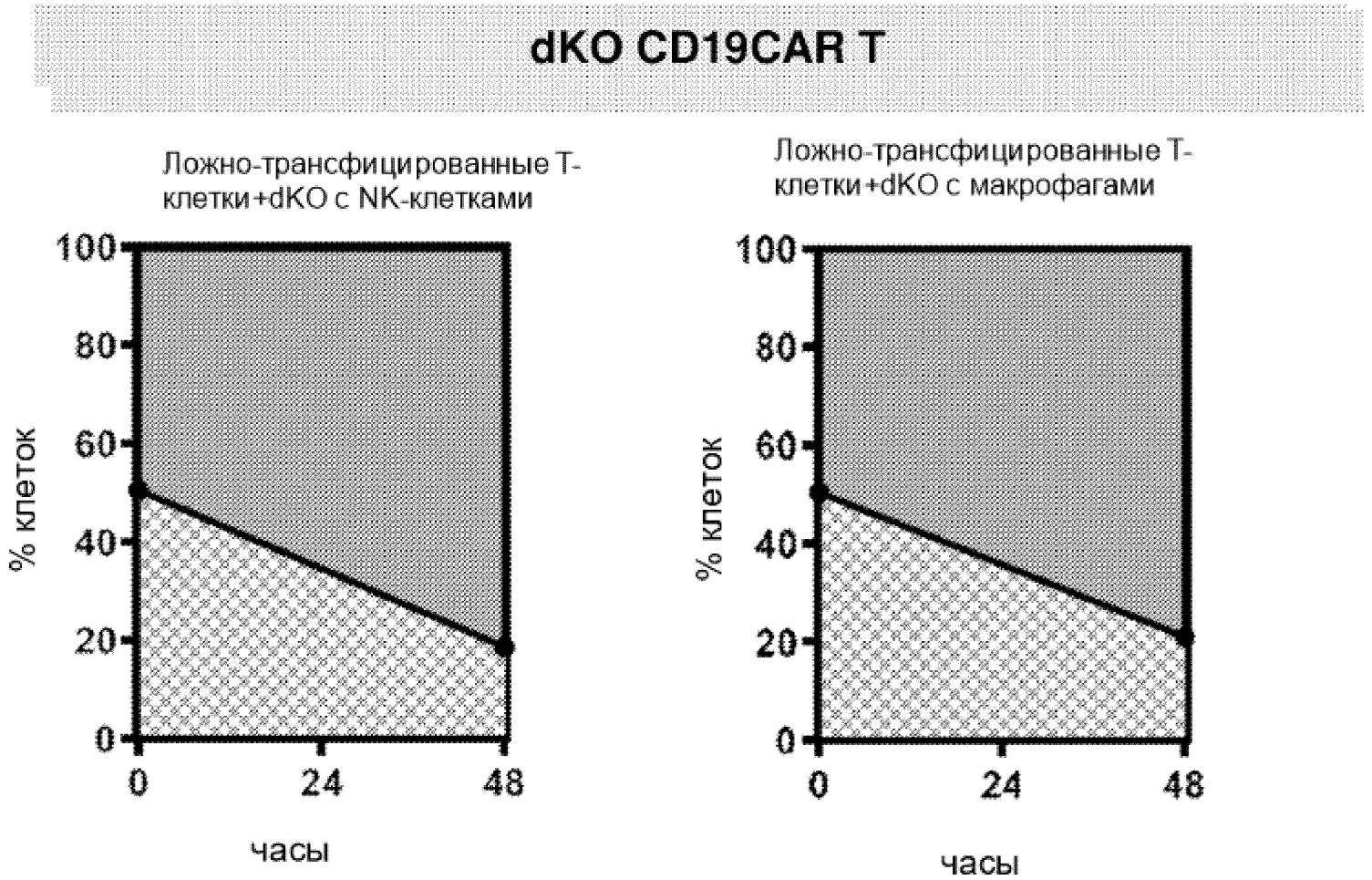
Фиг. 4I


Ложно-трансфицированные Т-клетки
плотность клеток
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
10
20
30
40
50
часы
+ анти-CD47
плотность клеток
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
12
24
36
48
часы
+ цетуксимаб
плотность клеток
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
12
24
36
48
часы

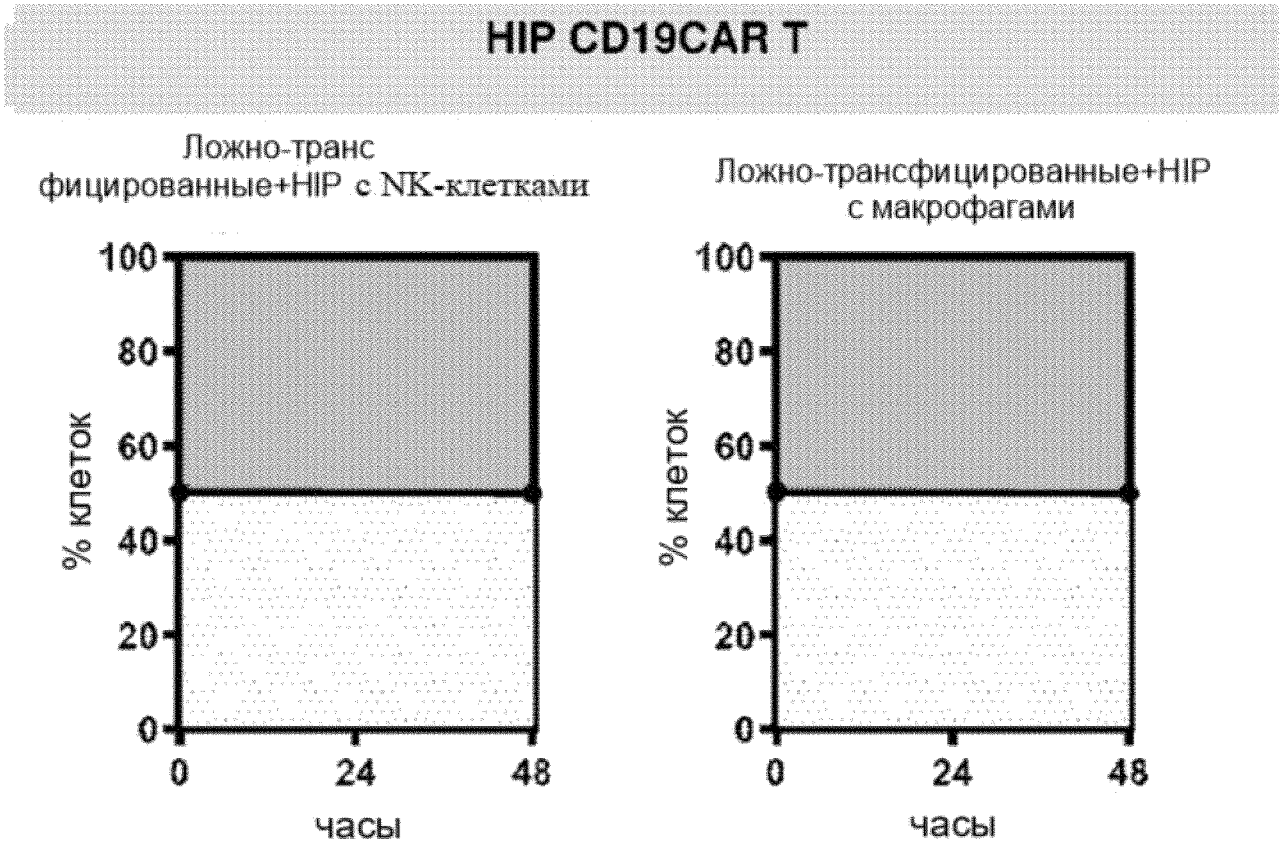
Фиг. 4J


Ложно-трансфицированные Т-клетки
плотность клеток
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
10
20
30
40
50
часы
+ анти-CD47
плотность клеток
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
12
24
36
48
часы
+ цетуксимаб
плотность клеток
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
12
24
36
48
часы

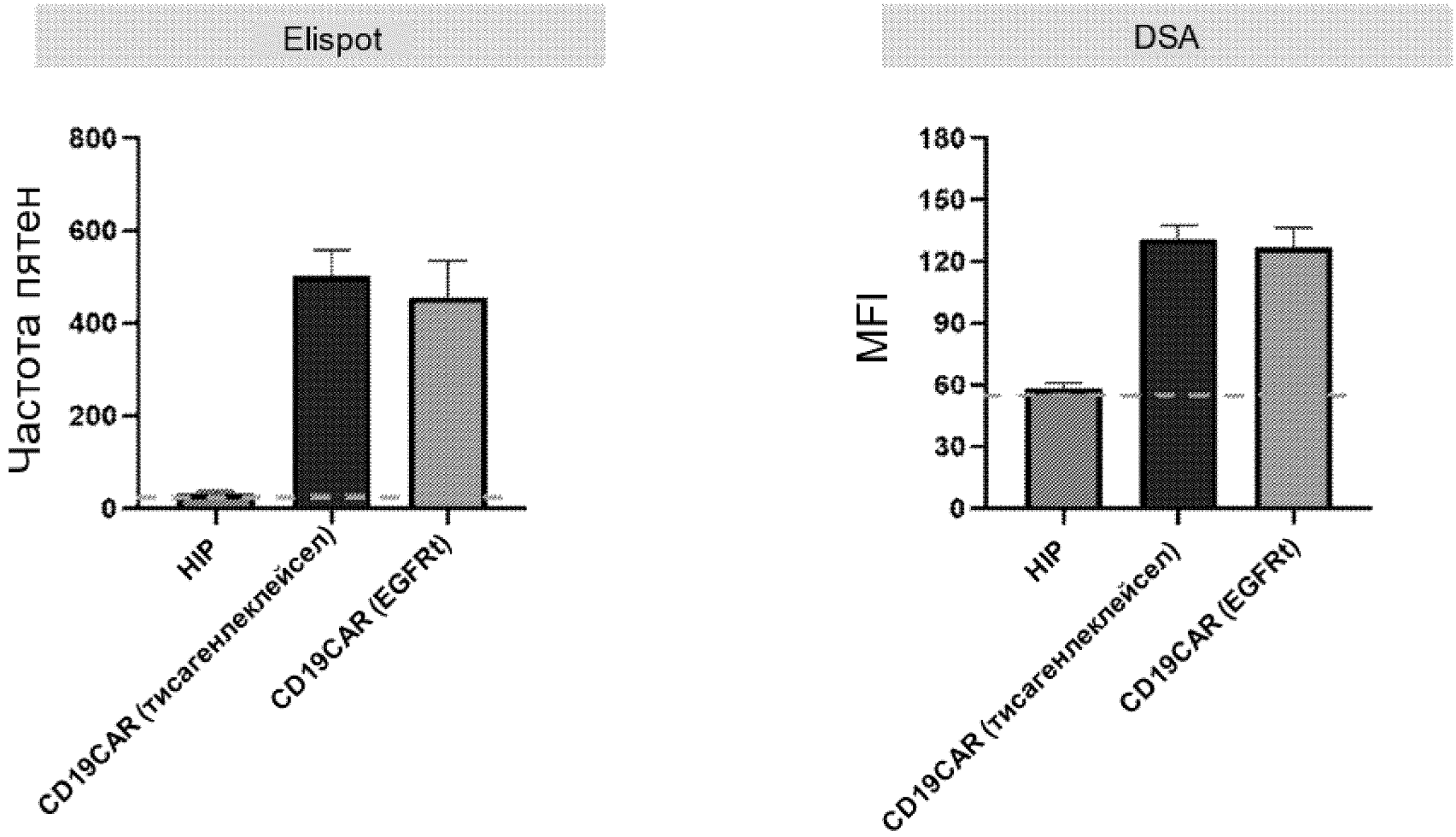
Фиг. 5A


dKO CD19CAR T
Ложно-трансфицированные Т-клетки+dKO с NK-клетками
% клеток
100
80
60
40
20
0
0
24
48
часы
Ложно-трансфицированные Т-клетки+dKO с макрофагами
% клеток
100
80
60
40
20
0
0
24
48
часы

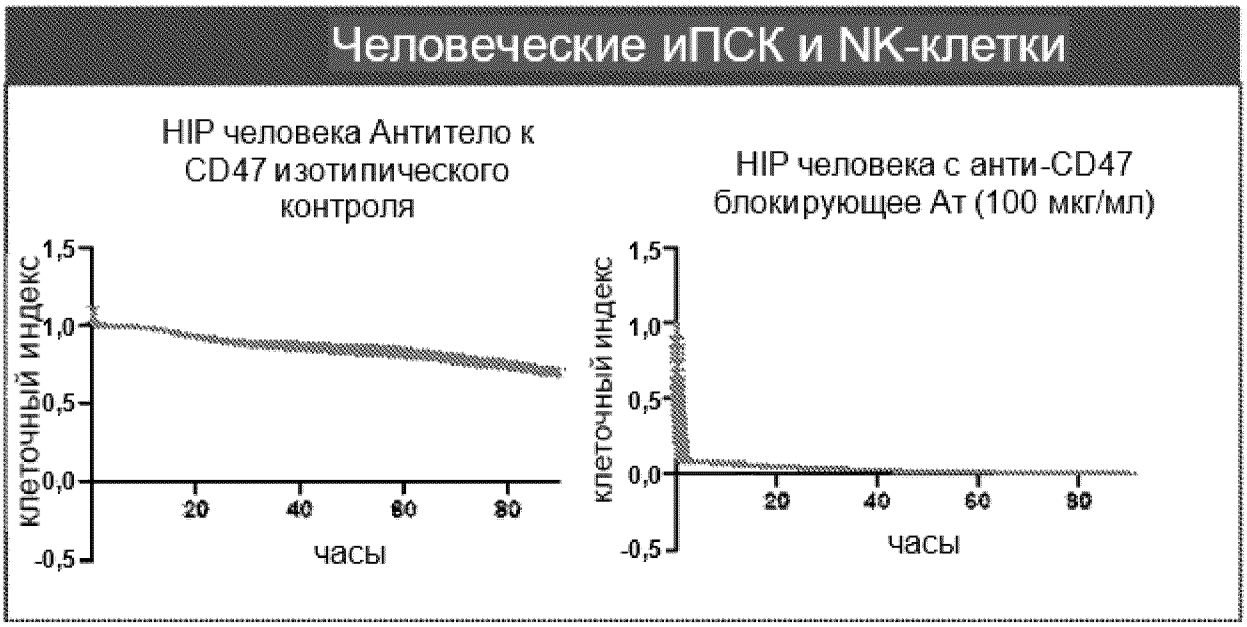
Фиг. 5B


HIP CD19CAR T
Ложно-транс
фицированные+HIP с NK-клетками
% клеток
100
80
60
40
20
0
0
24
48
часы
Ложно-трансфицированные+HIP
с макрофагами
% клеток
100
80
60
40
20
0
0
24
48
часы

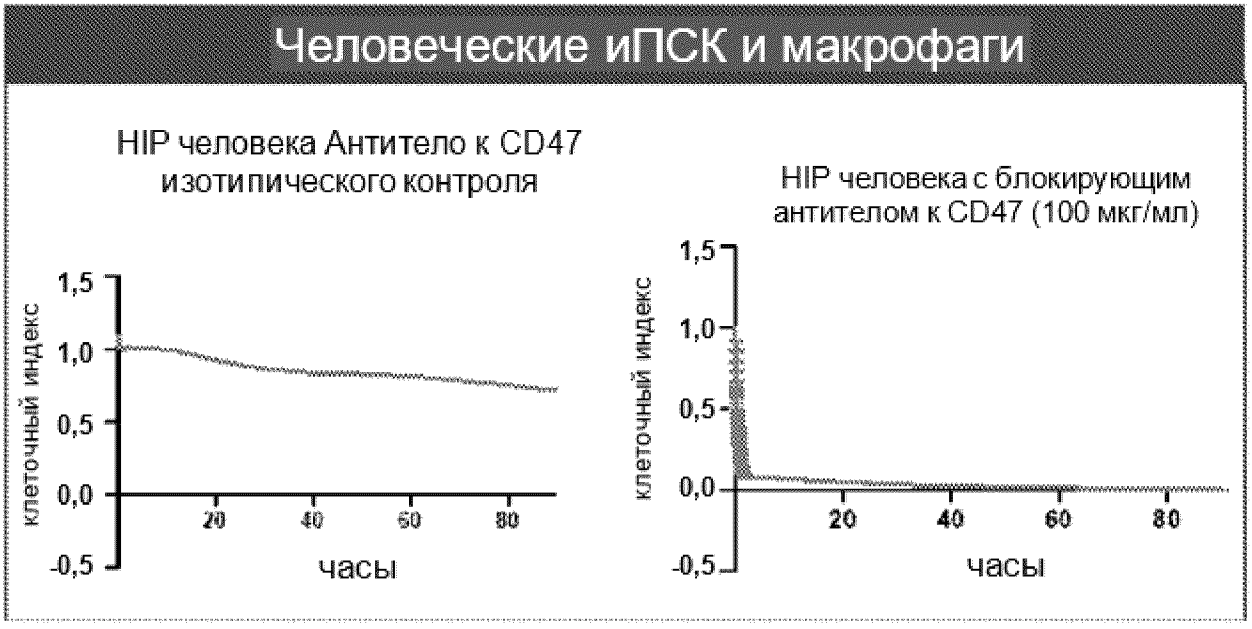
Фиг. 6


Elispot
Частота пятен
800
600
400
200
0
HIP
CD19CAR (тисагенлеклейсел)
CD19CAR (EGFRt)
DSA
MFI
180
150
120
90
60
30
0
HIP
CD19CAR (тисагенлеклейсел)
CD19CAR (EGFRt)

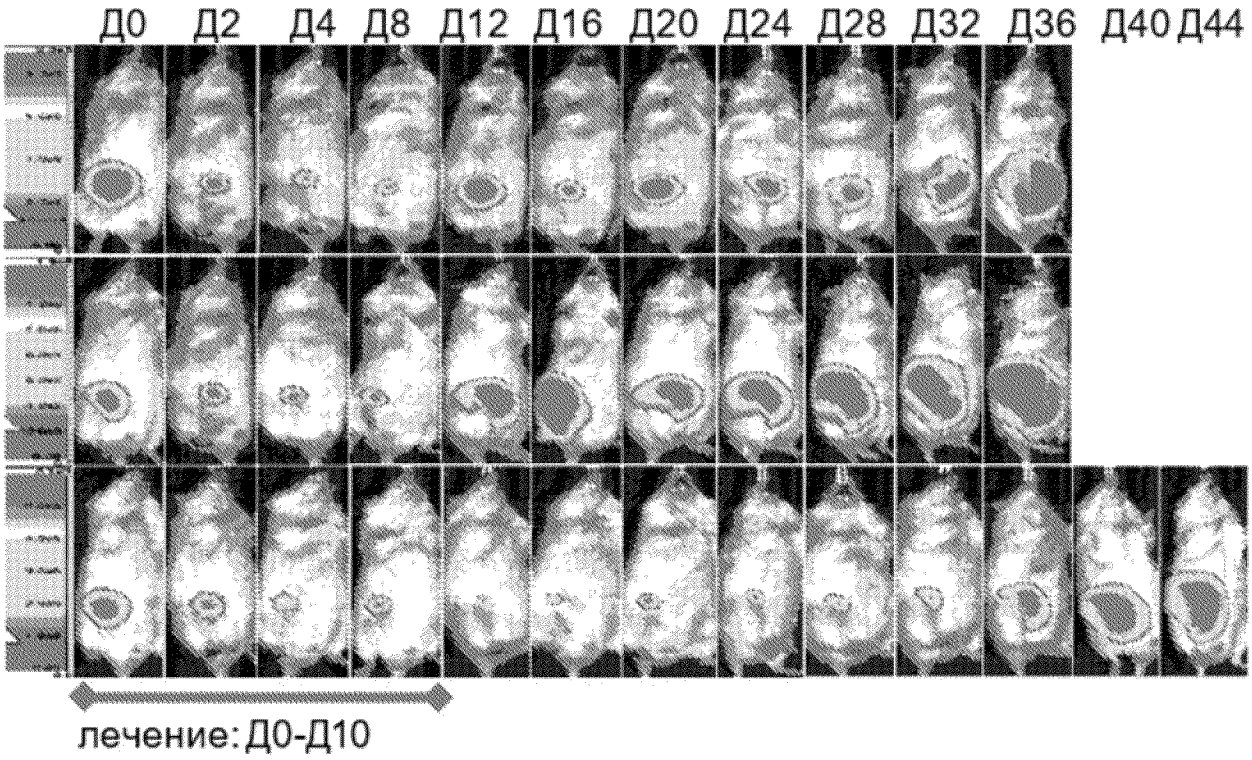
Фиг. 7A


Человеческие иПСК и NK-клетки
HIP человека Антитело к CD47 изотипического контроля
HIP человека с анти-CD47 блокирующее Ат (100 мкг/мл)
клеточный индекс
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
20
40
60
80
часы

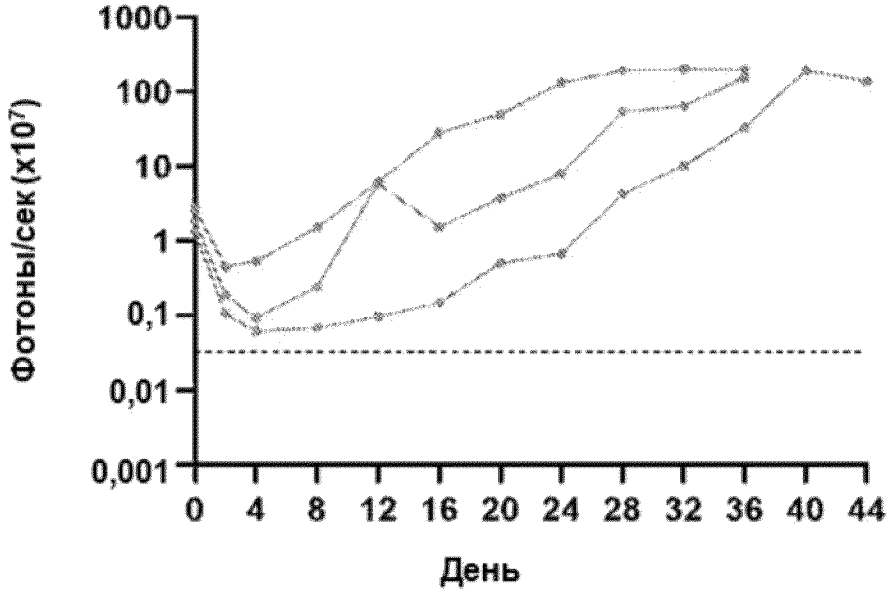
Фиг. 7B


Человеческие иПСК и макрофаги
HIP человека Антитело к CD47 изотипического контроля
HIP человека с блокирующим антителом к CD47 (100 мкг/мл)
клеточный индекс
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
20
40
60
80
часы

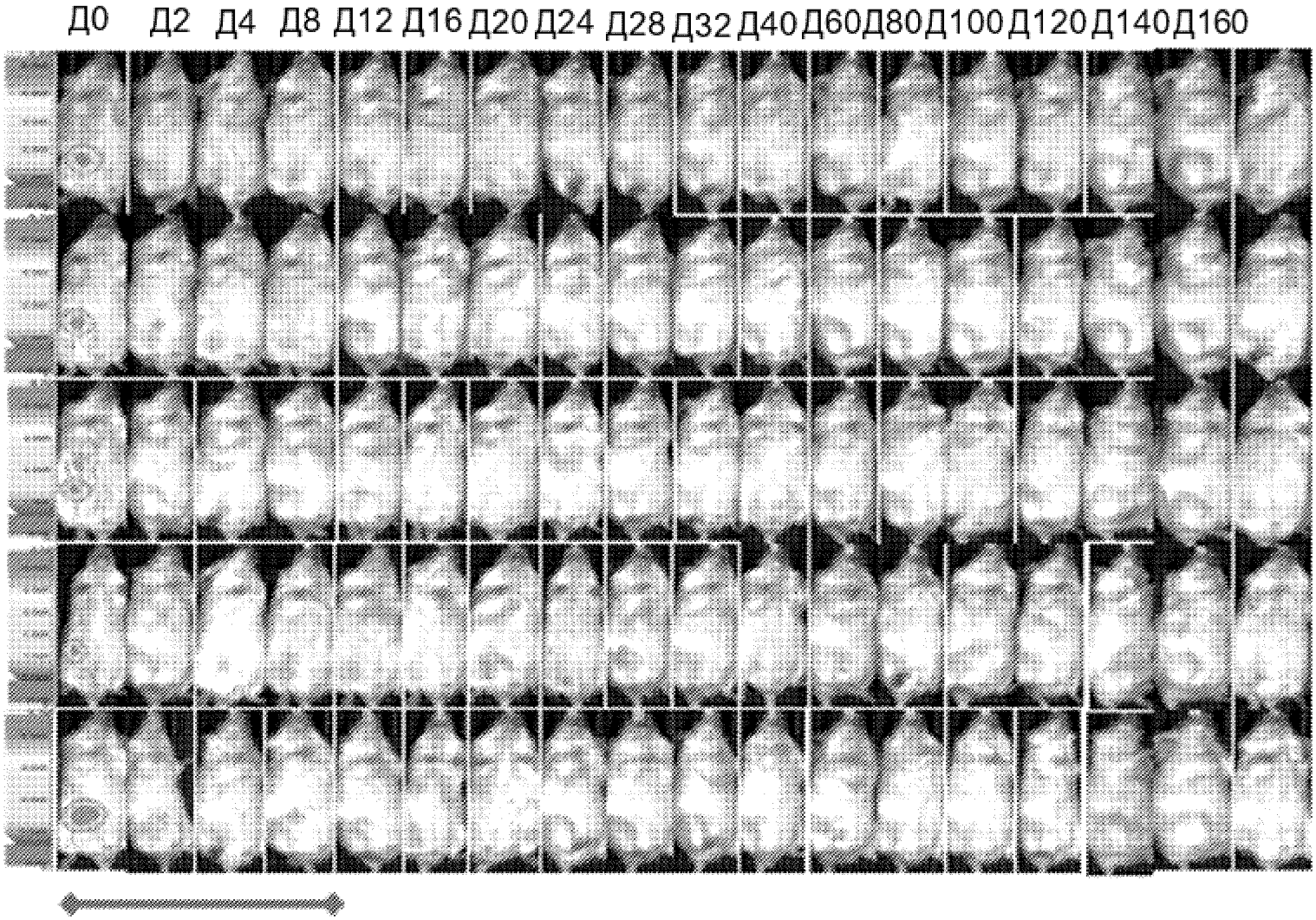
Фиг. 8A


Д0
Д2
Д4
Д8
Д12
Д16
Д20
Д24
Д28
Д32
Д36
Д40
Д44
лечение: Д0-Д10

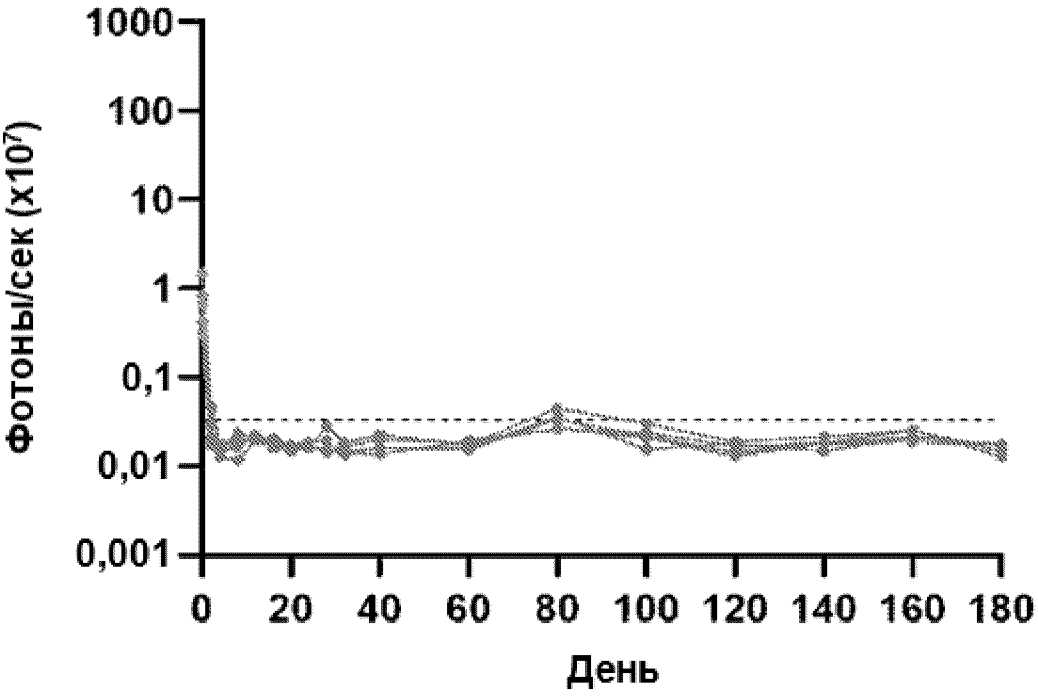
Фиг. 8B


1000
100
10
1
0,1
0,01
0,001
Фотоны/сек (x10⁷)
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
День

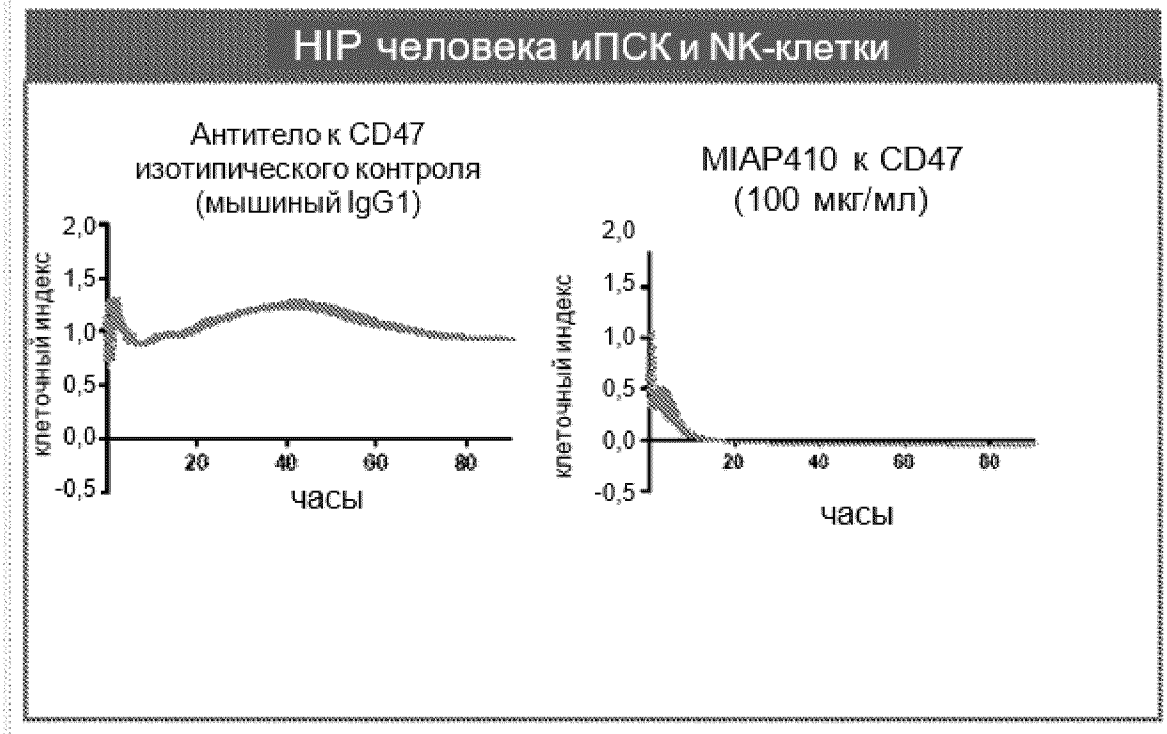
Фиг. 9А


Д0
Д2
Д4
Д8
Д12
Д16
Д20
Д24
Д28
Д32
Д40
Д60
Д80
Д100
Д120
Д140
Д160
лечение: Д0-Д10

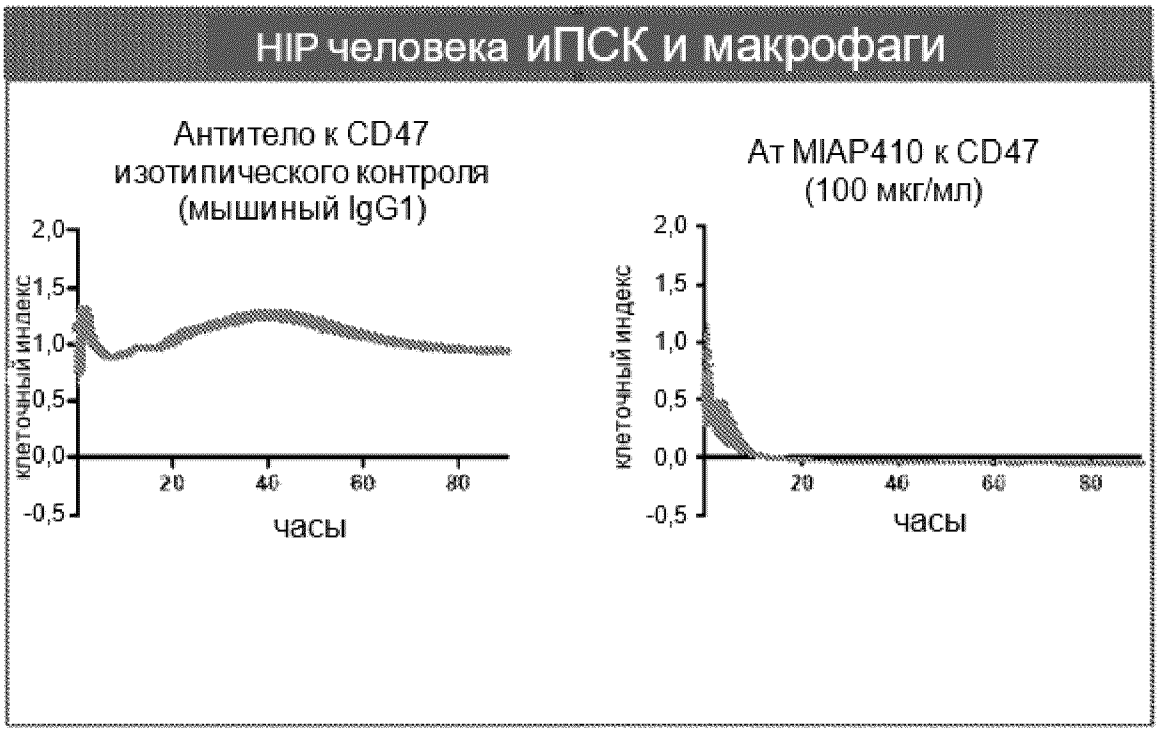
Фиг. 9B


1000
100
10
1
0,1
0,01
0,001
Фотоны/сек (x10⁷)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
День

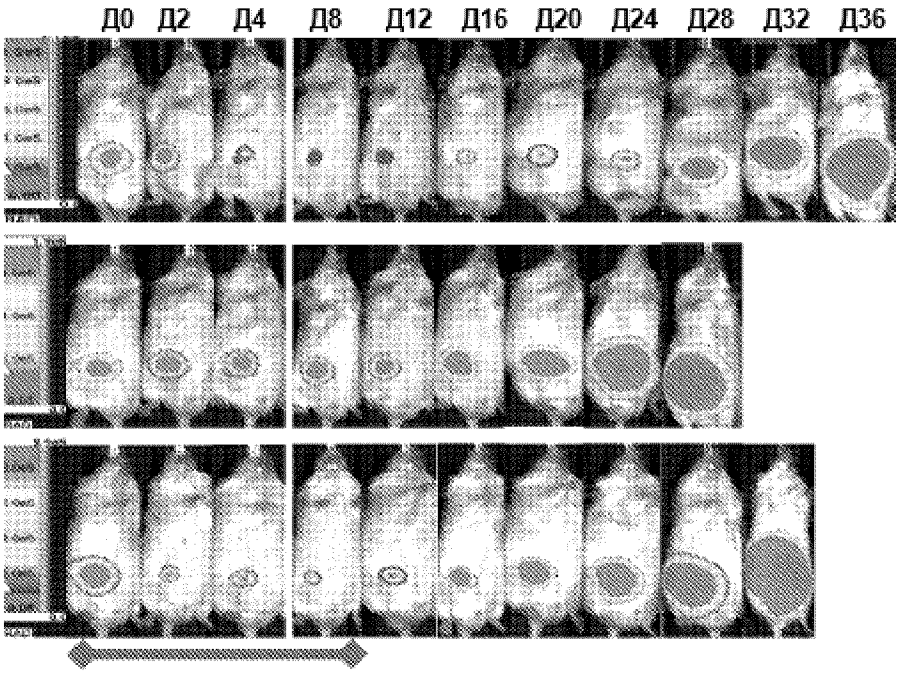
Фиг. 10A



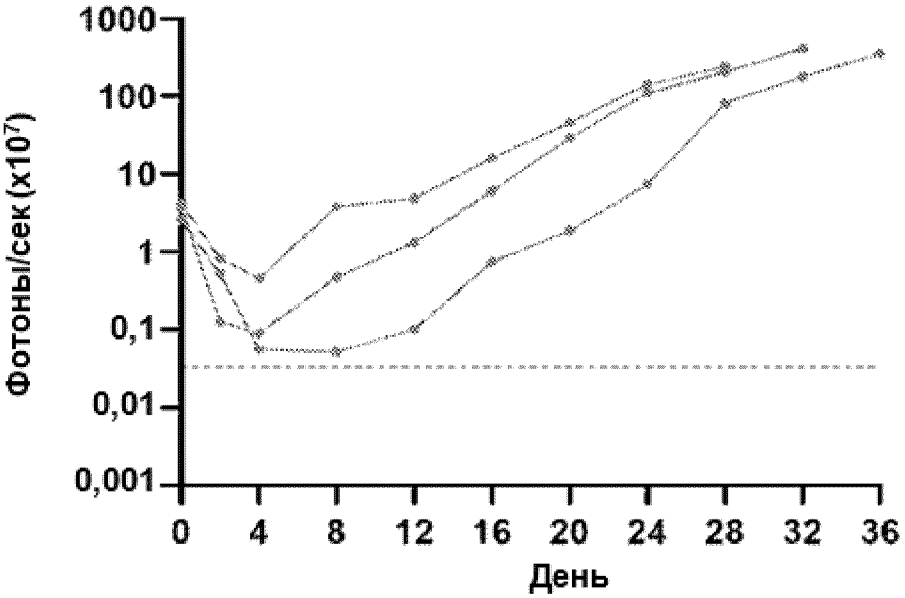
Фиг. 10B



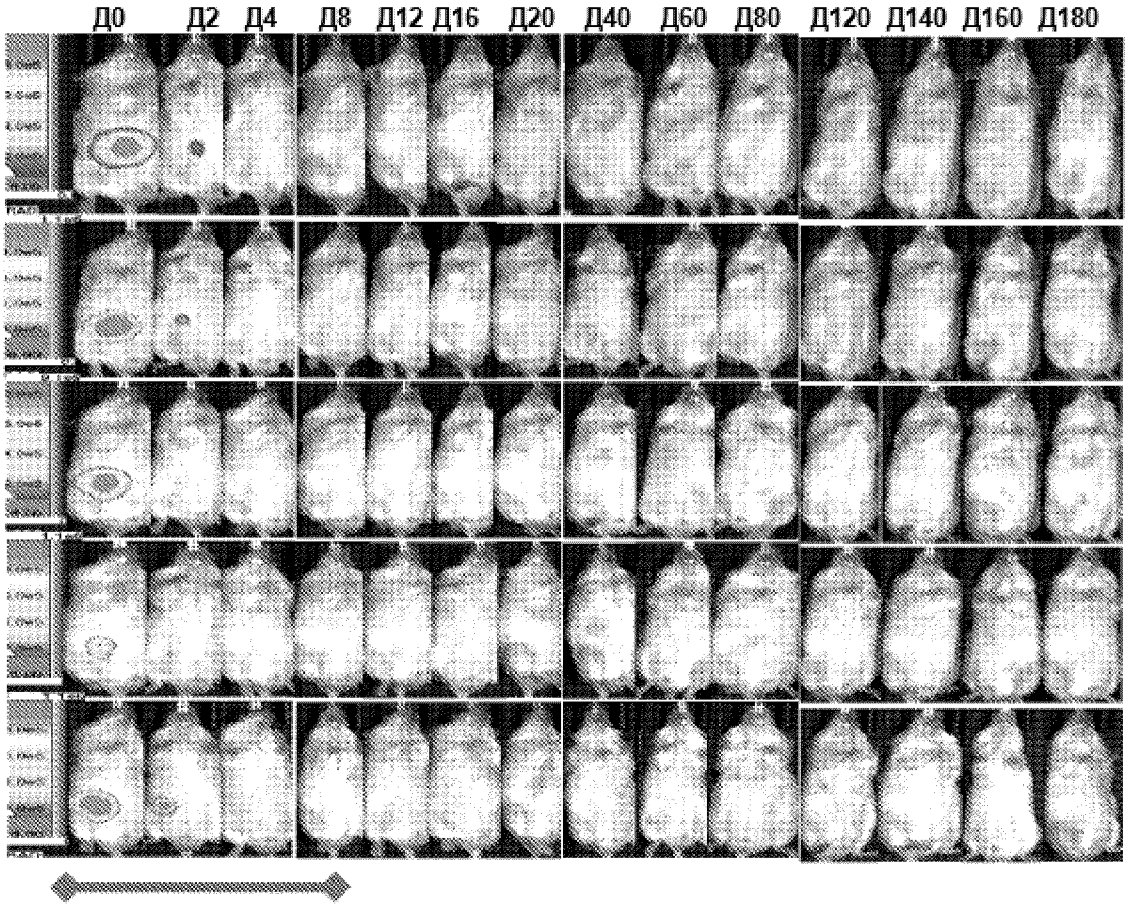
Фиг. 11A



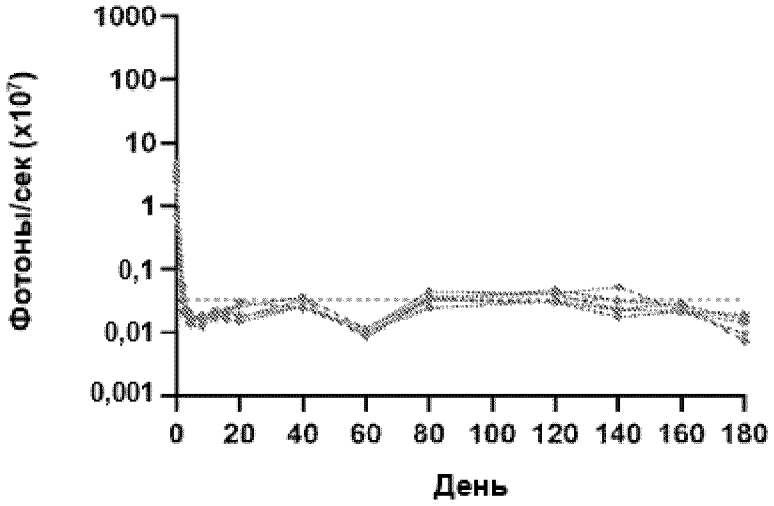
Фиг. 11B



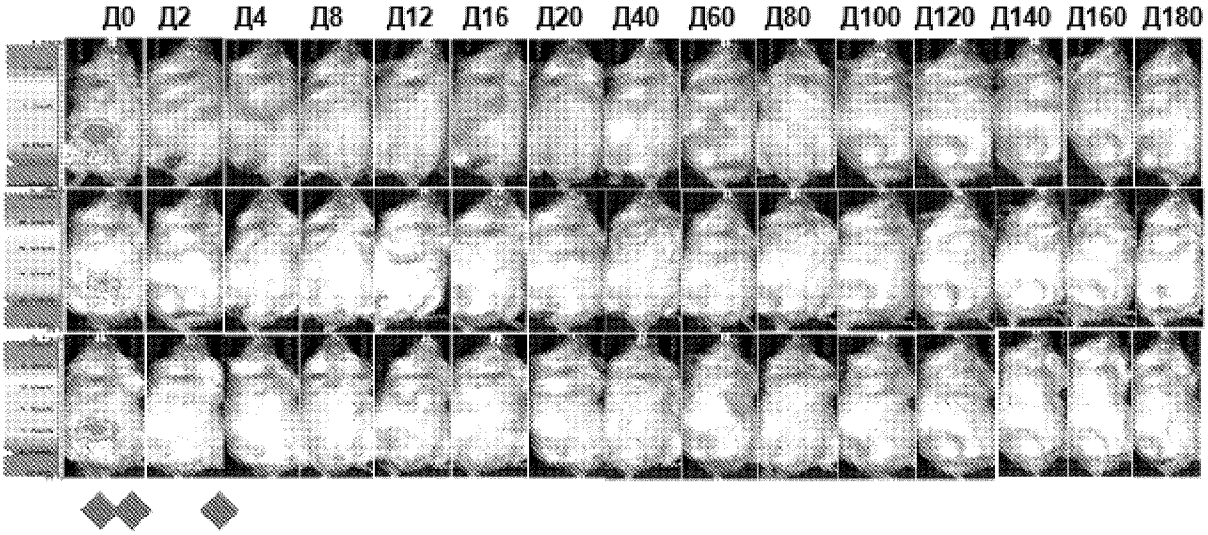
Фиг. 12A



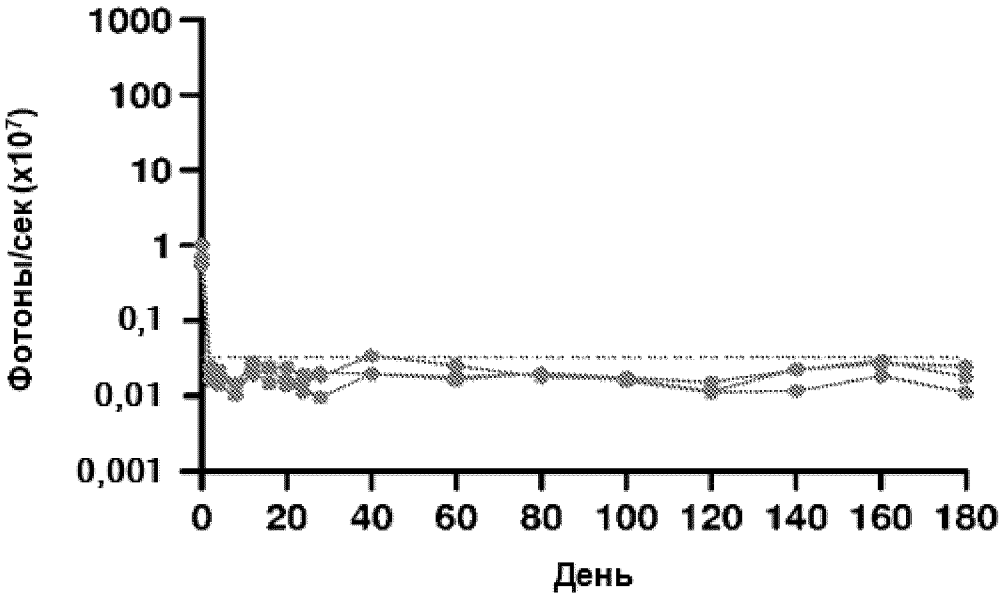
Фиг. 12B



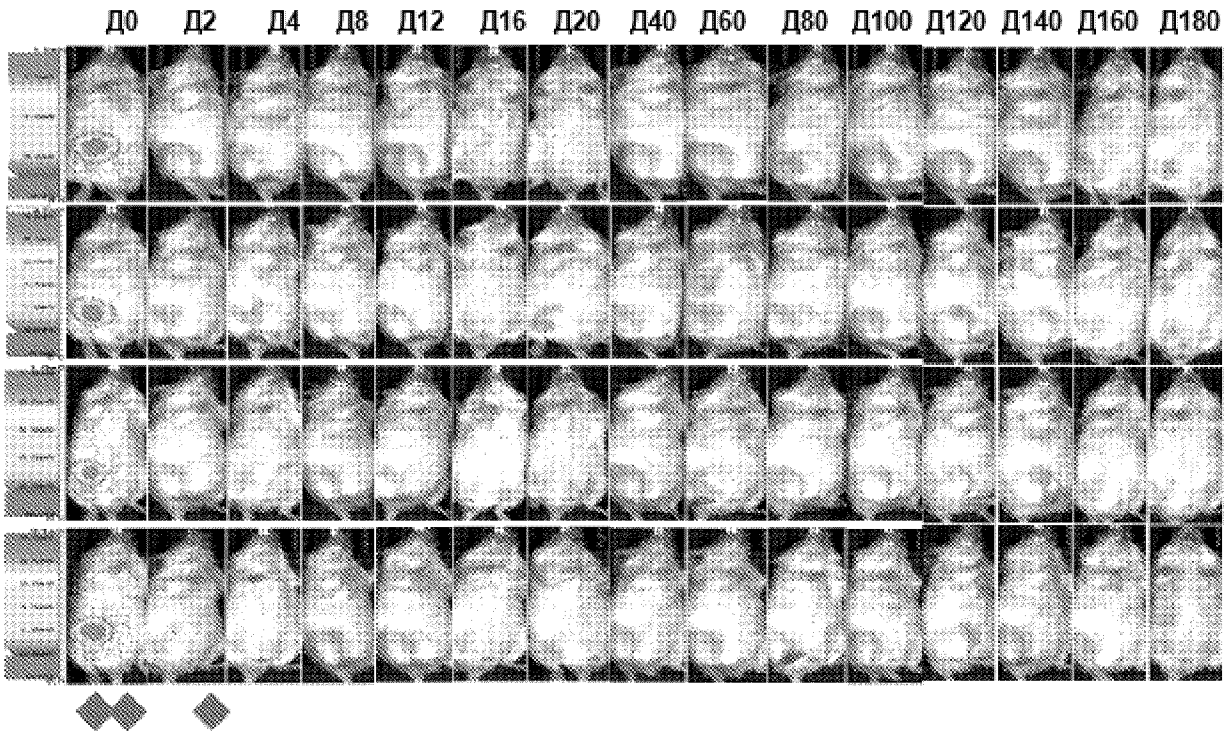
Фиг. 13A



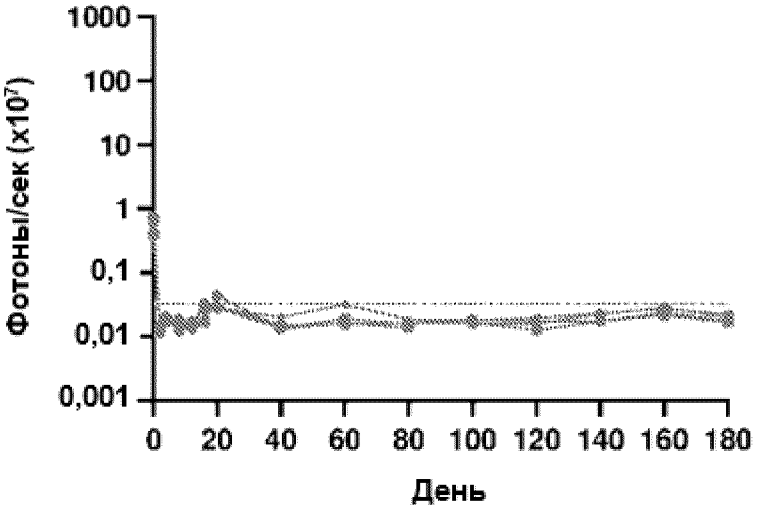
Фиг. 13B



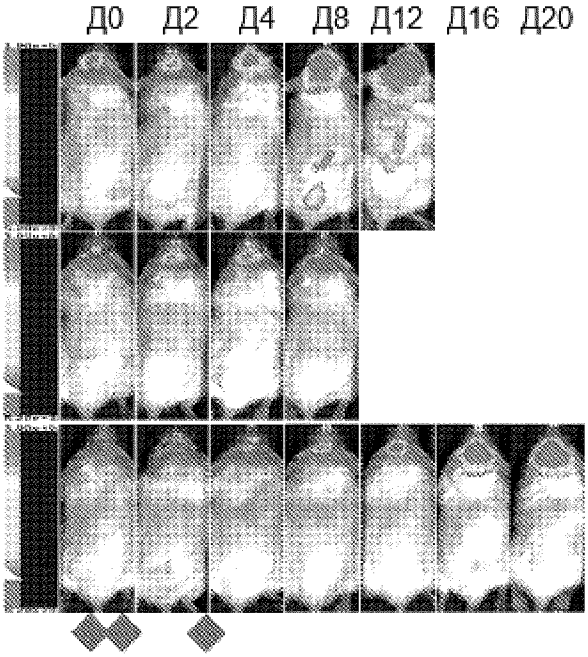
Фиг. 14A



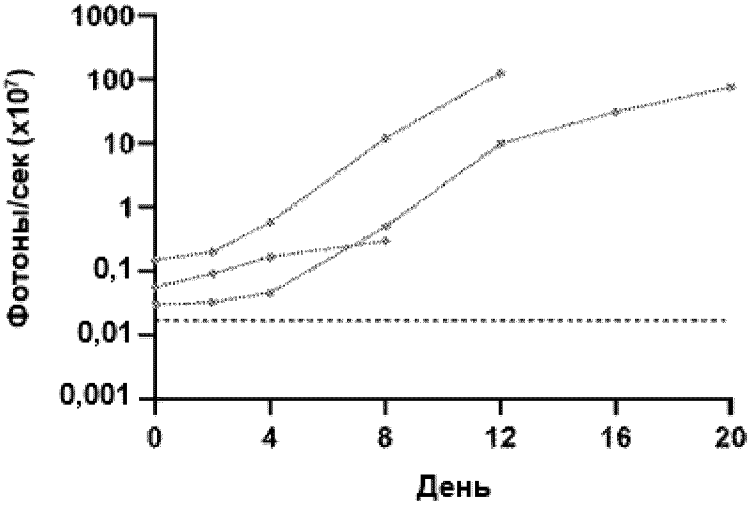
Фиг. 14B



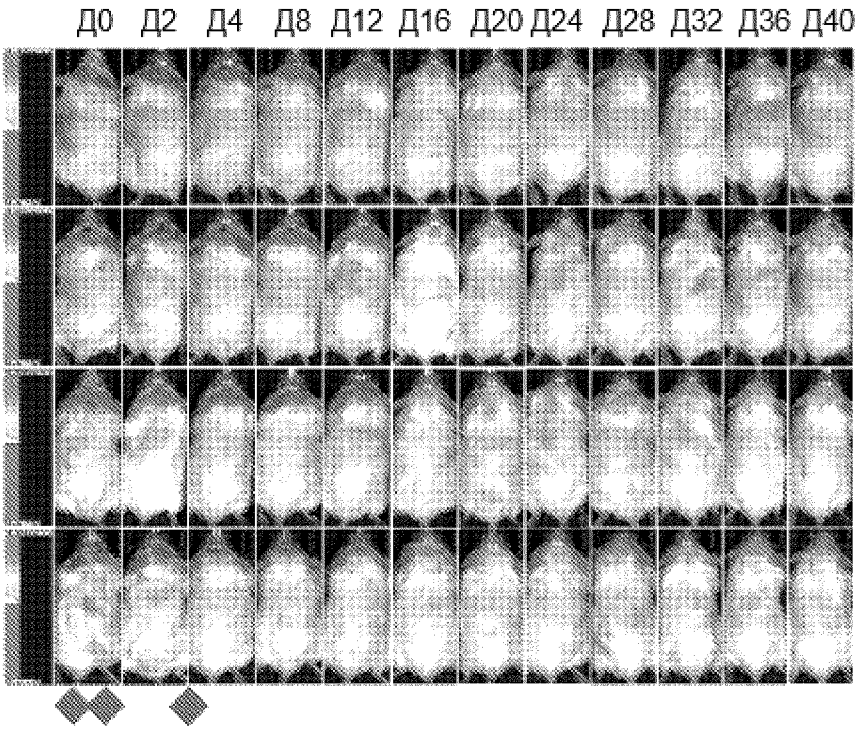
Фиг. 15A



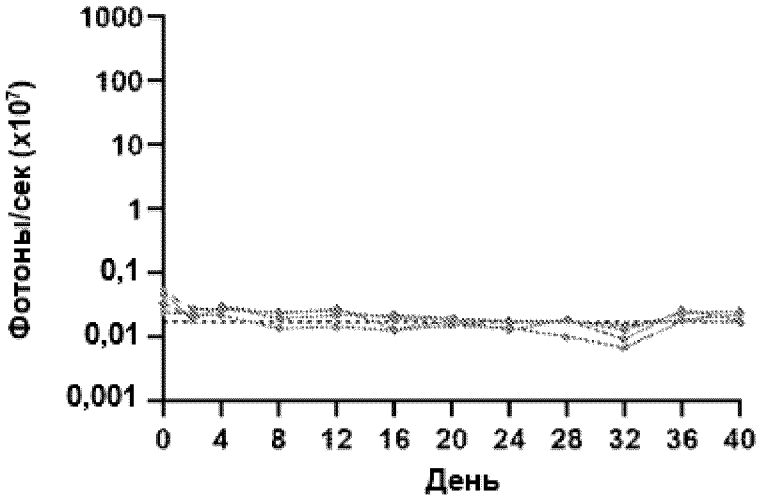
Фиг. 15B



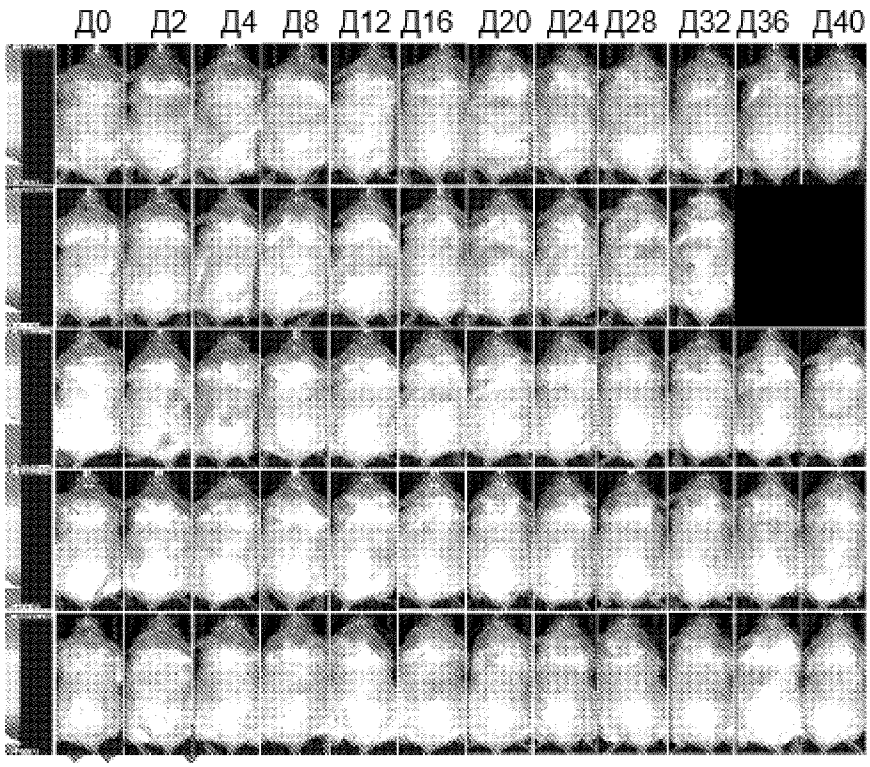
Фиг. 16A



Фиг. 16B

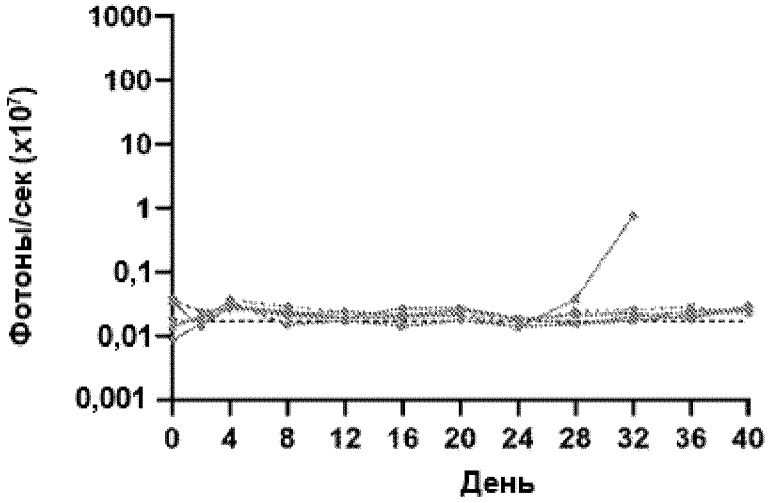


Фиг. 17A

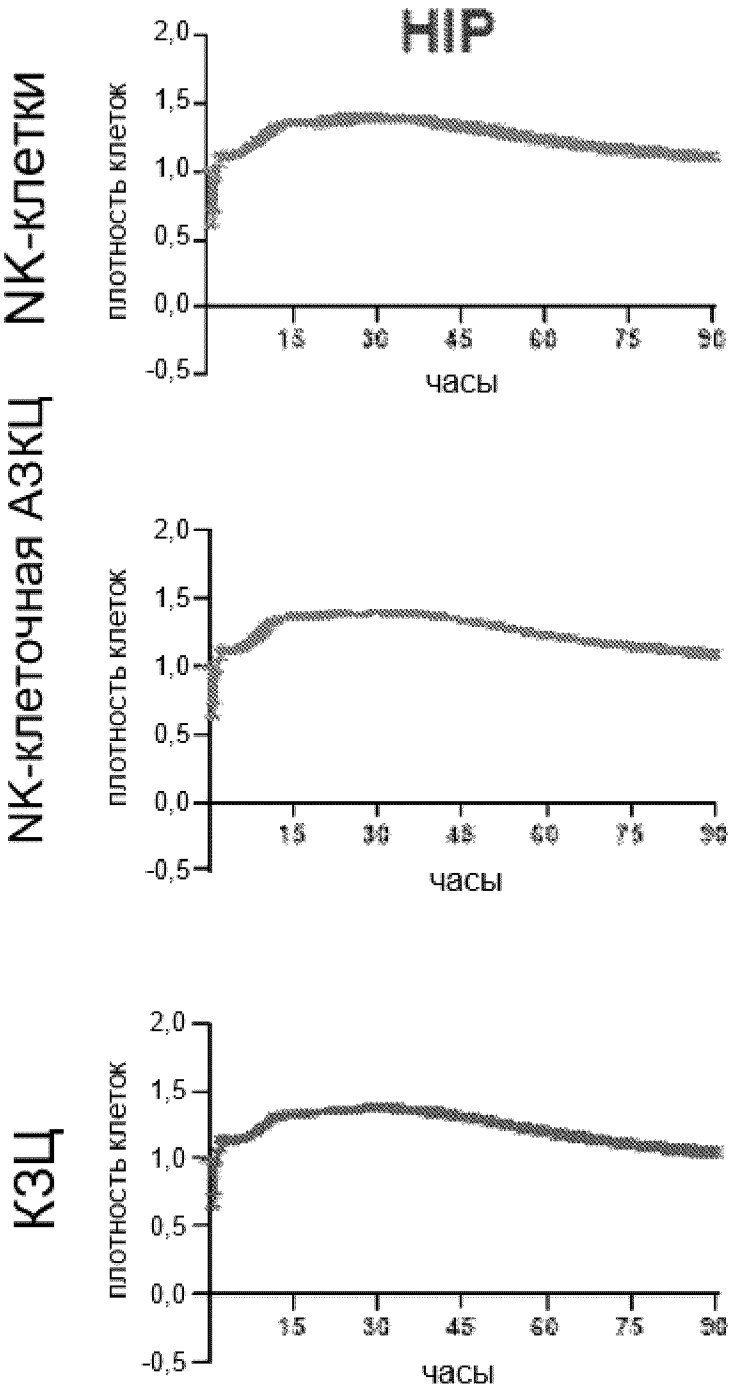


лечение:
Д0, Д1, Д3

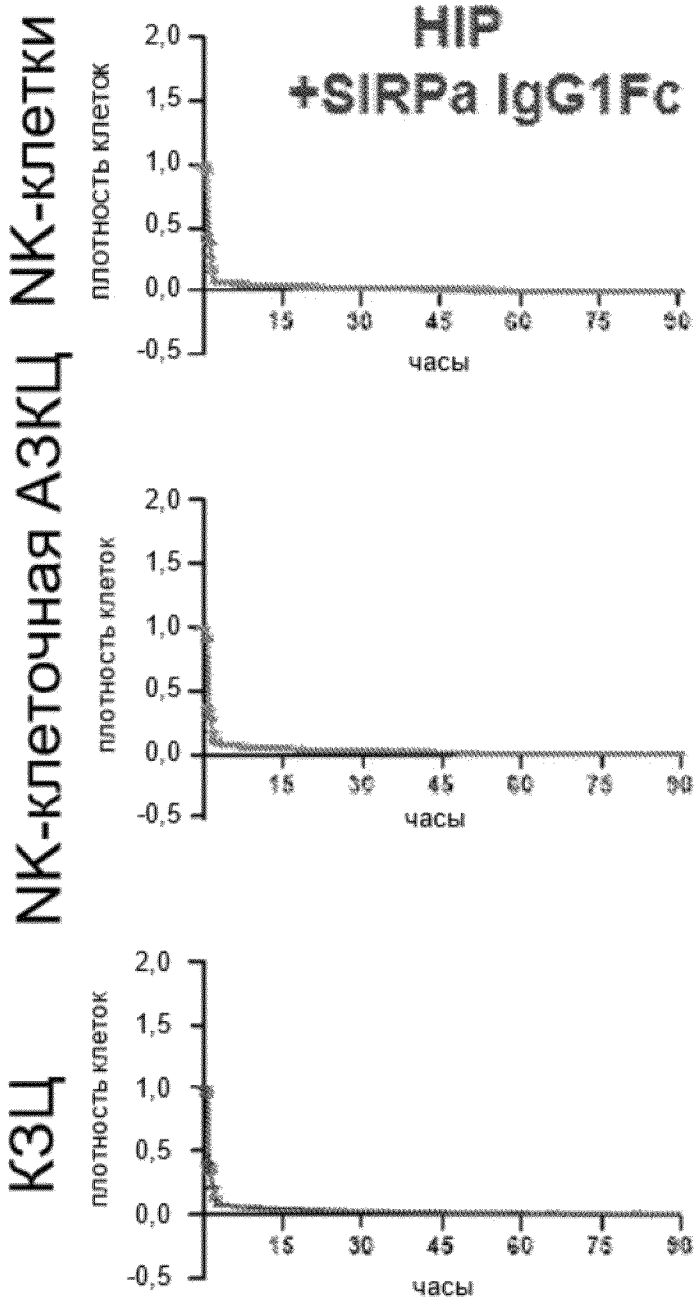
Фиг. 17B



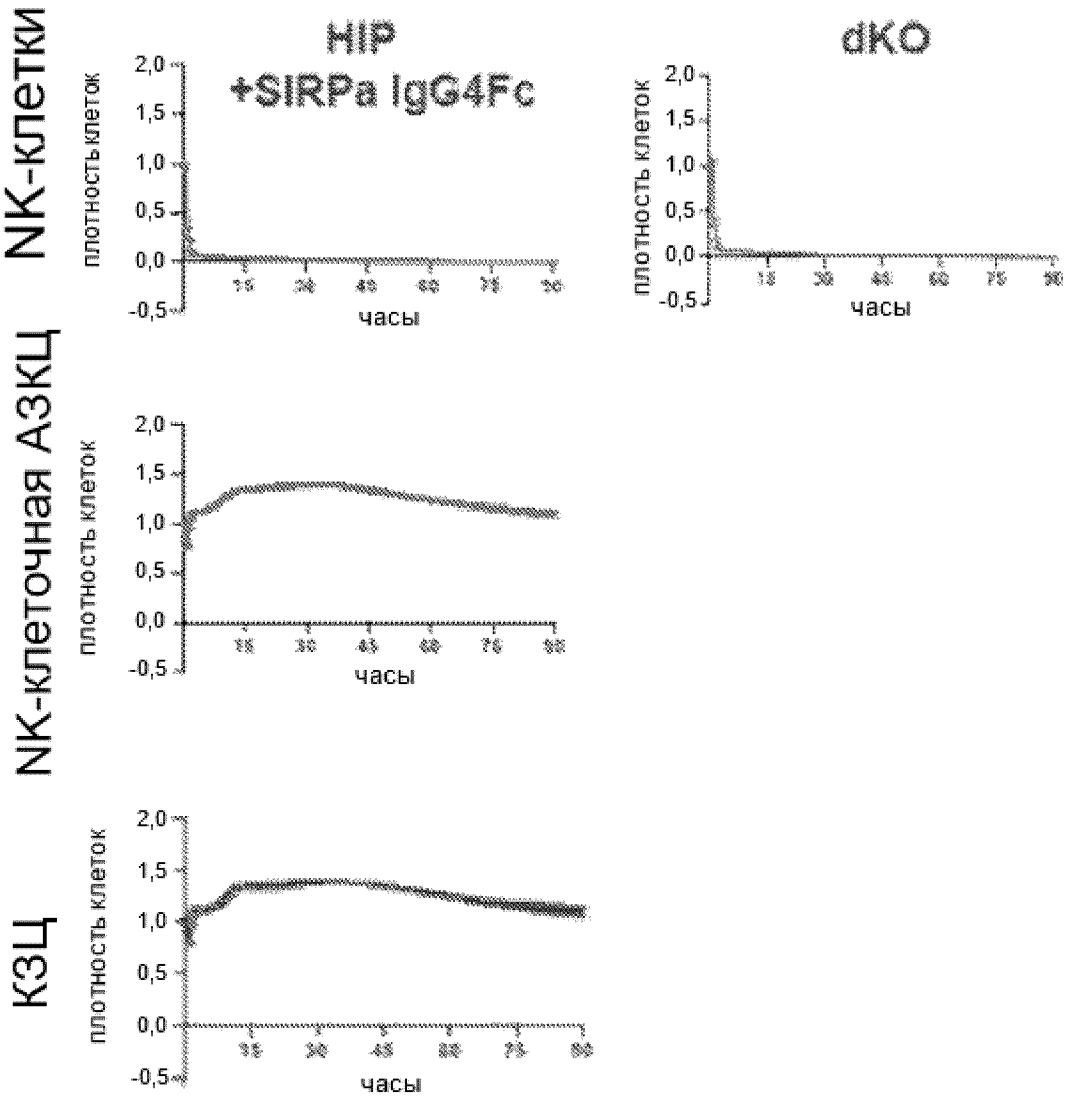
Фиг. 18A


HIP
NK-клетки
плотность клеток
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
15
30
45
60
75
90
часы
NK-клеточная АЗКЦ
плотность клеток
часы
КЗЦ
плотность клеток
часы

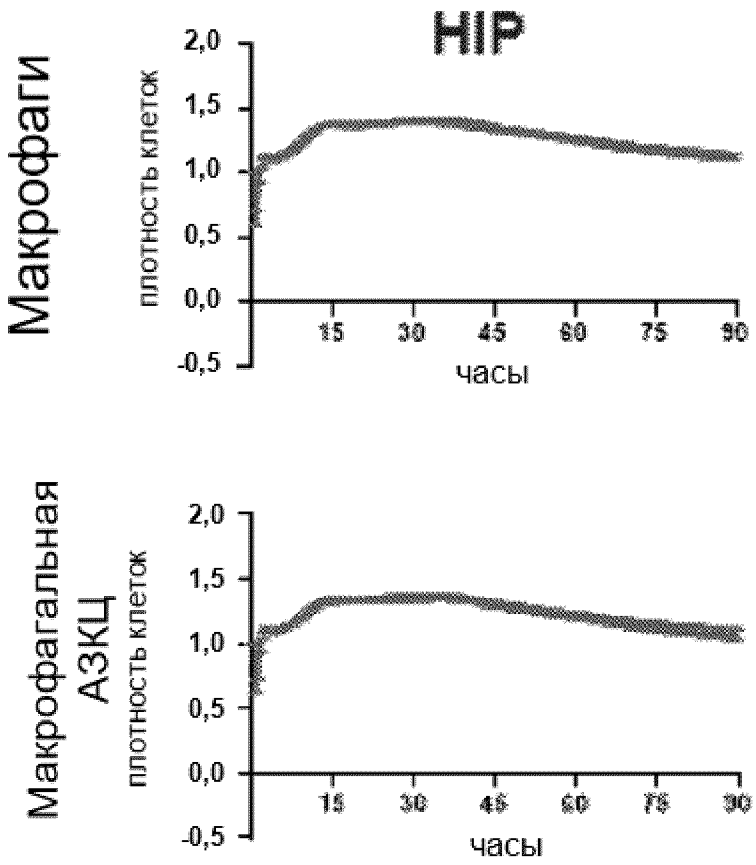
Фиг. 18B


NK-клеточная АЗКЦ
NK-клетки
КЗЦ
HIP
+SIRPa IgG1Fc
плотность клеток
часы
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
15
30
45
60
75
90

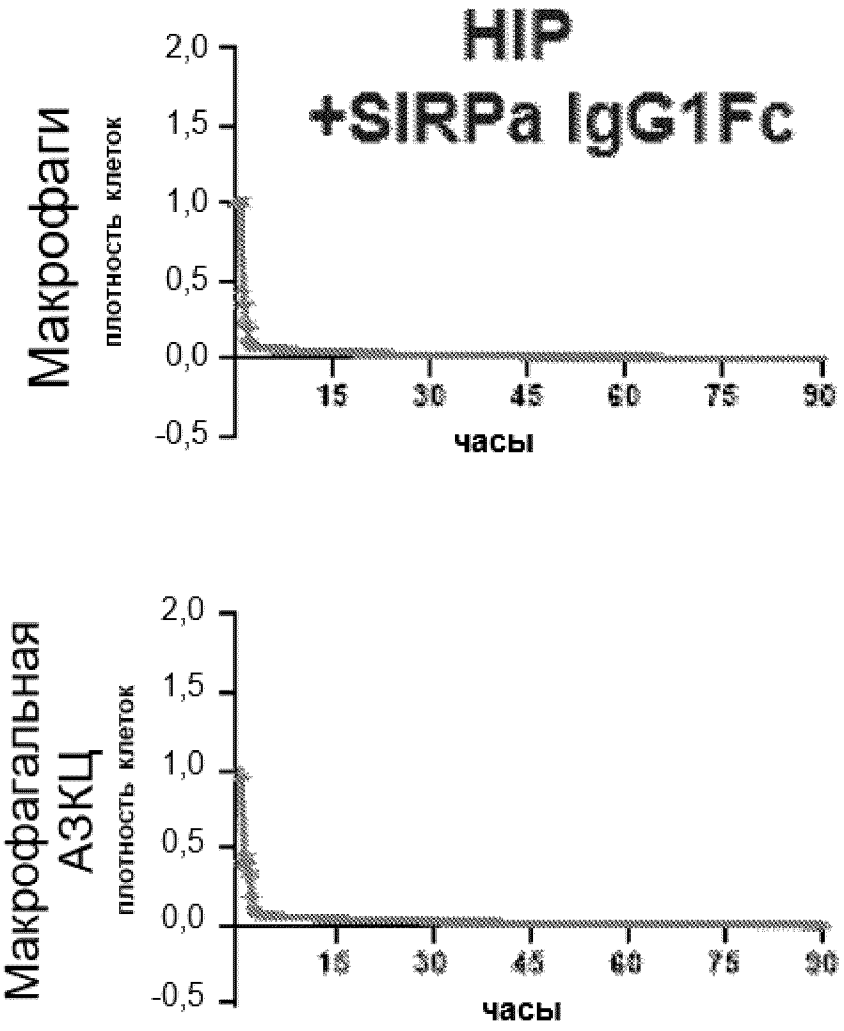
Фиг. 18C


NK-клетки
NK-клеточная АЗКЦ
КЗЦ
HIP
+SIRPa IgG4Fc
dKO
плотность клеток
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
часы

Фиг. 18D


HIP
Макрофаги
плотность клеток
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
15
30
45
60
75
90
часы
Макрофагальная АЗКЦ
плотность клеток
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
15
30
45
60
75
90
часы

Фиг. 18E


HIP
+SIRPa IgG1Fc
Макрофаги
плотность клеток
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
15
30
45
60
75
90
часы
Макрофагальная АЗКЦ
плотность клеток
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
15
30
45
60
75
90
часы

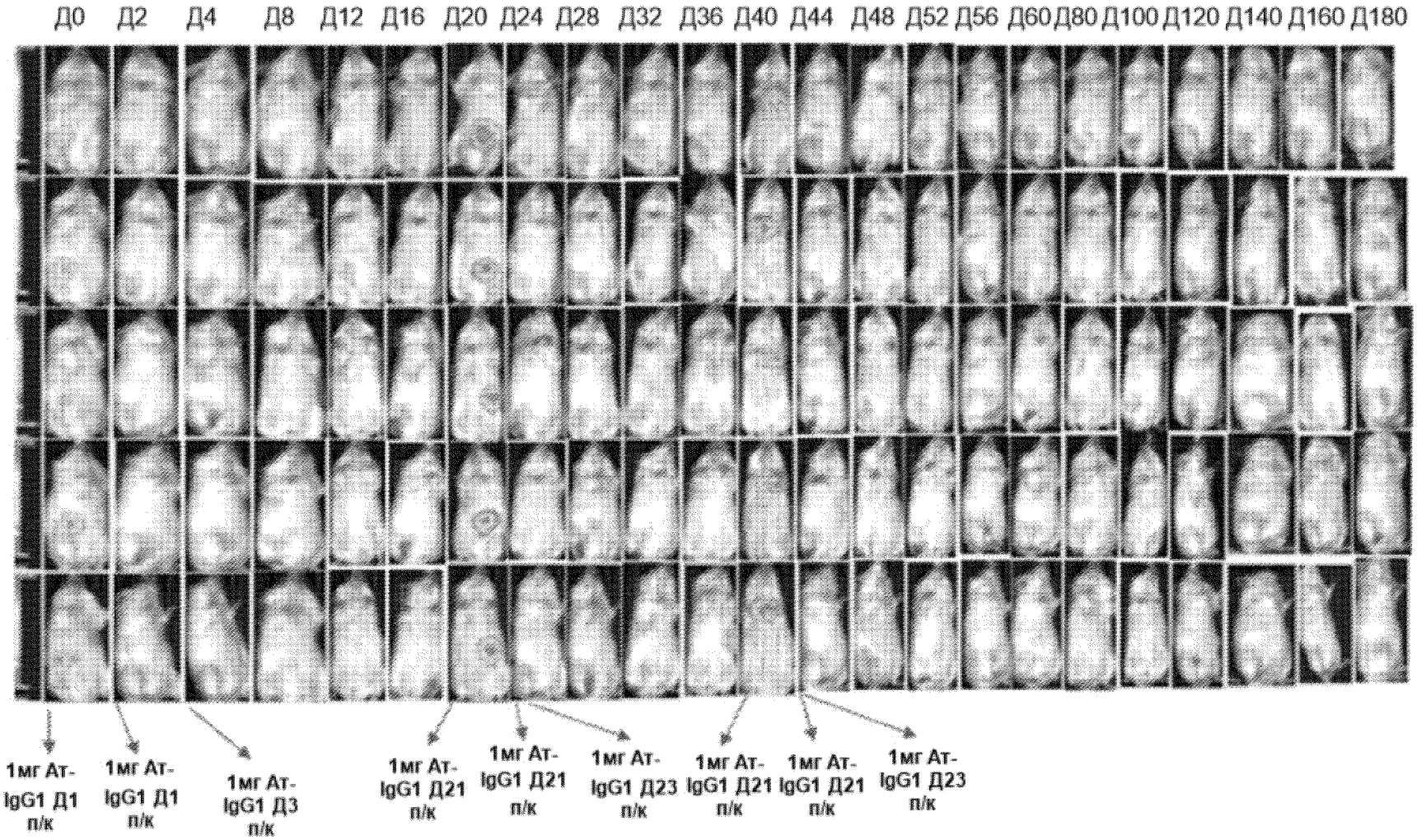
HIP
+SIRPa IgG4Fc
Макрофаги
плотность клеток
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
15
30
45
60
75
90
часы

dKO
плотность клеток
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
15
30
45
60
75
90
часы

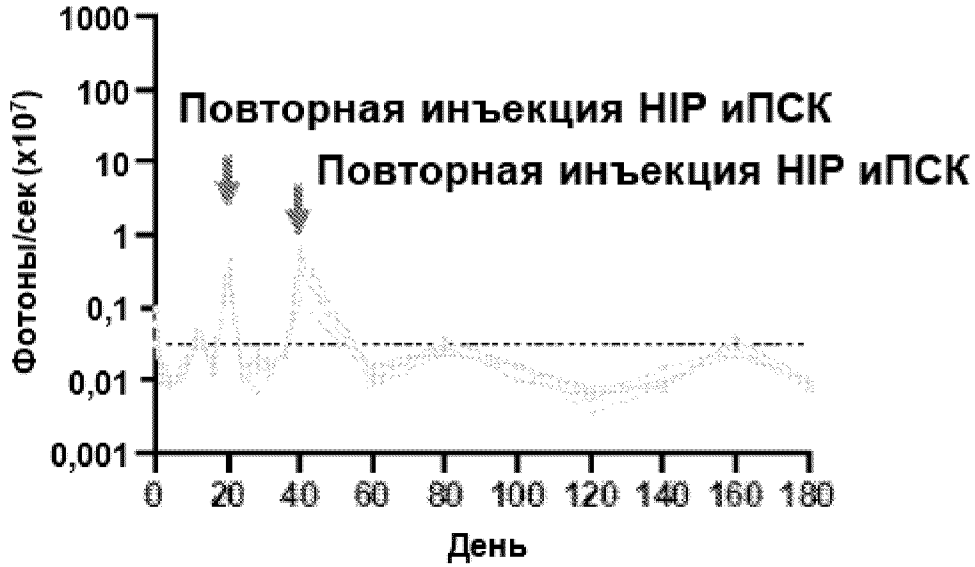
АЗКЦ
Макрофаги
плотность клеток
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
15
30
45
60
75
90
часы

Фиг. 18F

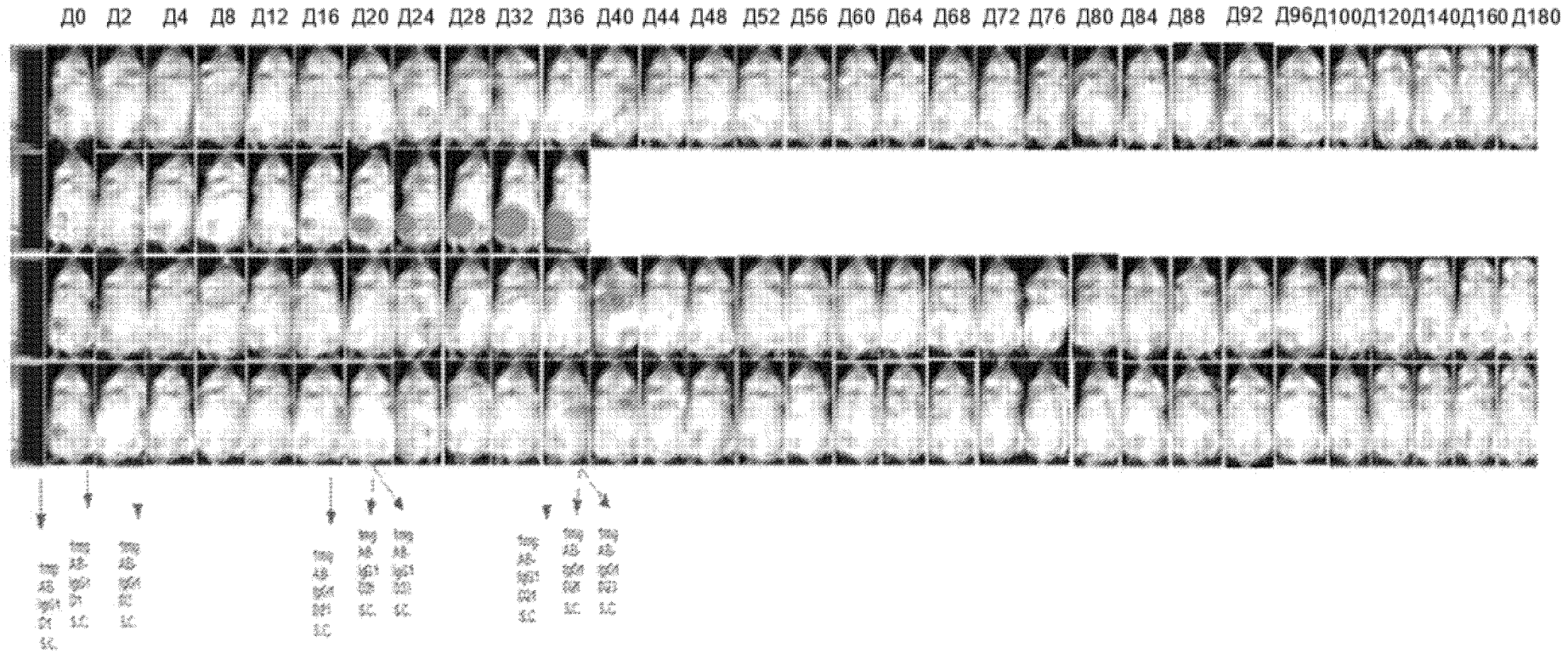
Фиг. 19A


Д0
Д2
Д4
Д8
Д12
Д16
Д20
Д24
Д28
Д32
Д36
Д40
Д44
Д48
Д52
Д56
Д60
Д80
Д100
Д120
Д140
Д160
Д180
1мг Ат-IgG1 Д1 п/к
1мг Ат-IgG1 Д1 п/к
1мг Ат-IgG1 Д3 п/к
1мг Ат-IgG1 Д21 п/к
1мг Ат-IgG1 Д21 п/к
1мг Ат-IgG1 Д23 п/к
1мг Ат-IgG1 Д21 п/к
1мг Ат-IgG1 Д21 п/к
1мг Ат-IgG1 Д23 п/к

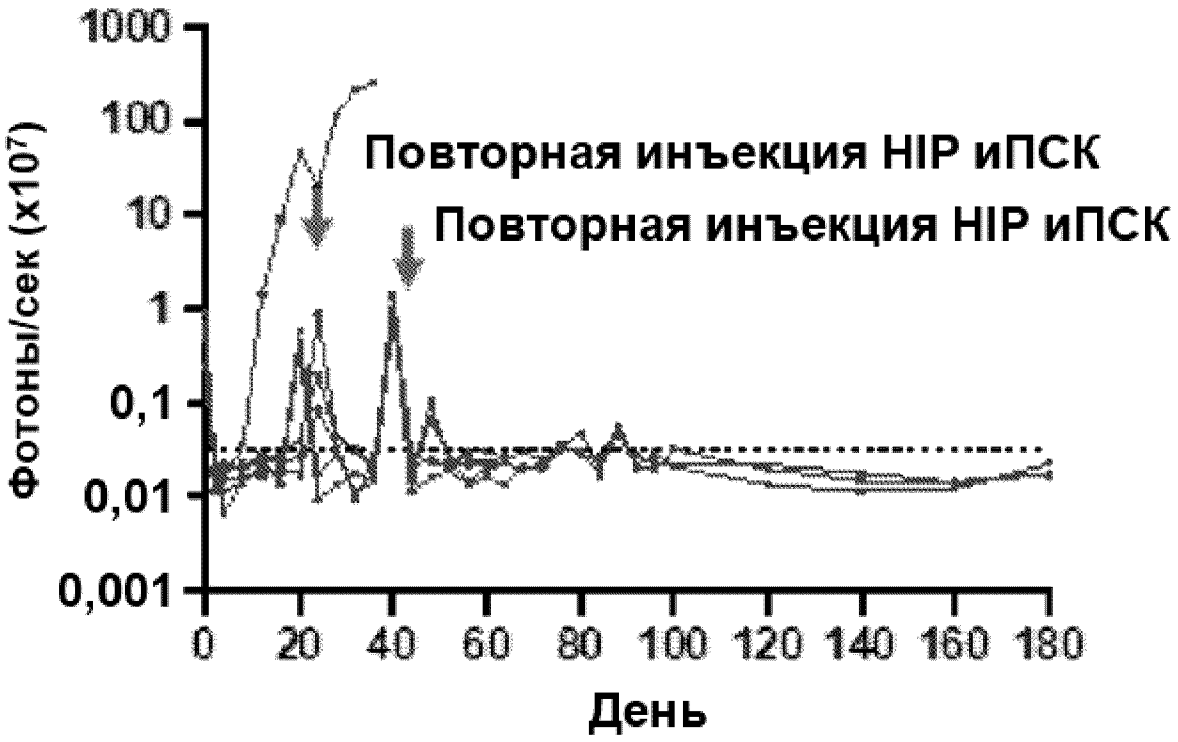
Фиг. 19B


1000
100
10
1
0,1
0,01
0,001
Фотоны/сек (x10⁷)
Повторная инъекция HIP иПСК
Повторная инъекция HIP иПСК
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
День

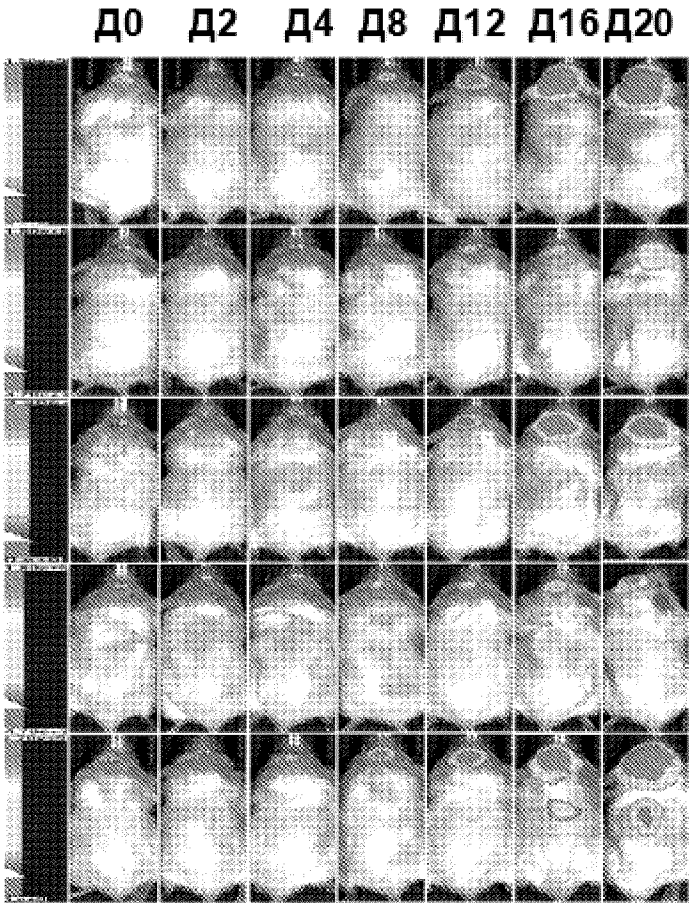
Фиг. 20А


Д0 Д2 Д4 Д8 Д12 Д16 Д20 Д24 Д28 Д32 Д36 Д40 Д44 Д48 Д52 Д56 Д60 Д64 Д68 Д72 Д76 Д80 Д84 Д88 Д92 Д96 Д100 Д120 Д140 Д160 Д180

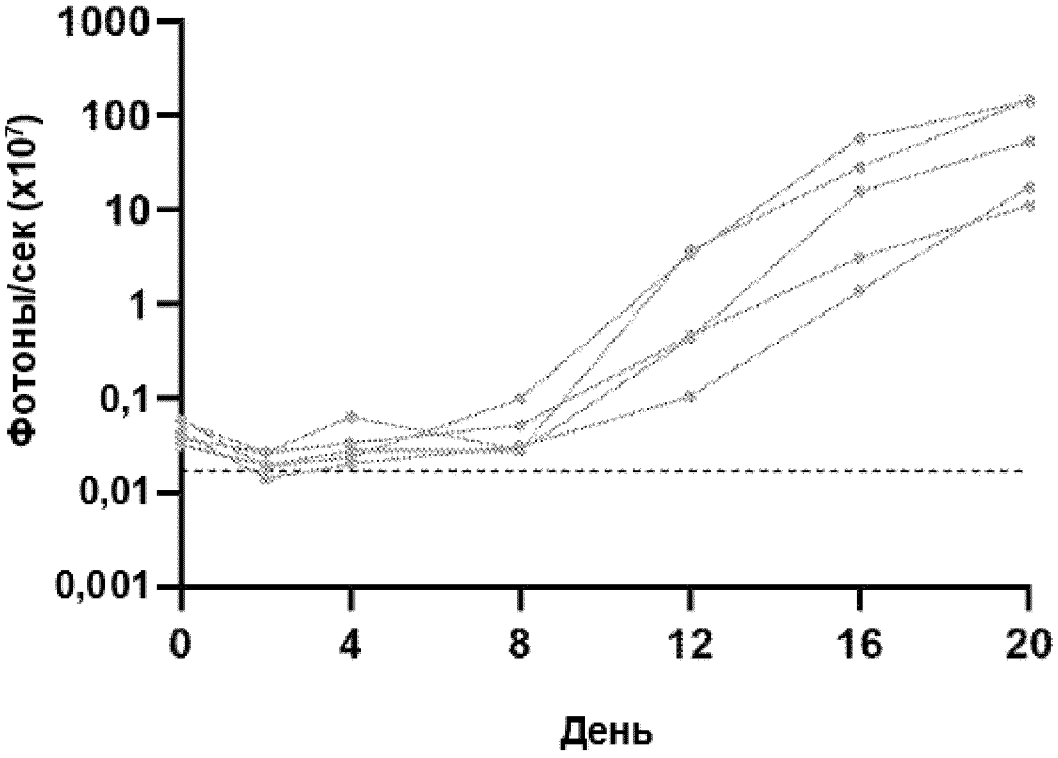
Фиг. 20B


1000
100
10
1
0,1
0,01
0,001
Фотоны/сек (x10⁷)
Повторная инъекция HIP иПСК
Повторная инъекция HIP иПСК
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
День

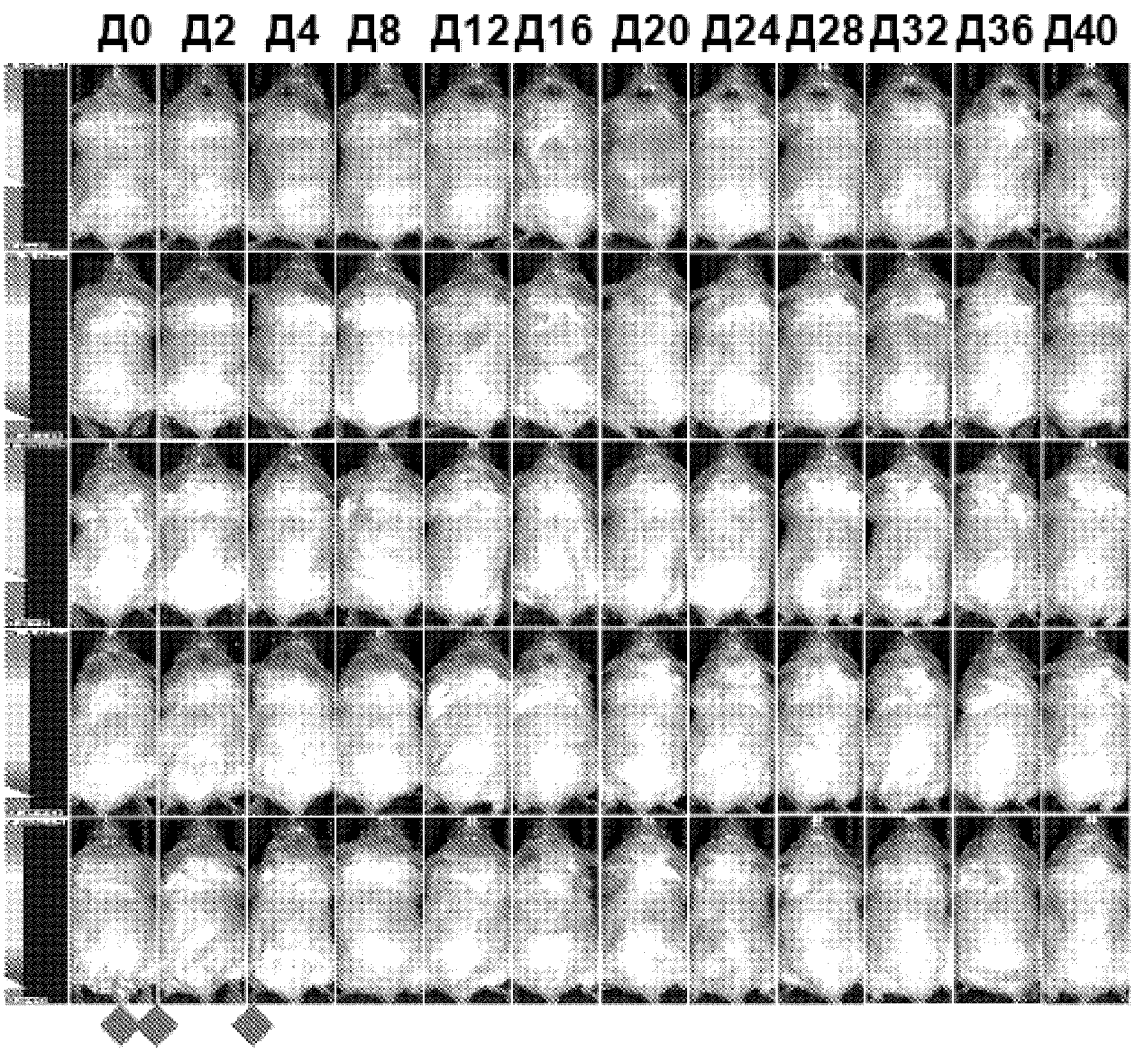
Фиг. 21A



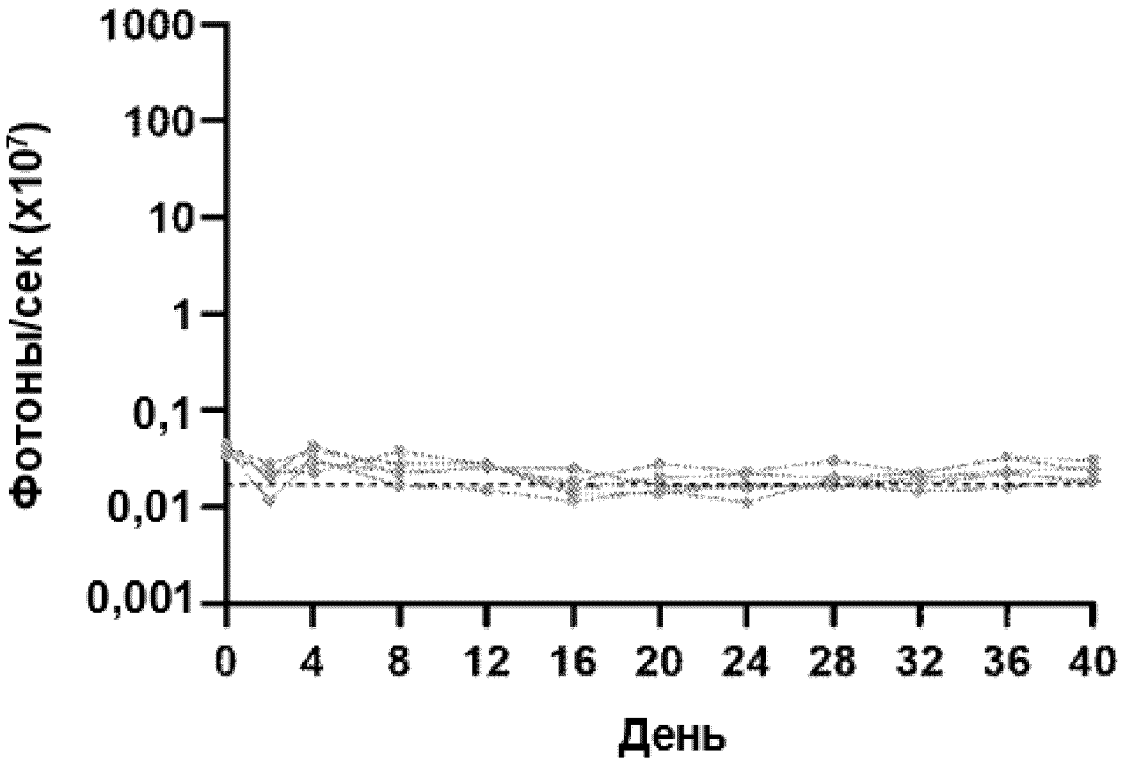
Фиг. 21B



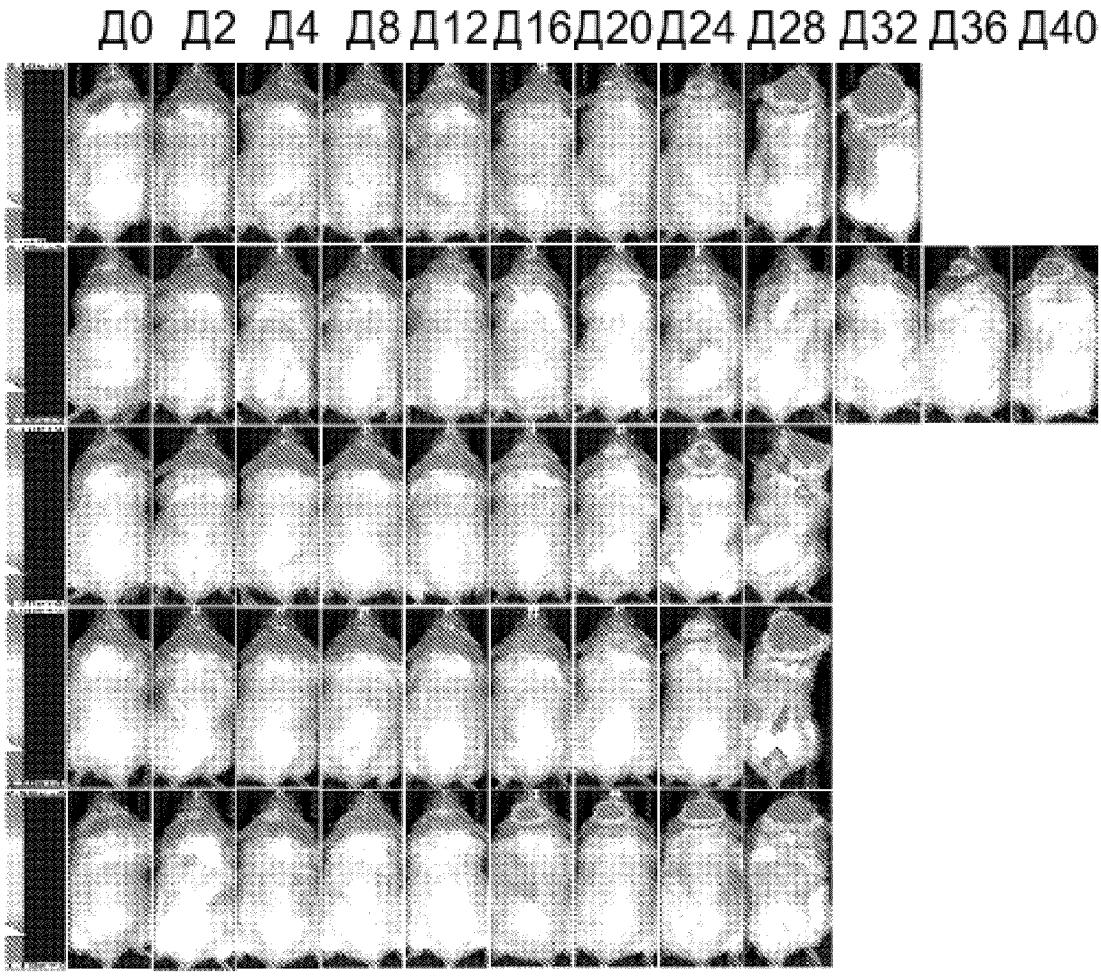
Фиг. 22A



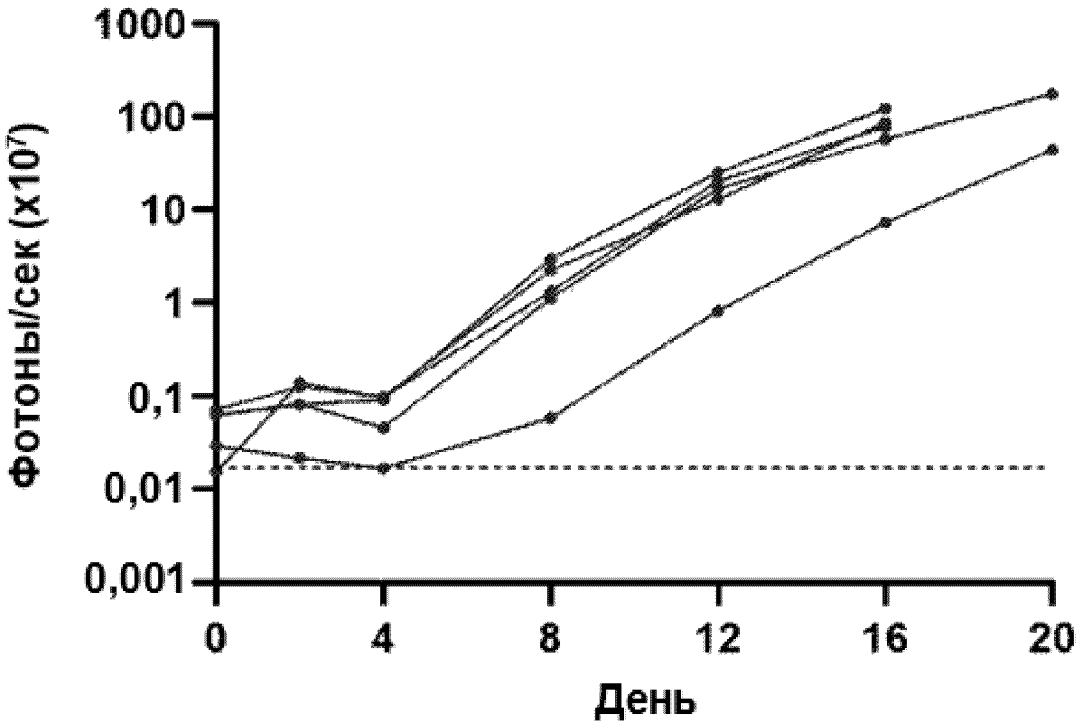
Фиг. 22B


1000
100
10
1
0,1
0,01
0,001
Фотоны/сек (x10⁷)
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
День

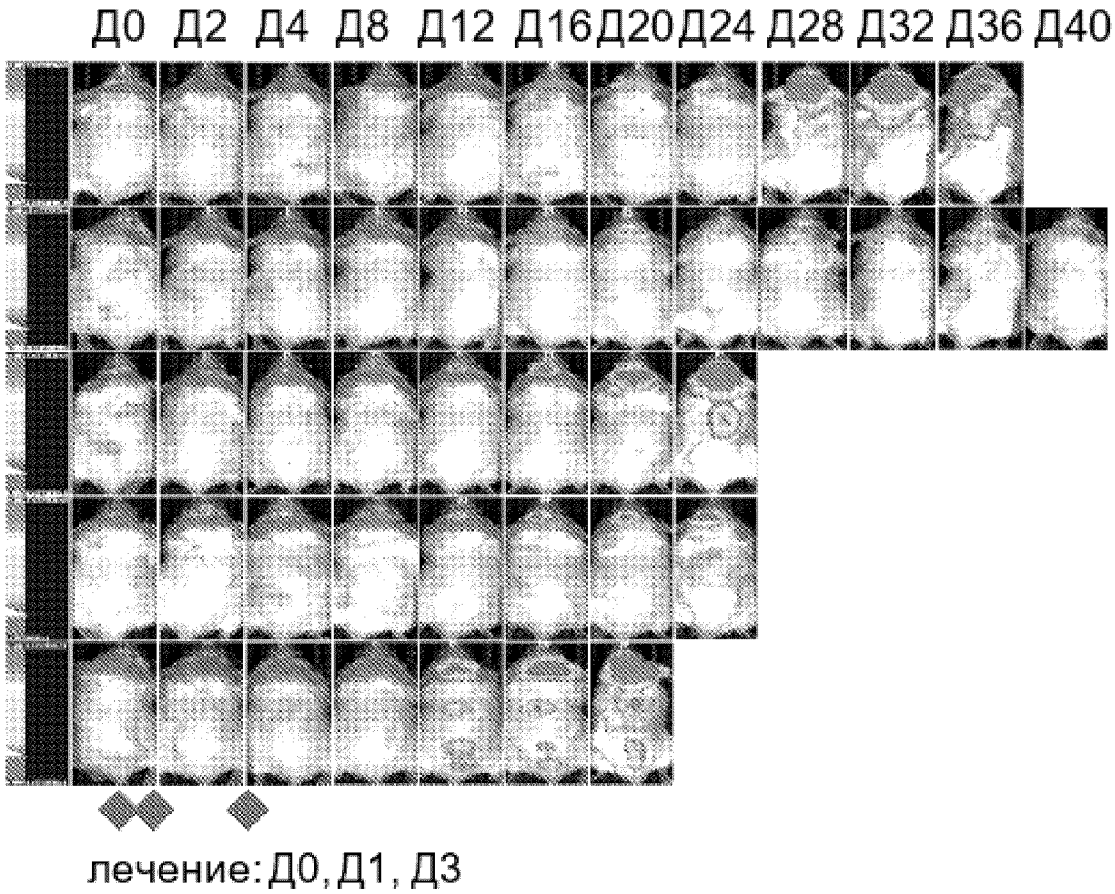
Фиг. 23A



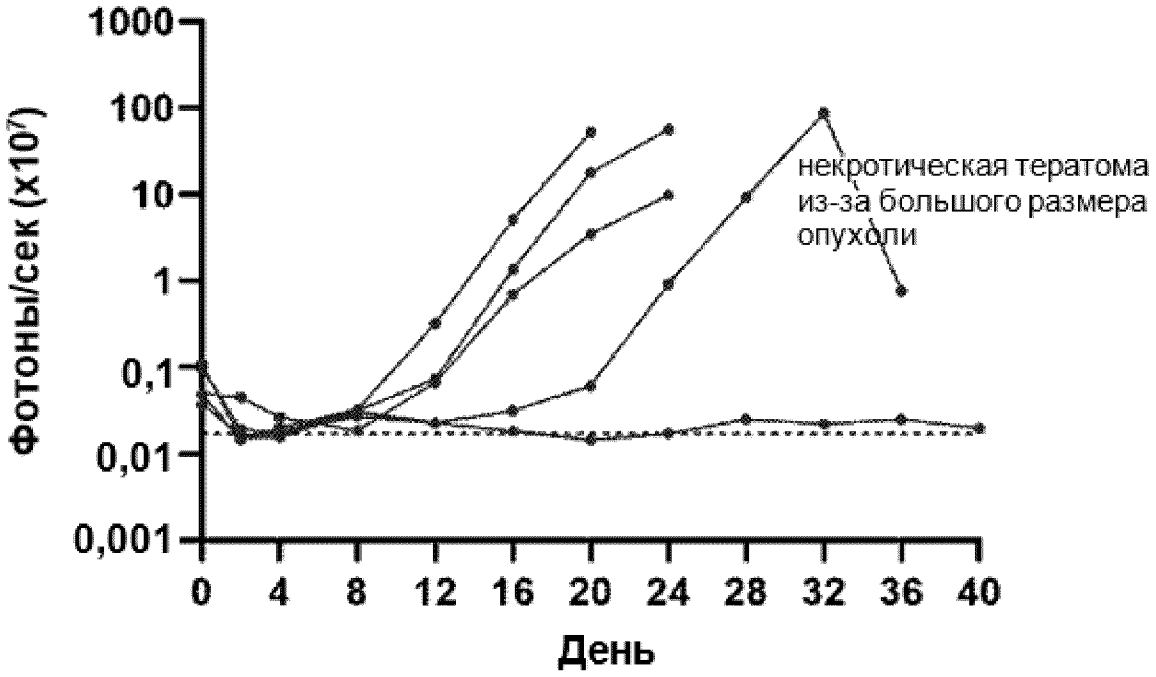
Фиг. 23B



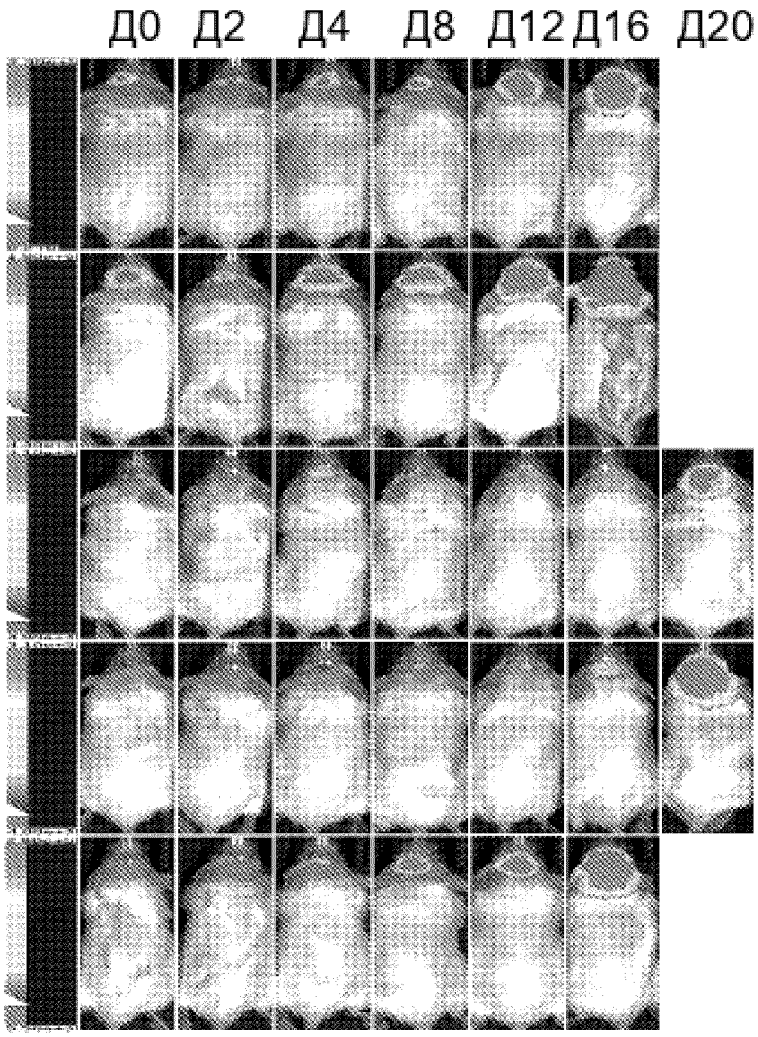
Фиг. 24А



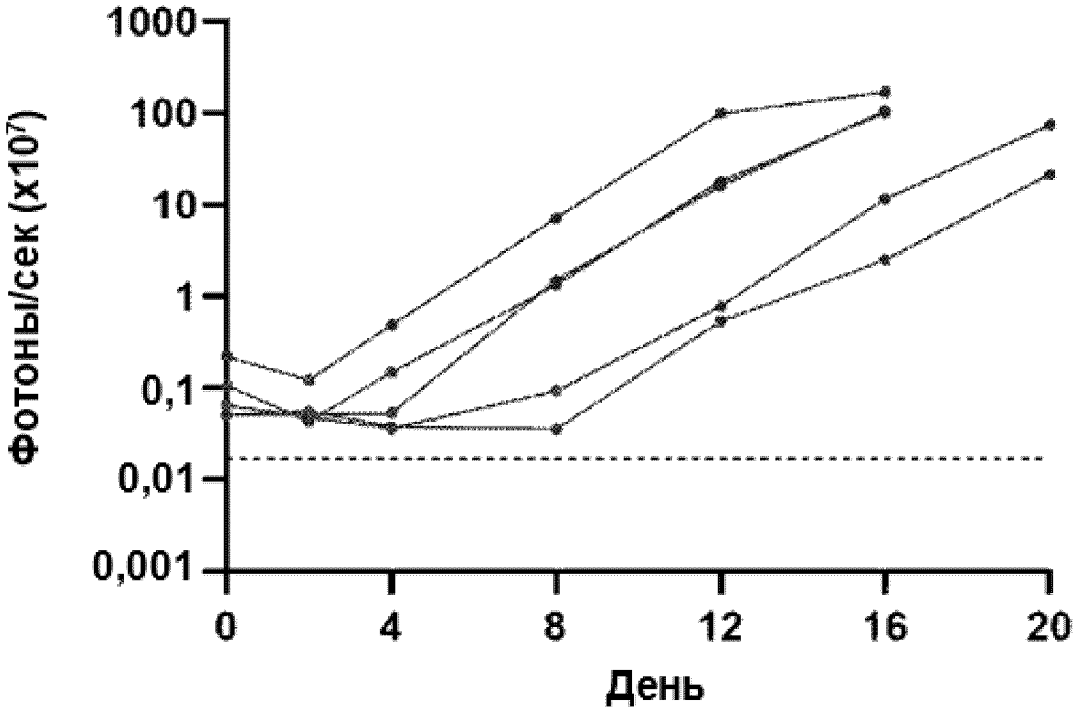
Фиг. 24B


1000
100
10
1
0,1
0,01
0,001
Фотоны/сек (x10⁷)
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
День
некротическая тератома
из-за большого размера
опухоли

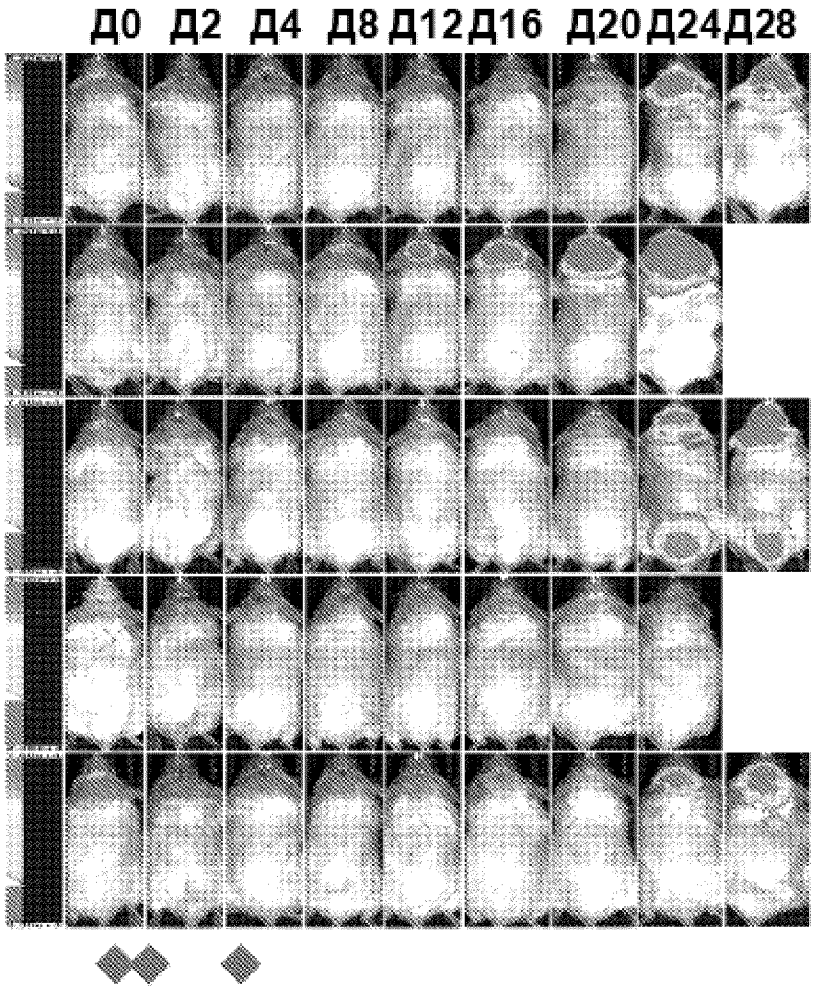
Фиг. 25А



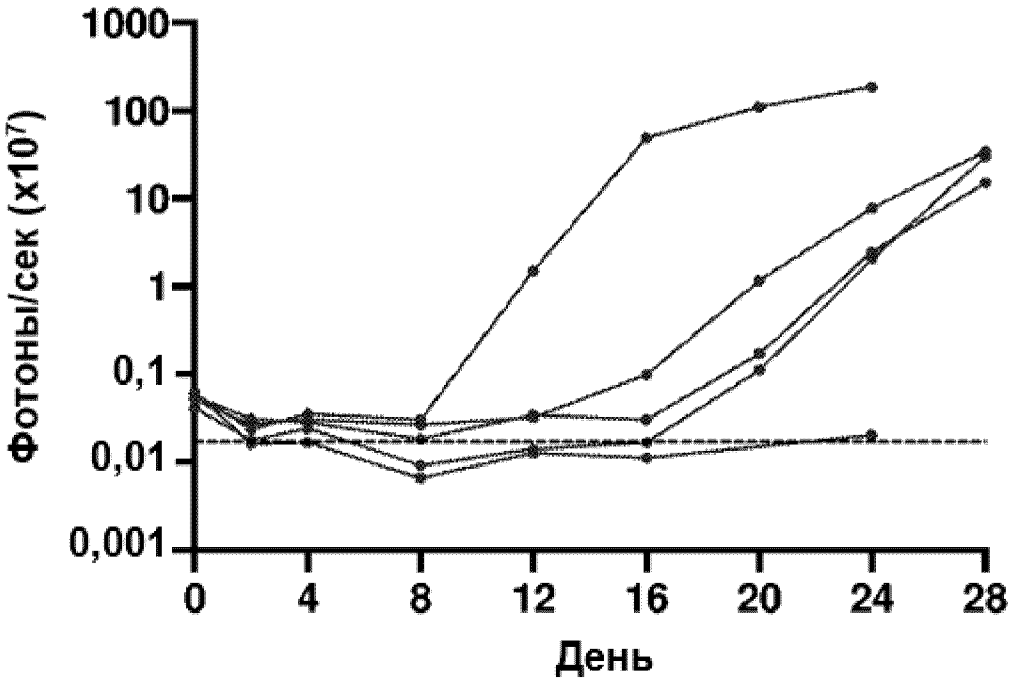
Фиг. 25B



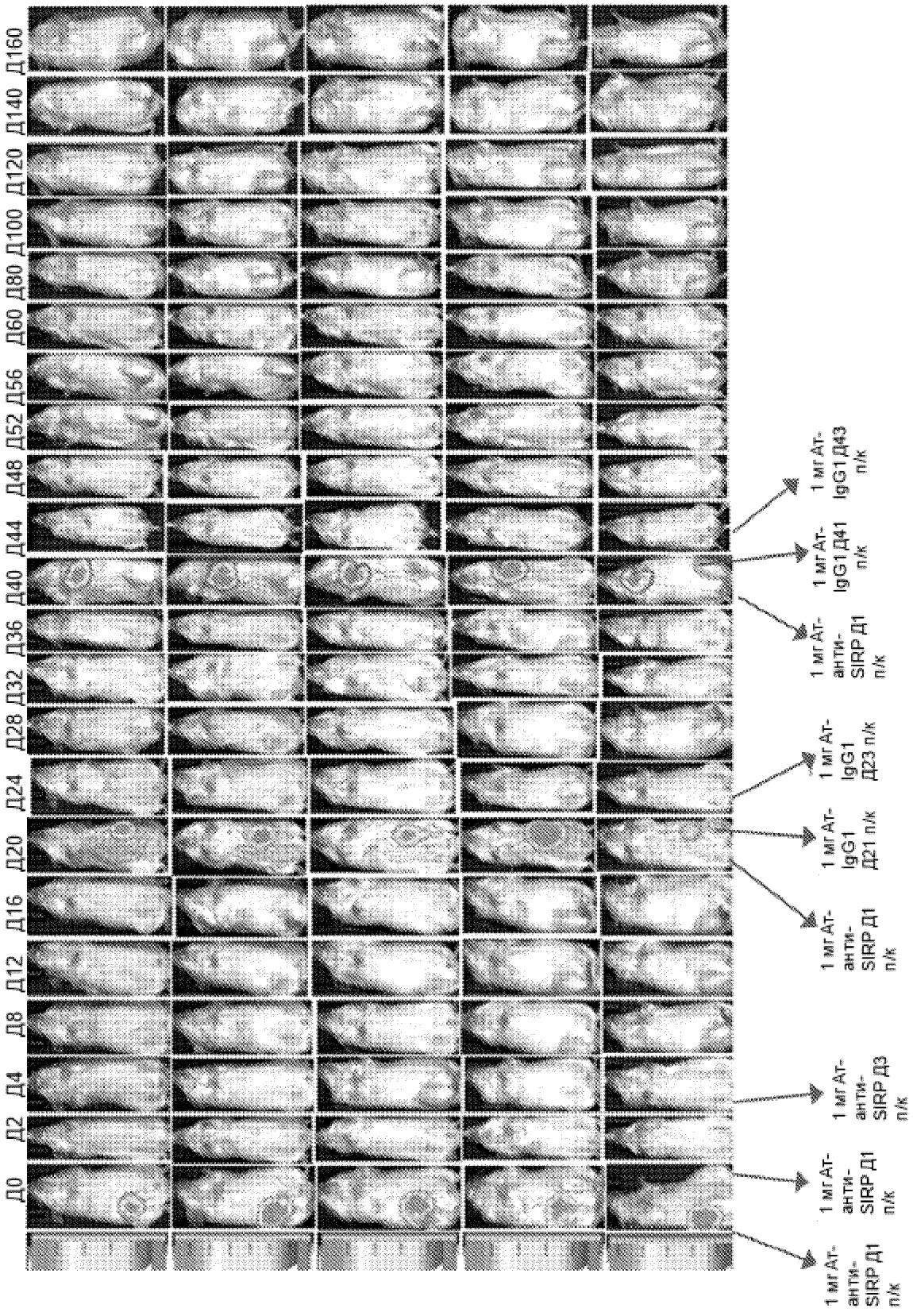
Фиг. 26A



Фиг. 26B

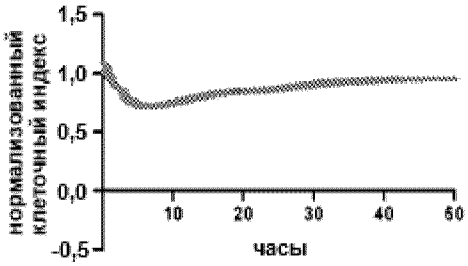


Фиг. 27

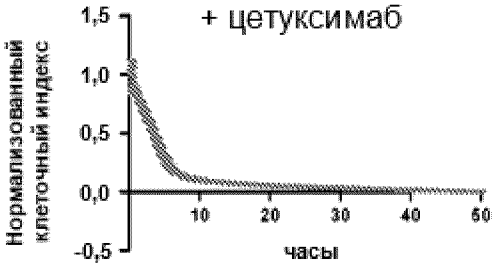

Д0
Д2
Д4
Д8
Д12
Д16
Д20
Д24
Д28
Д32
Д36
Д40
Д44
Д48
Д52
Д56
Д60
Д80
Д100
Д120
Д140
Д160
1 мг Ат-анти-SIRP Д1 п/к
1 мг Ат-анти-SIRP Д1 п/к
1 мг Ат-анти-SIRP Д3 п/к
1 мг Ат-анти-SIRP Д1 п/к
1 мг Ат-IgG1 Д21 п/к
1 мг Ат-IgG1 Д23 п/к
1 мг Ат-анти-SIRP Д1 п/к
1 мг Ат-IgG1 Д41 п/к
1 мг Ат-IgG1 Д43 п/к

Фиг. 28A

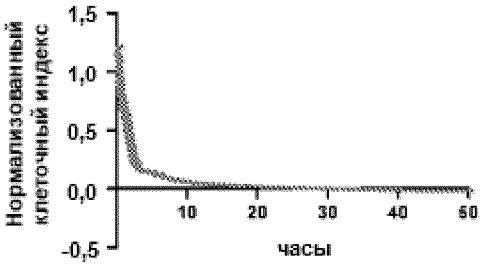
Ложно-трансфицированные Т-клетки



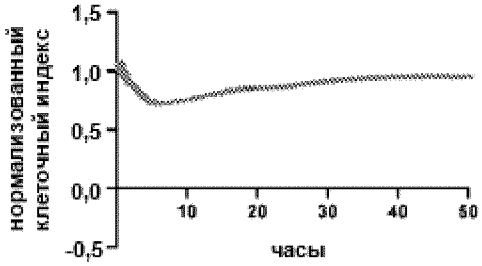
CD19 EGFRt CD19CAR

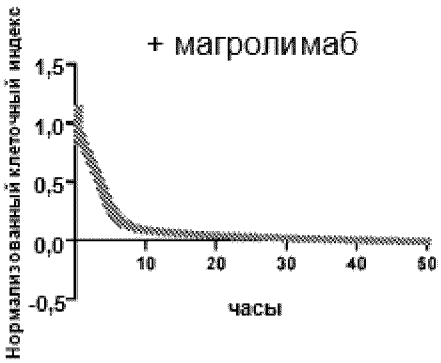


CD19 EGFRt+tKO CD19CAR

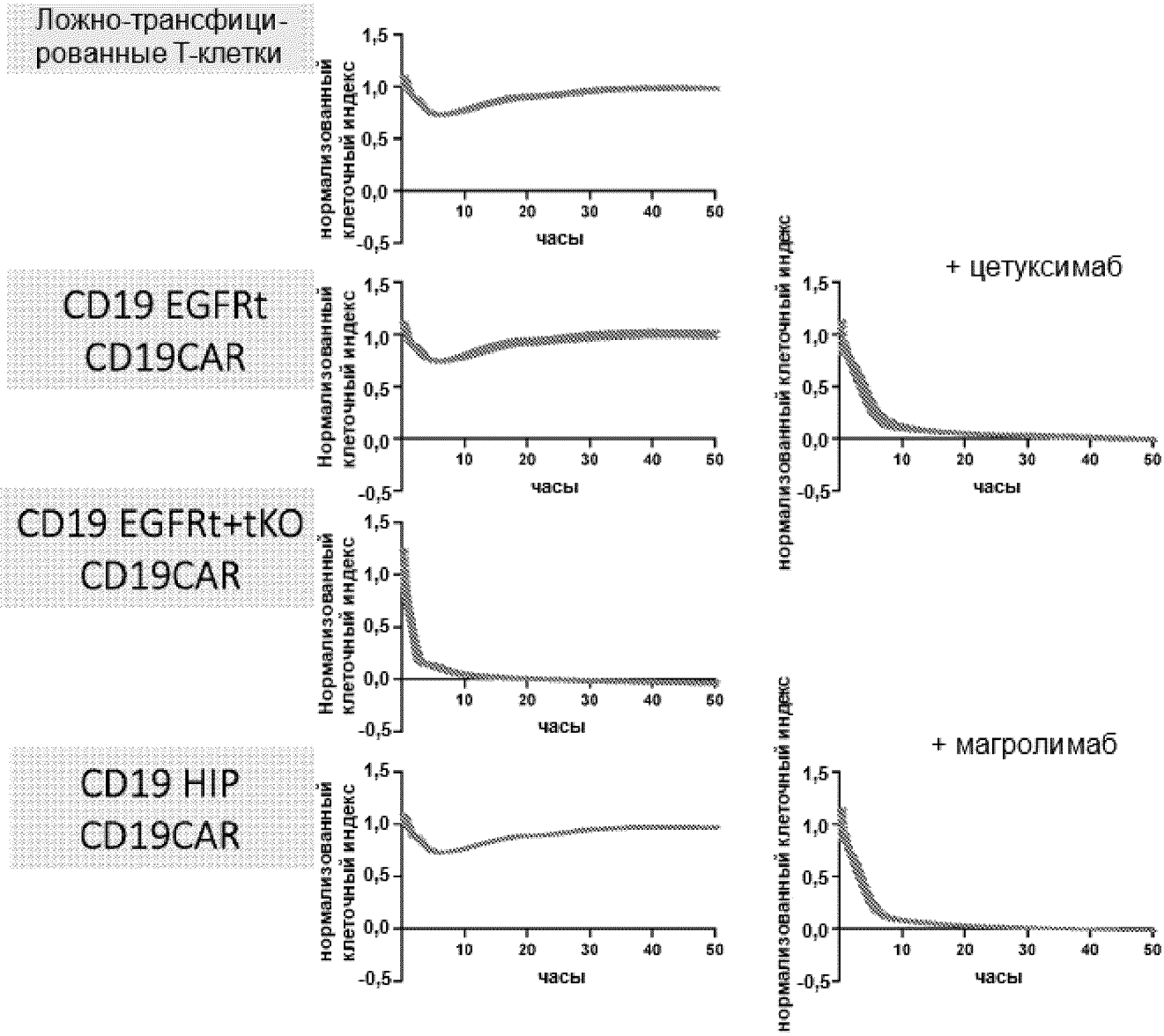


CD19 HIP CD19CAR

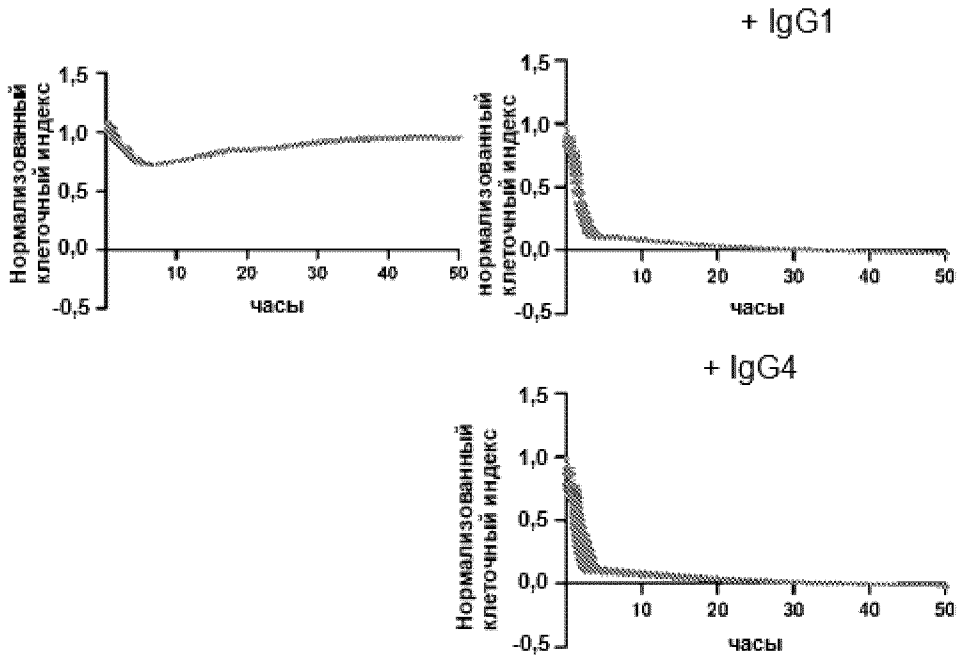




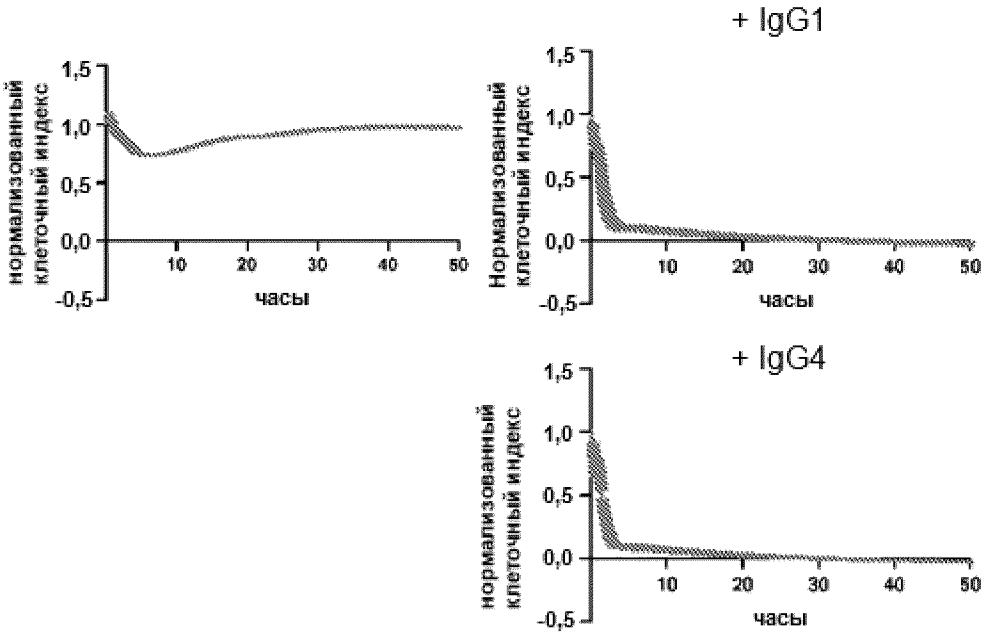
Фиг. 28B


Ложно-трансфици-рованные Т-клетки
CD19 EGFRt CD19CAR
CD19 EGFRt+tKO CD19CAR
CD19 HIP CD19CAR
нормализованный клеточный индекс
часы
+ цетуксимаб
+ магролимаб

Фиг. 29A



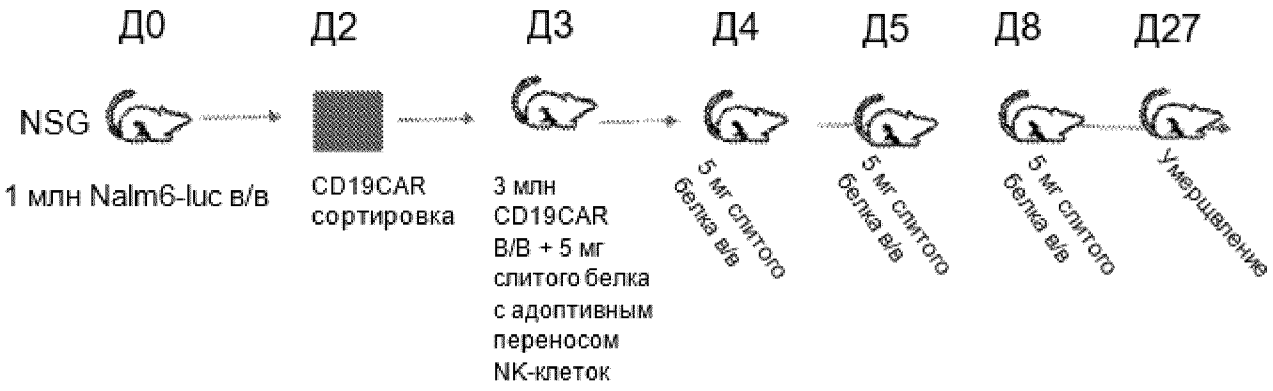
Фиг. 29B



Фиг. 30

N	Линия	1 млн nalm-6 luc+	3 млн клеток/мышь	Слитый белок (5 мг/ инъекция)	Адоптивный перенос 5 млн NK-клеток	ПВ
5	NSG	Да	HIP-CD19CAR*	IgG1**	Да	в/в
5	NSG	Да	HIP-CD19CAR*	IgG4	Да	в/в
5	NSG	Да	HIP-CD19CAR*	-	Да	в/в
5	NSG	Да	Ложно-трансфицированные Т-клетки	-	-	в/в

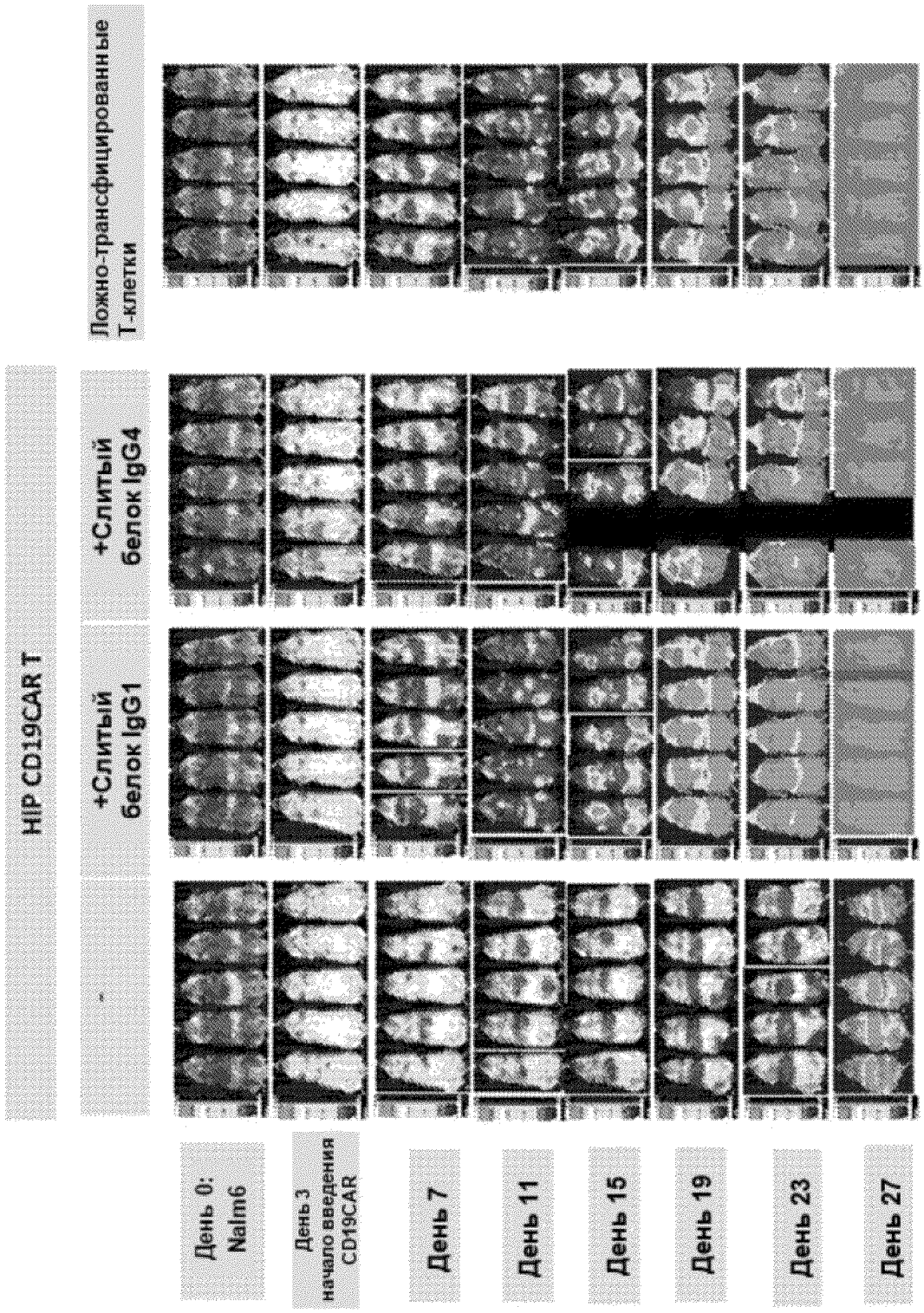
Фиг. 31


Д0
Д2
Д3
Д4
Д5
Д8
Д27
NSG
1 млн Nalm6-luc в/в
CD19CAR сортировка
3 млн CD19CAR B/B + 5 мг слитого белка с адоптивным переносом NK-клеток
5 мг слитого белка в/в
5 мг слитого белка в/в
5 мг слитого белка в/в
умерщвление

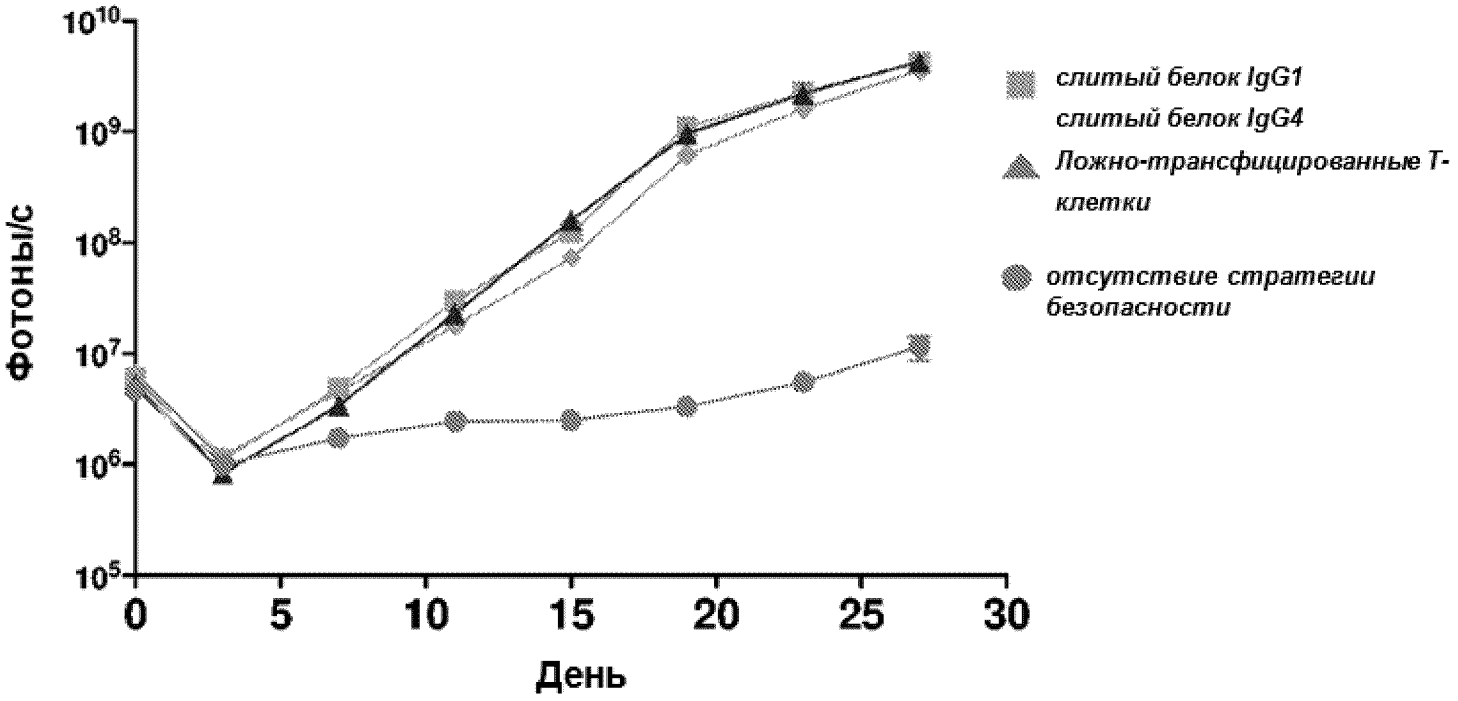
Фиг. 32

N	Линия	1 млн nalm-6 luc+	3 млн клеток/мышь	Слитый белок (5 мг на инъекцию)	Адоптивный перенос 5 млн NK-клеток	ПВ
5	NSG	Да	HIP-CD19CAR*	IgG1**	Да	в/в
5	NSG	Да	HIP-CD19CAR*	IgG4	Да	в/в
5	NSG	Да	HIP-CD19CAR*	-	Да	в/в
5	NSG	Да	Ложно-трансфицированные Т-клетки	-	-	в/в

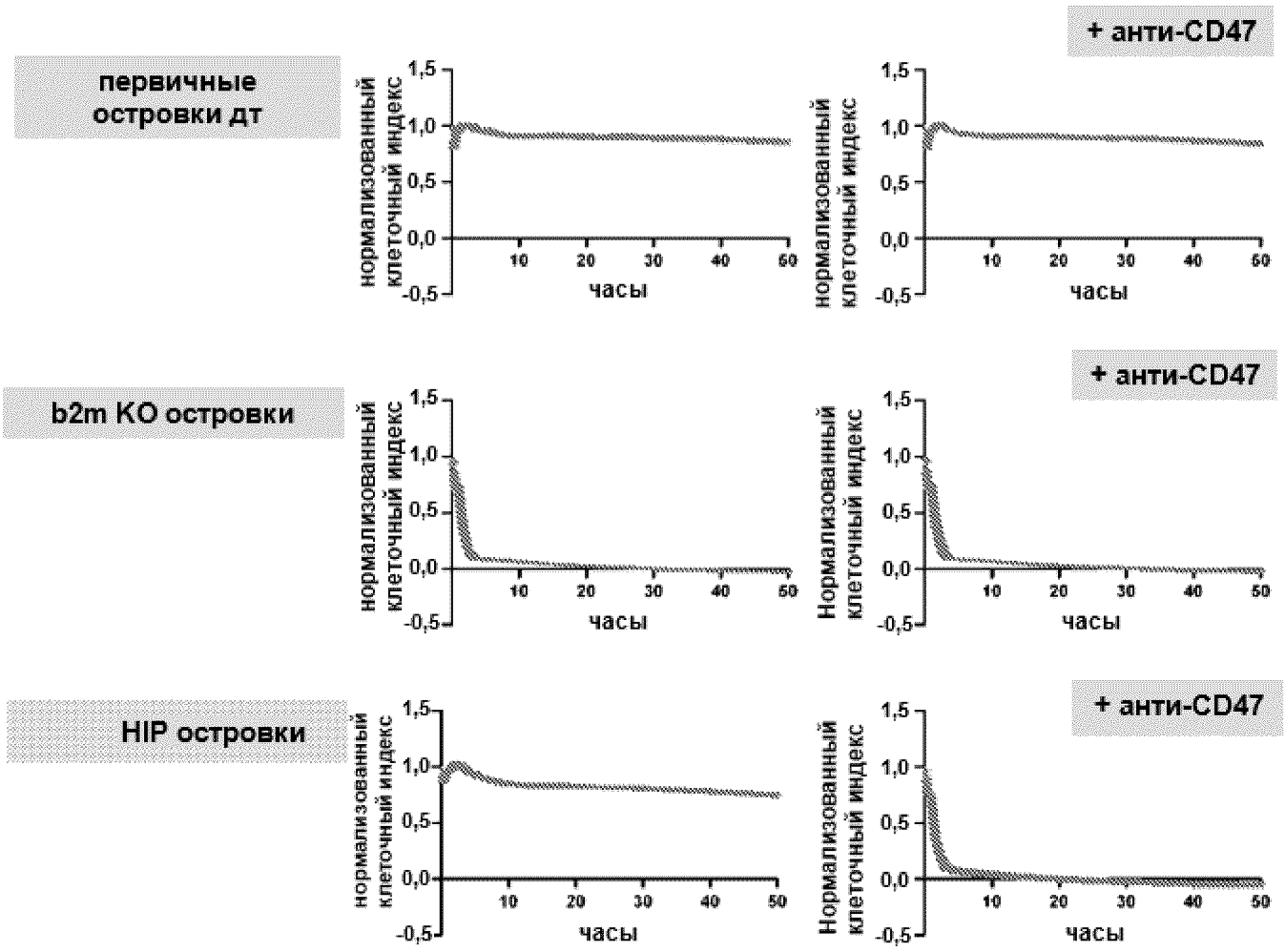
Фиг. 33


HIP CD19CAR T
-
+Слитый белок IgG1
+Слитый белок IgG4
Ложно-трансфицированные Т-клетки
День 0: Nalm6
День 3 начало введения CD19CAR
День 7
День 11
День 15
День 19
День 23
День 27

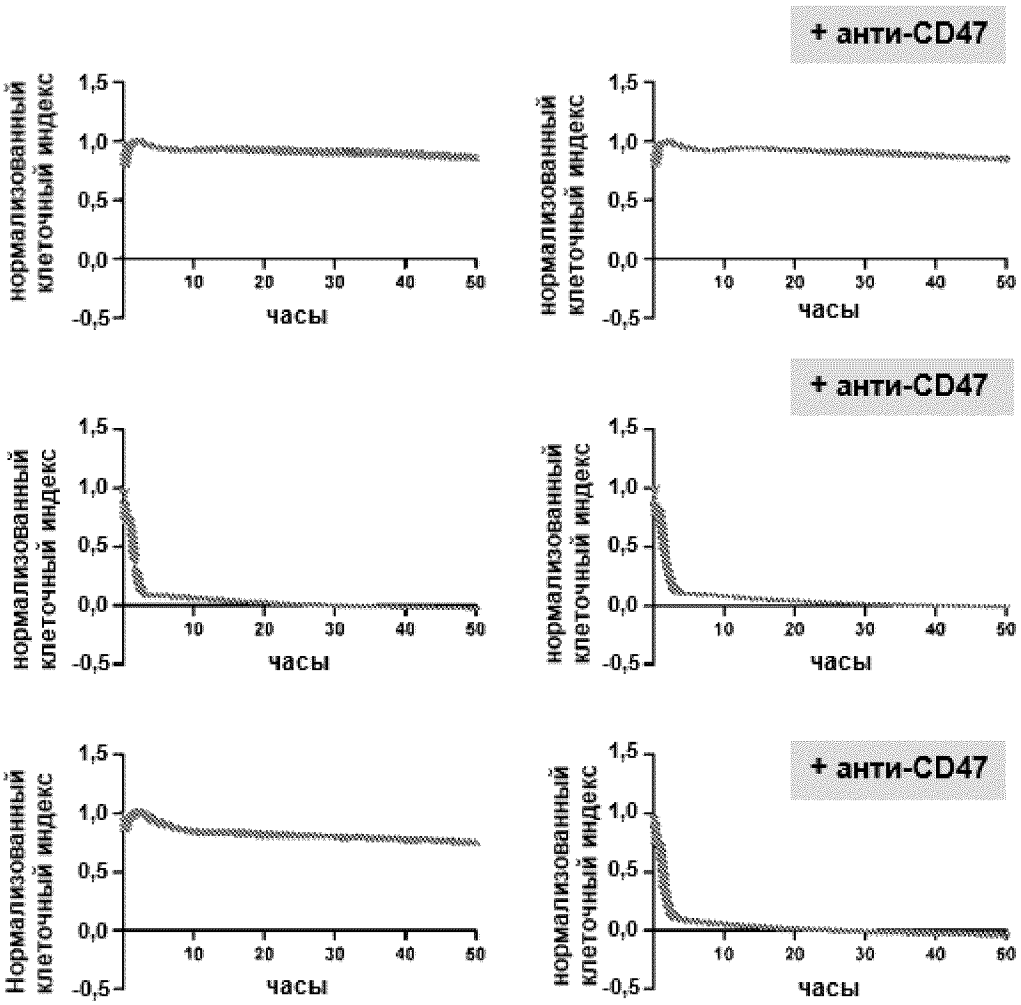
Фиг. 34


Фотоны/с
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
0
5
10
15
20
25
30
День
слитый белок IgG1
слитый белок IgG4
Ложно-трансфицированные Т-клетки
отсутствие стратегии безопасности

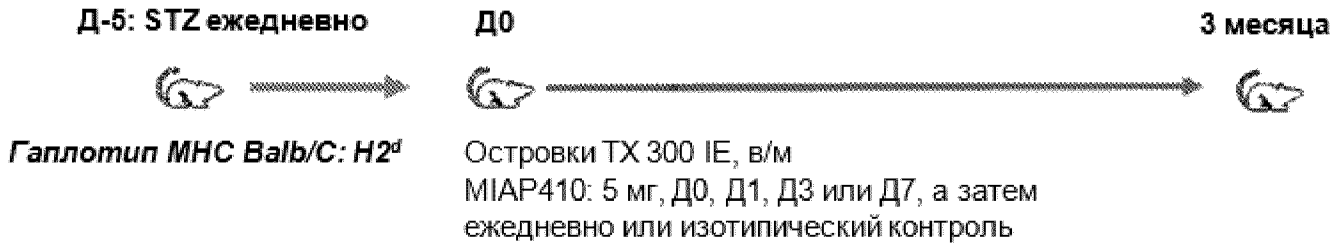
Фиг. 35A


первичные островки дт
+ анти-CD47
нормализованный клеточный индекс
часы
b2m KO островки
+ анти-CD47
Нормализованный клеточный индекс
часы
HIP островки
+ анти-CD47
нормализованный клеточный индекс
часы
Нормализованный клеточный индекс
часы

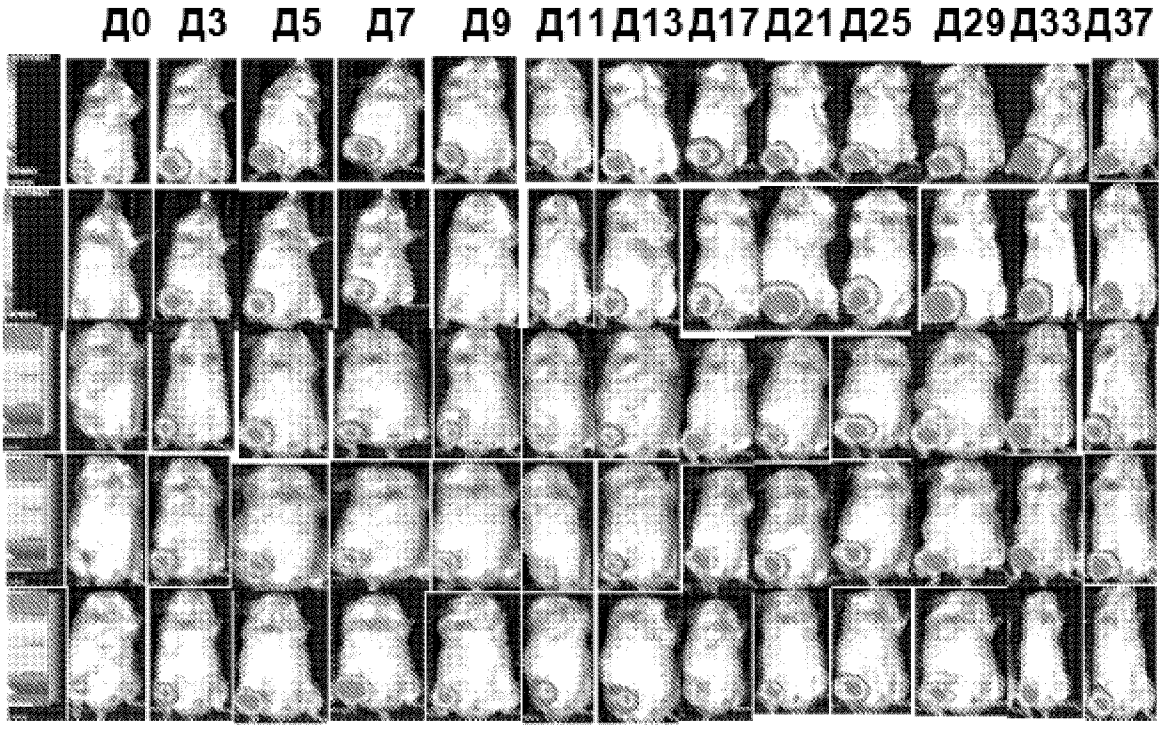
Фиг. 35B


+ анти-CD47
нормализованный клеточный индекс
Нормализованный клеточный индекс
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
10
20
30
40
50
часы

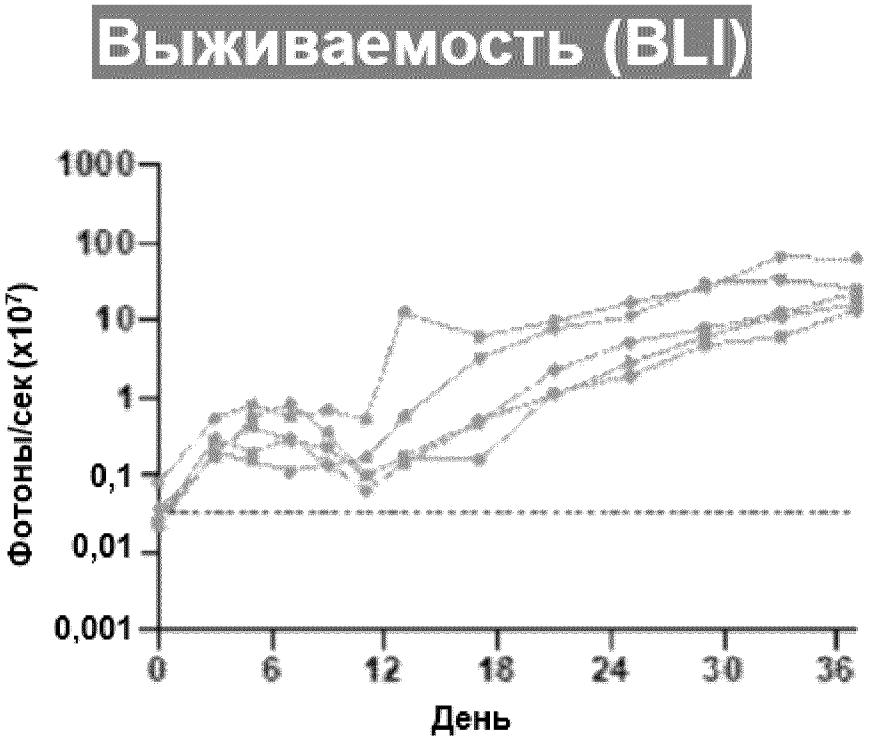
Фиг. 36


Д-5: STZ ежедневно
Д0
3 месяца
Гаплотип MHC Balb/C: H2d
Островки ТХ 300 IE, в/м
MIAP410: 5 мг, Д0, Д1, Д3 или Д7, а затем ежедневно или изотипический контроль

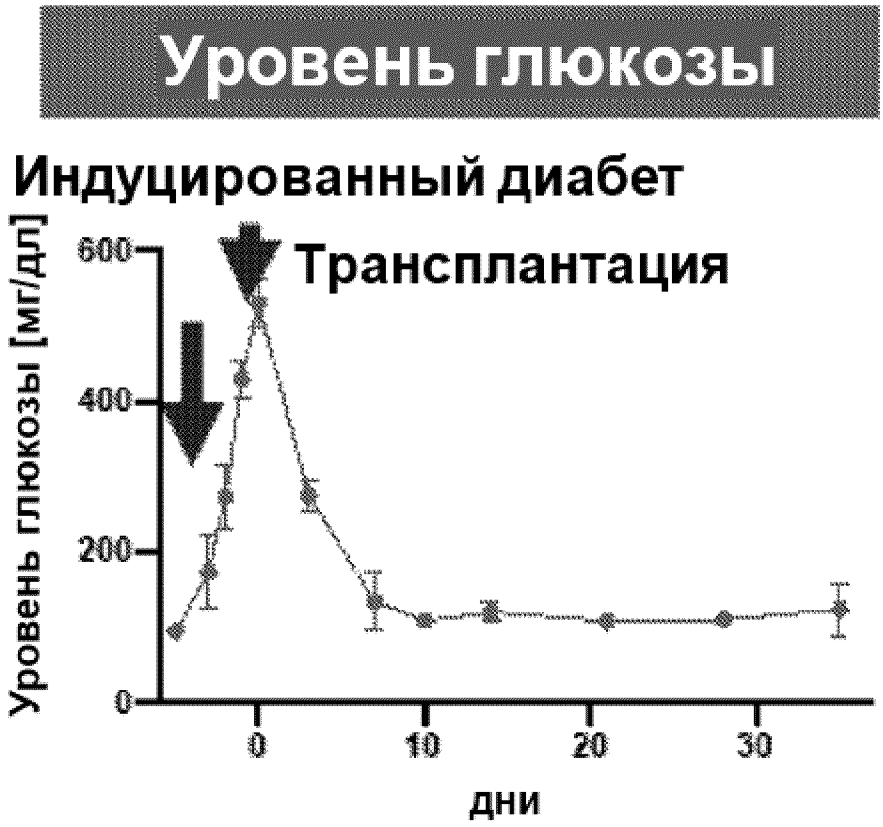
Фиг. 37A



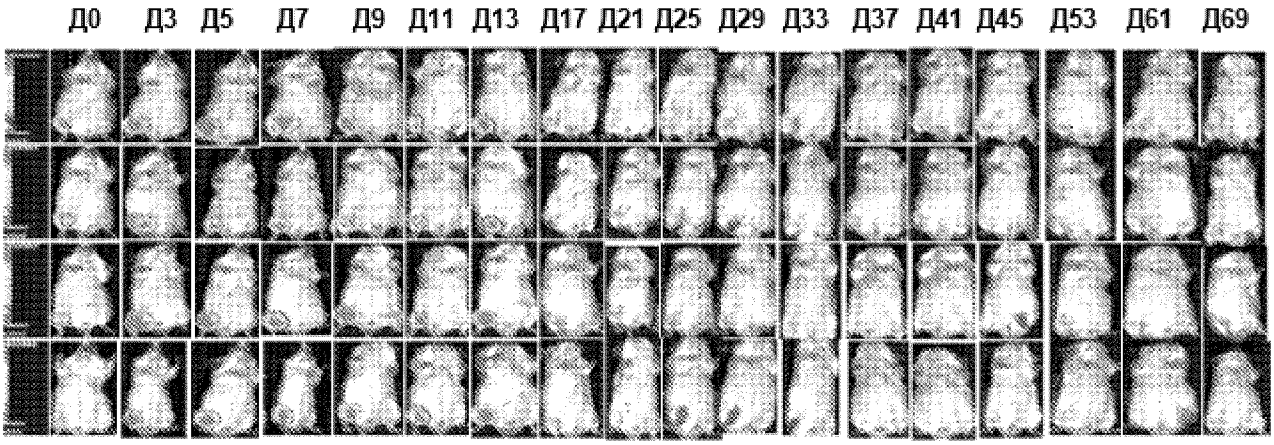
Фиг. 37B



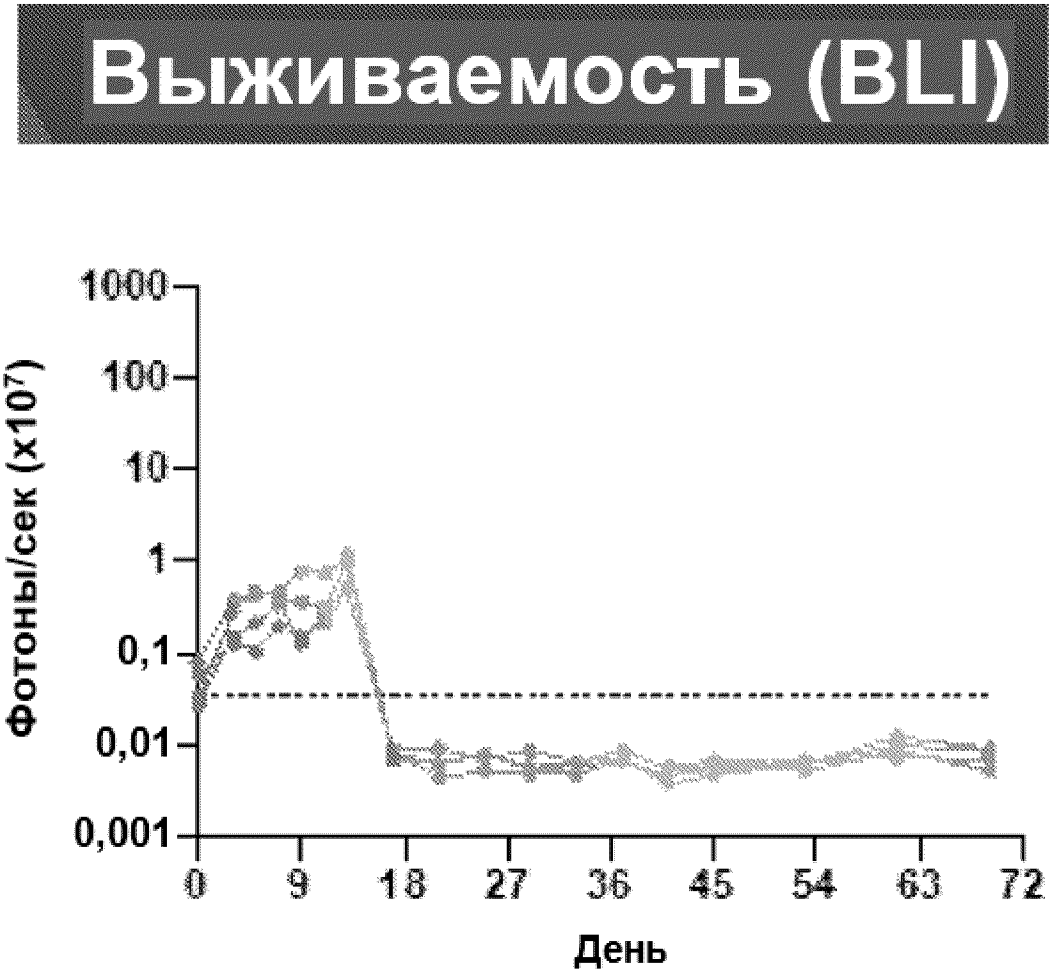
Фиг. 37C


Уровень глюкозы
Индуцированный диабет
Трансплантация
Уровень глюкозы [мг/дл]
600
400
200
0
0
10
20
30
дни

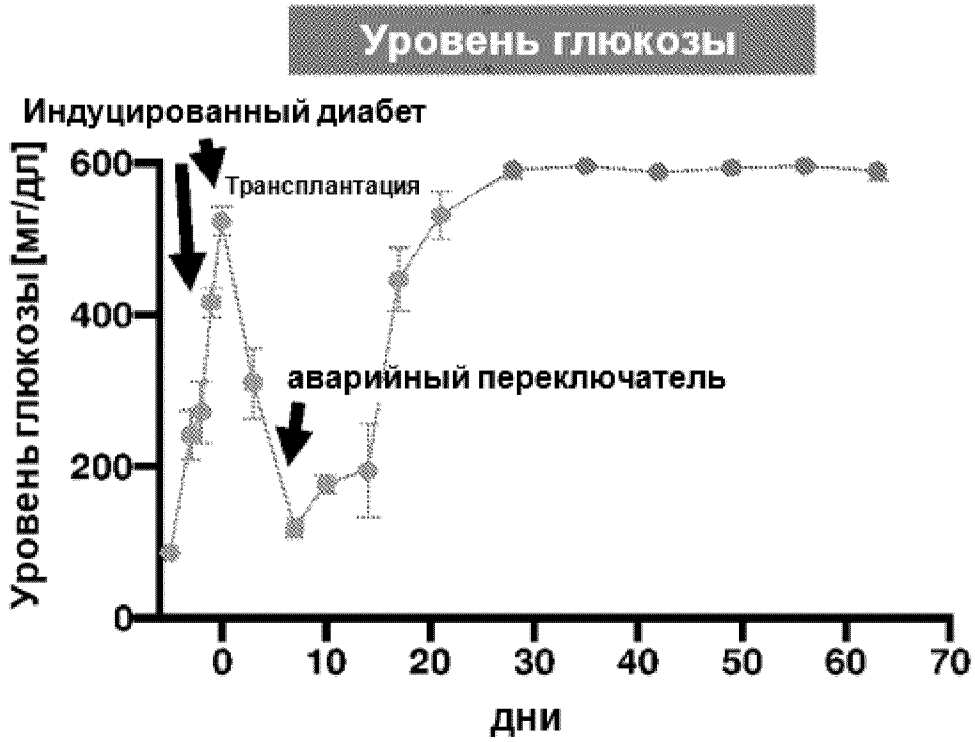
Фиг. 38A



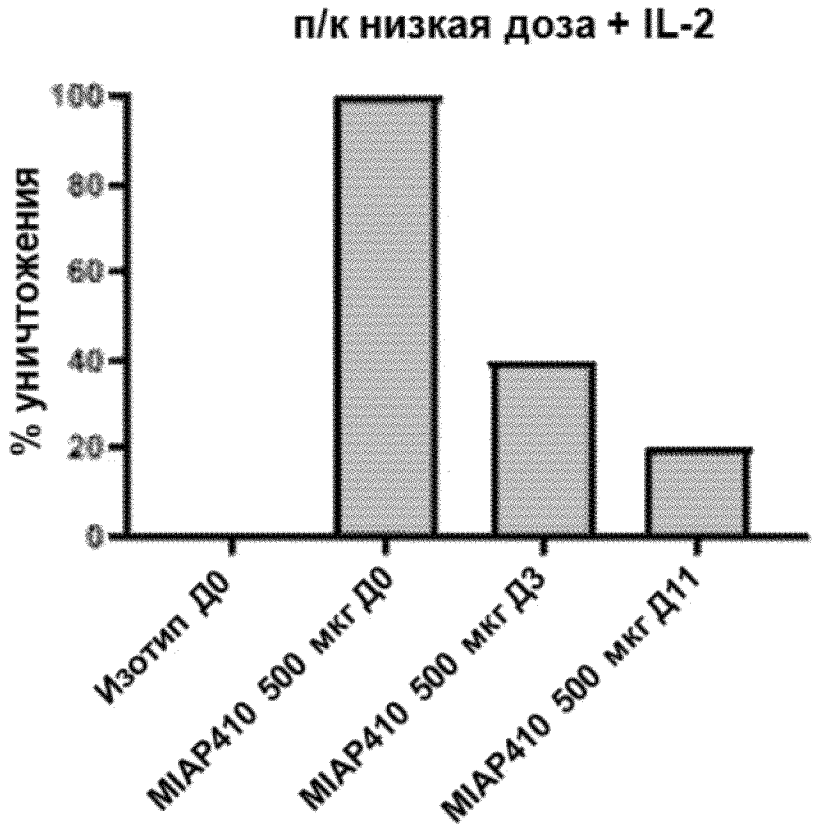
Фиг. 38B



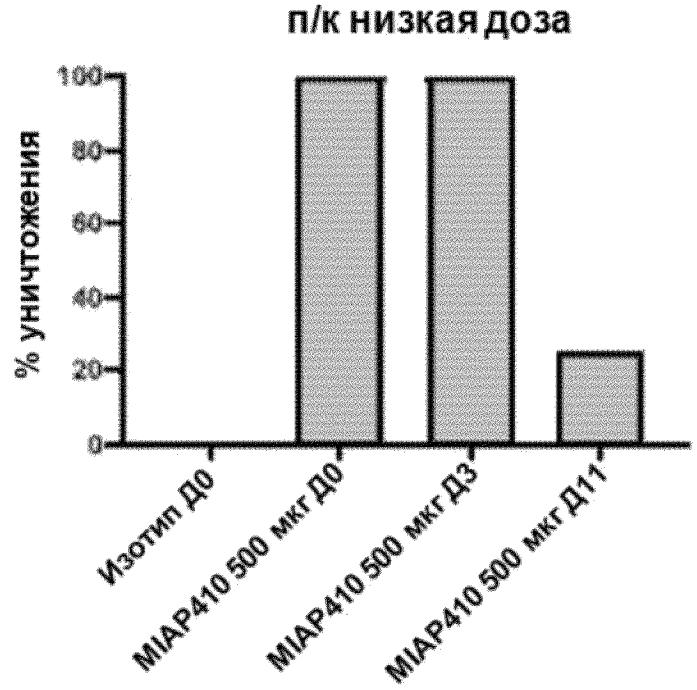
Фиг. 38C


Уровень глюкозы
Индуцированный диабет
Уровень глюкозы [мг/дл]
600
400
200
0
Трансплантация
аварийный переключатель
0
10
20
30
40
50
60
70
дни

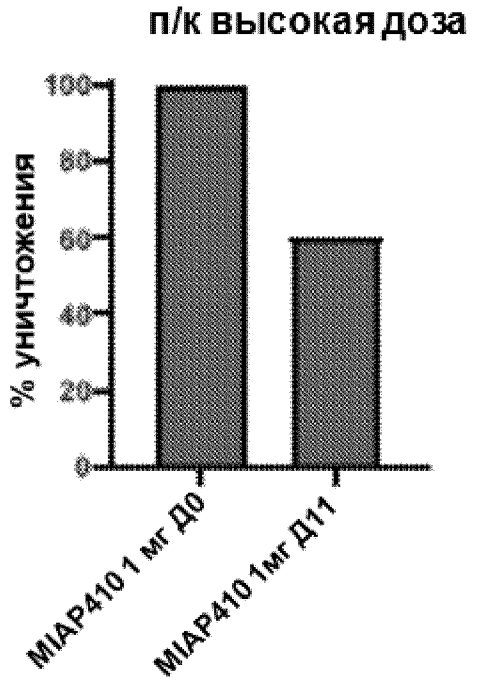
Фиг. 39A



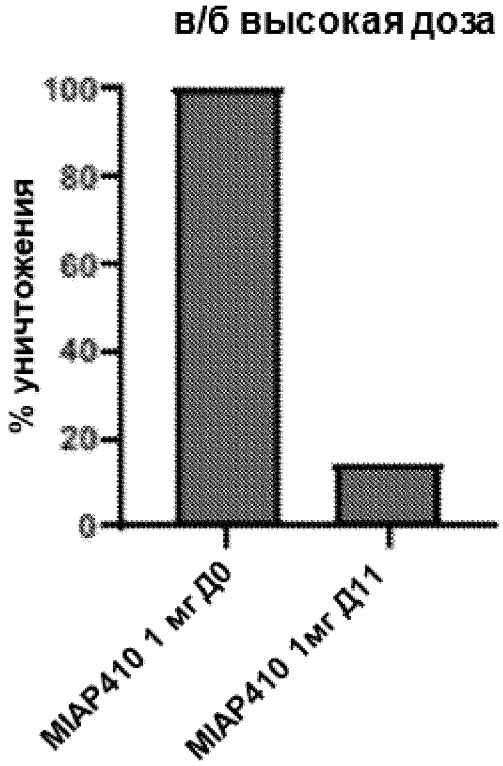
Фиг. 39B



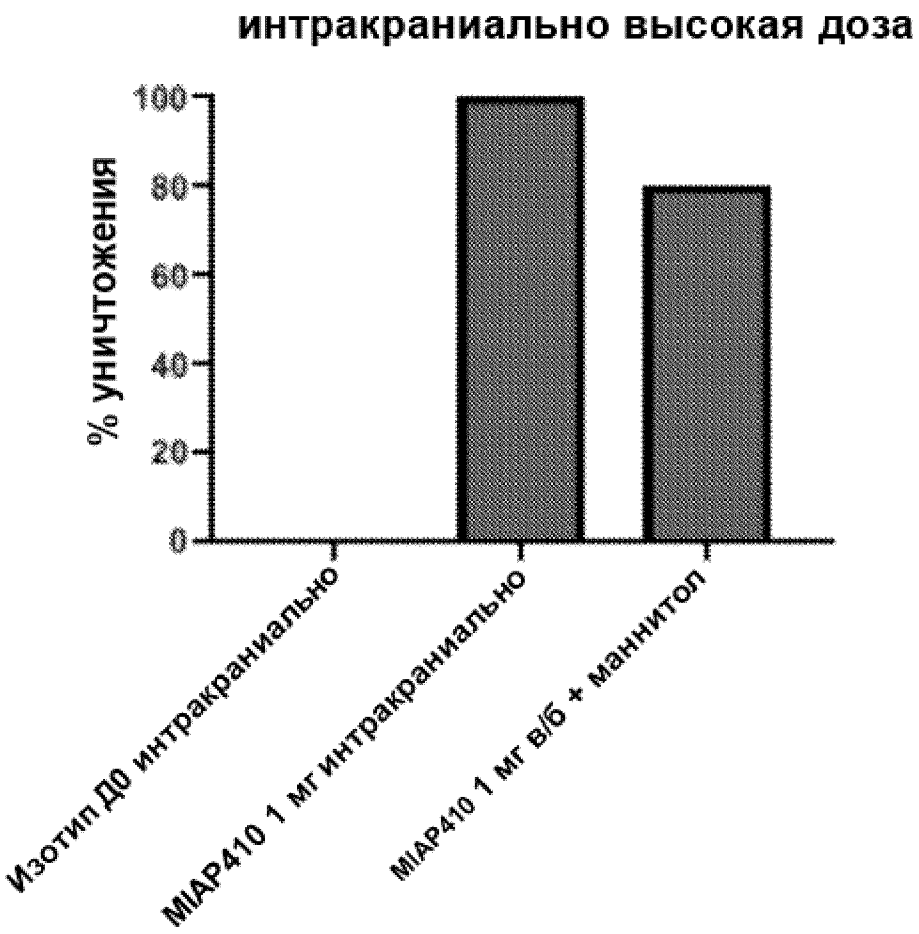
Фиг. 40A



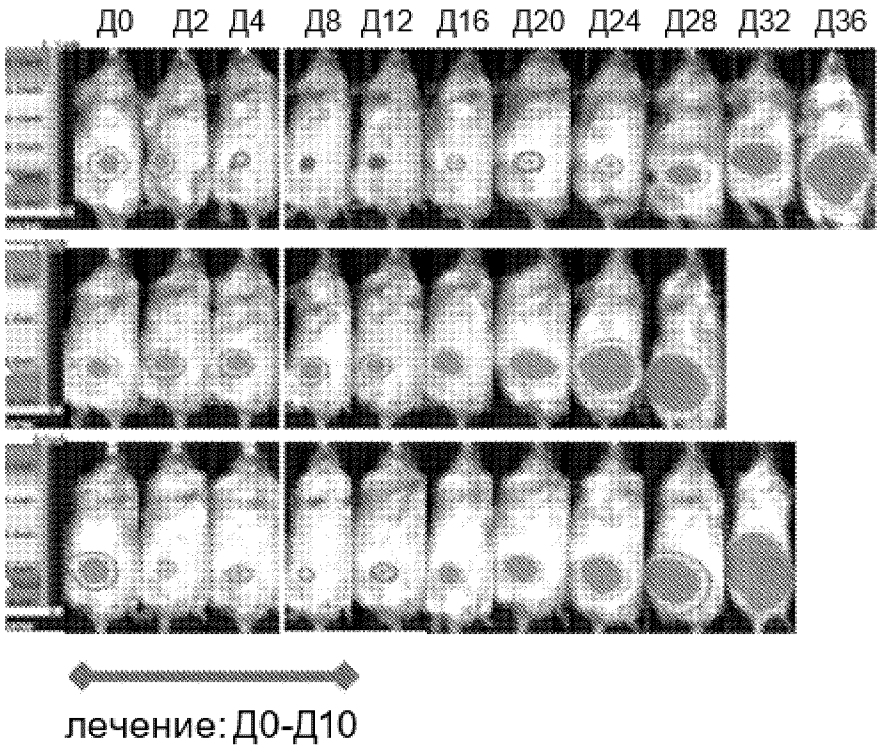
Фиг. 40B



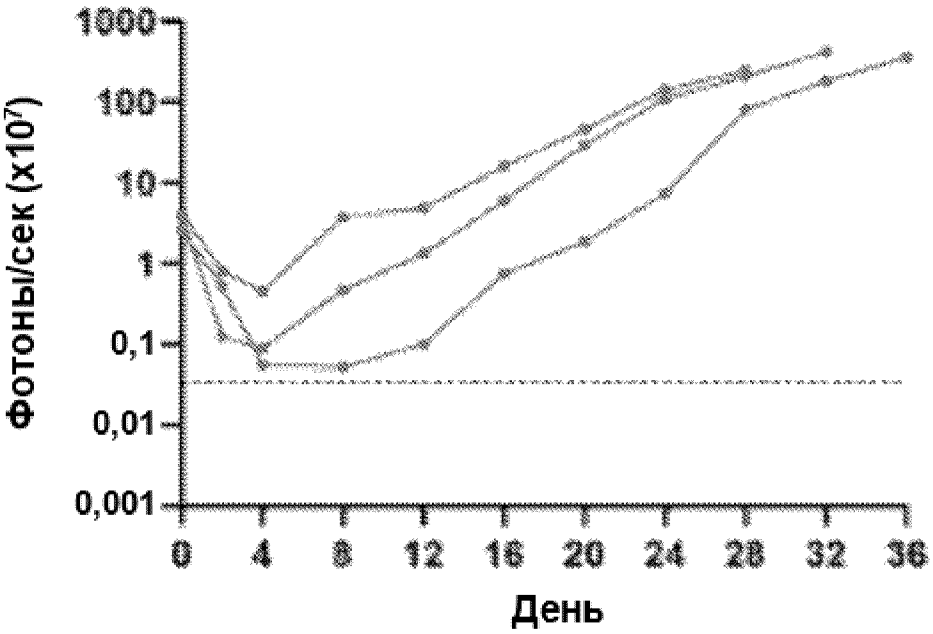
Фиг. 41


интракраниально высокая доза
% уничтожения
100
80
60
40
20
0
Изотип Д0 интракраниально
MIAP410 1 мг интракраниально
MIAP410 1 мг в/б + маннитол

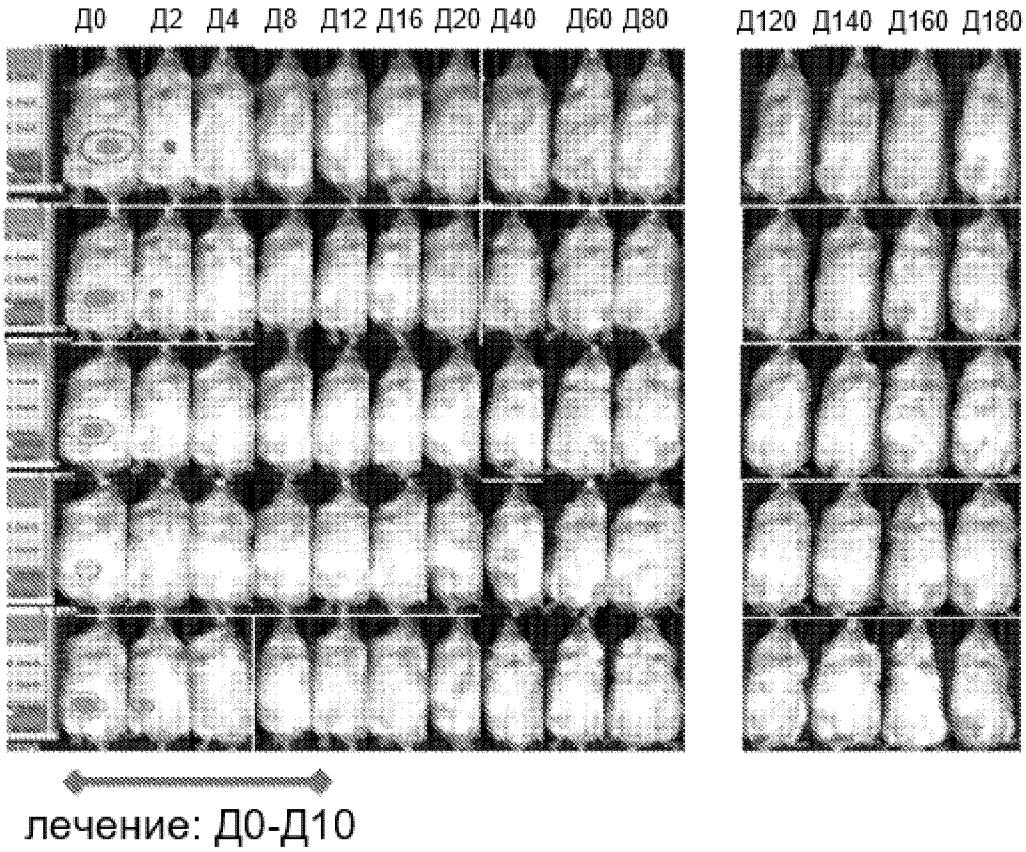
Фиг. 42A



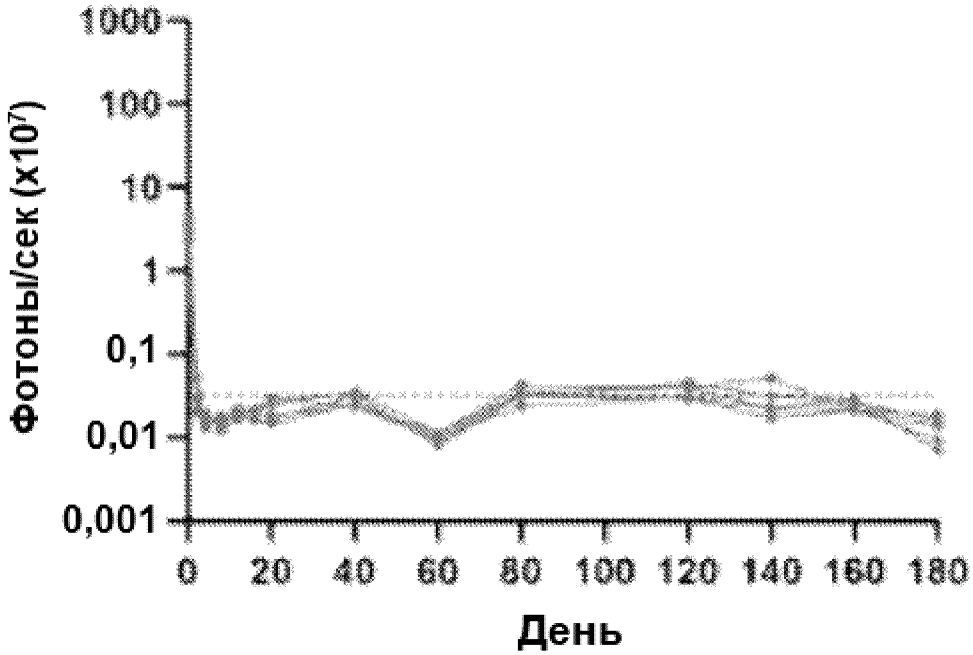
Фиг. 42B



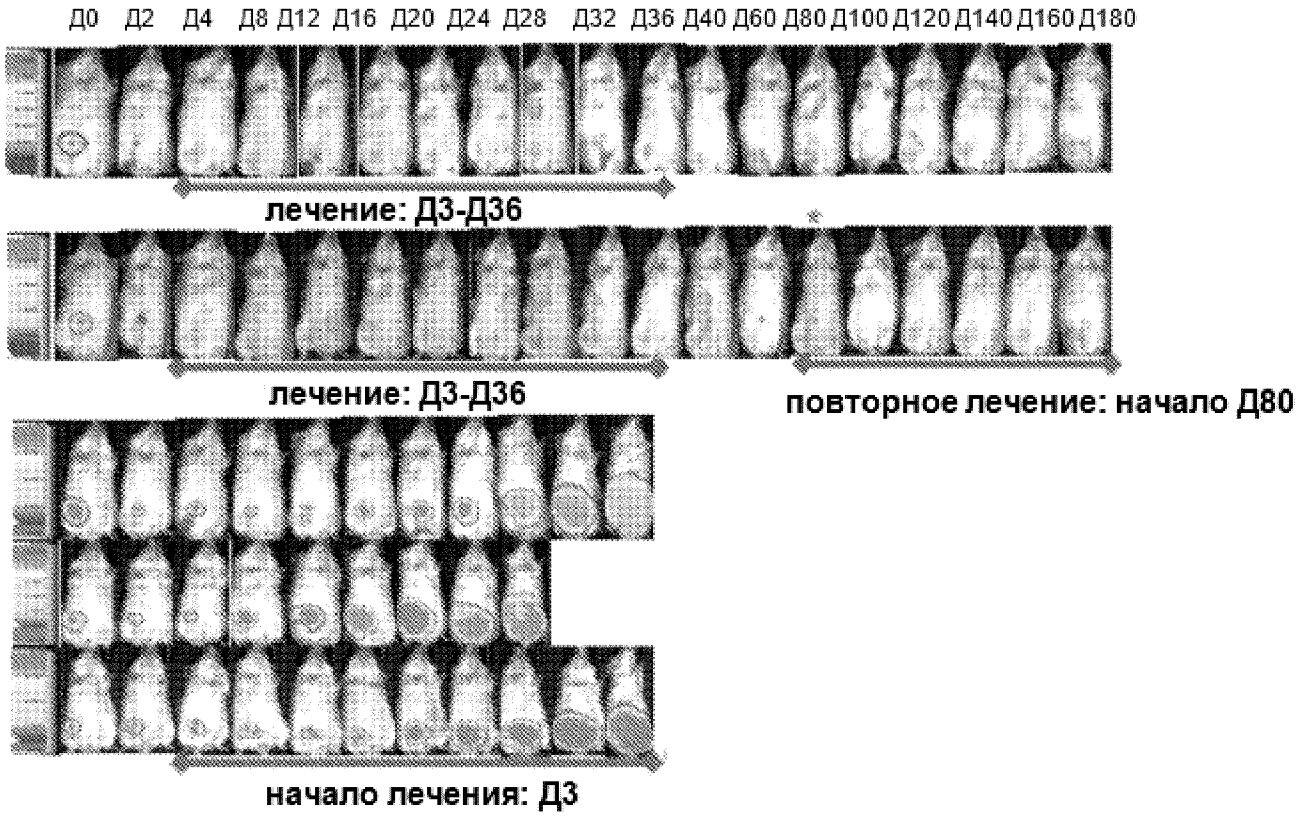
Фиг. 43A



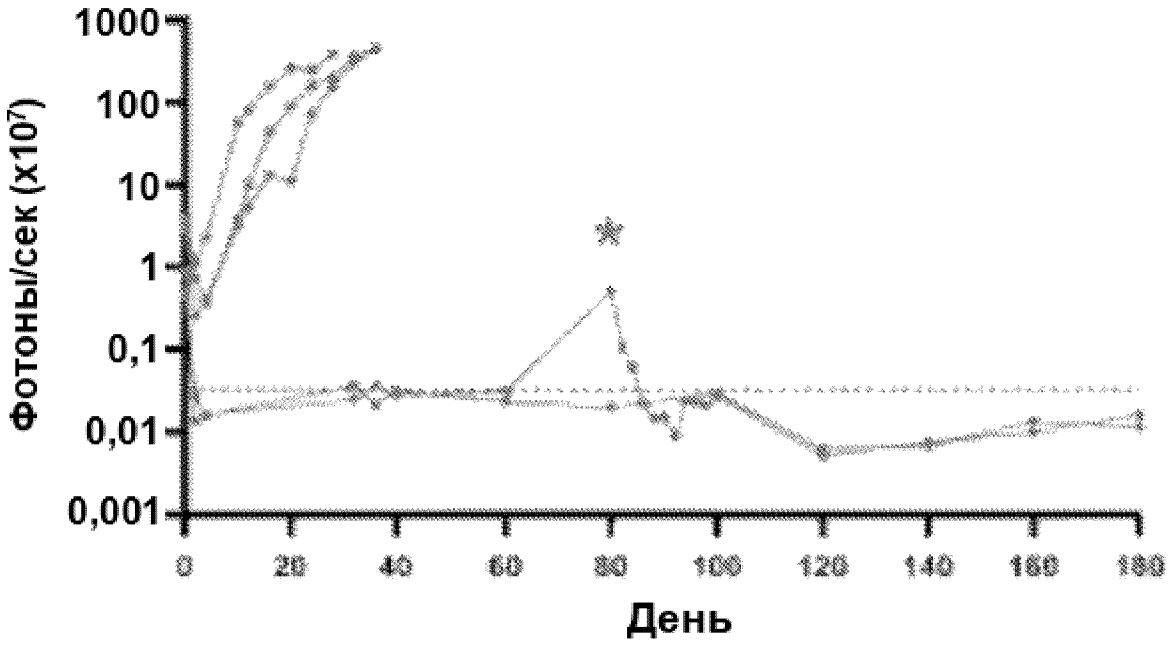
Фиг. 43B



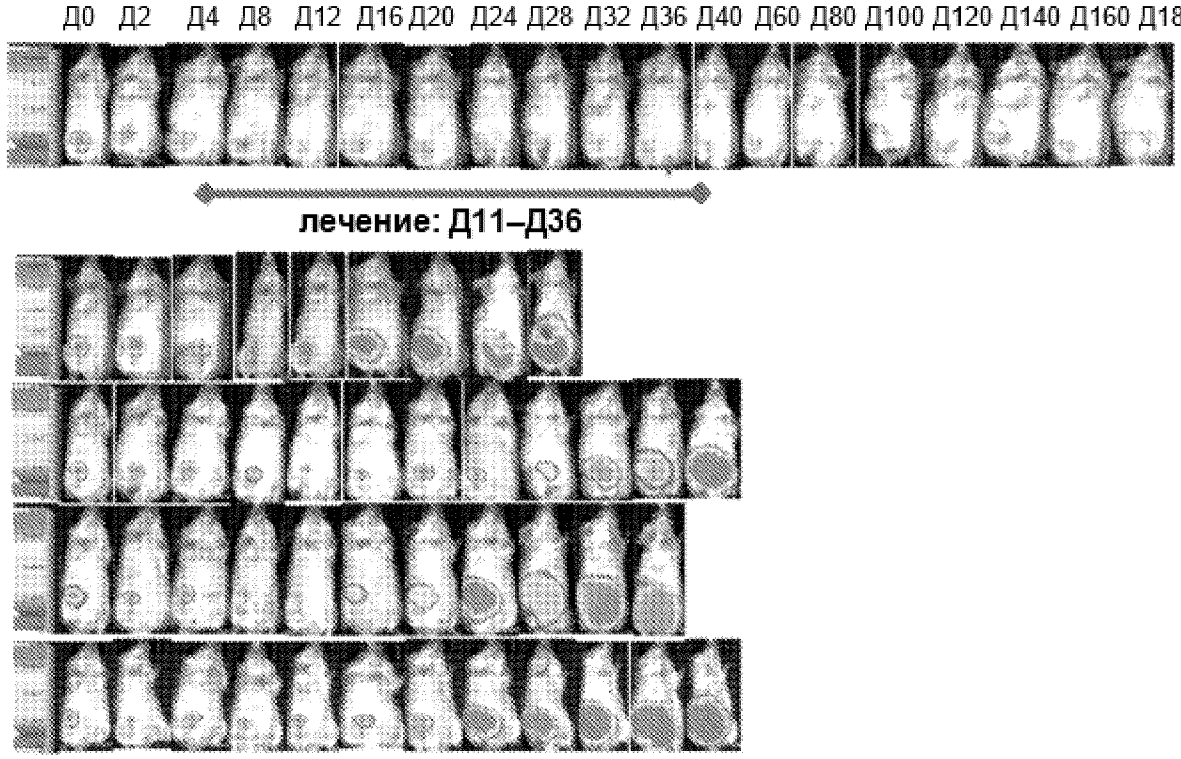
Фиг. 44A



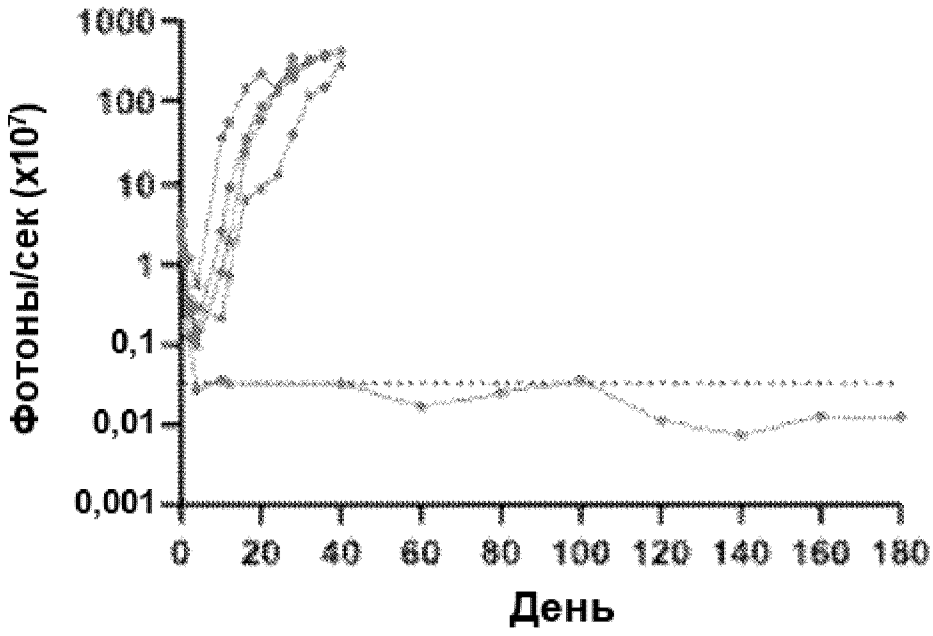
Фиг. 44B



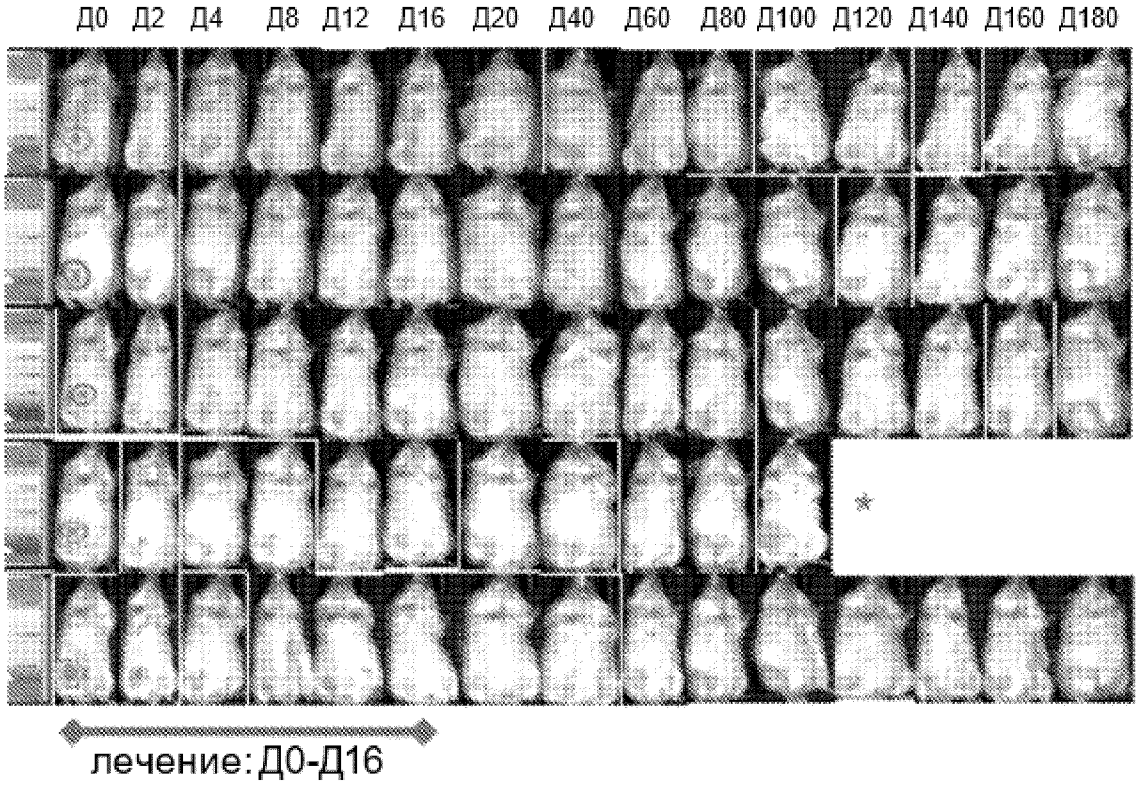
Фиг. 45A



Фиг. 45B

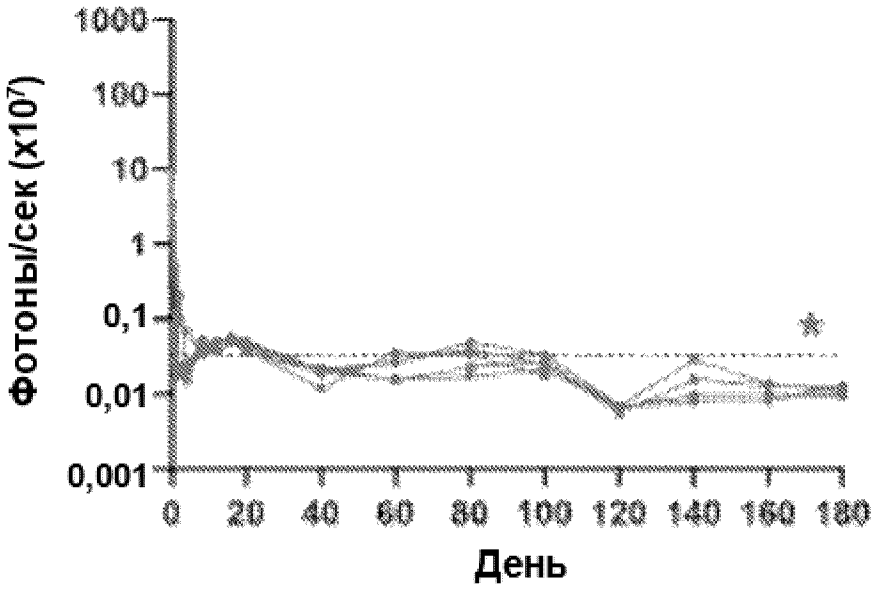


Фиг. 46A

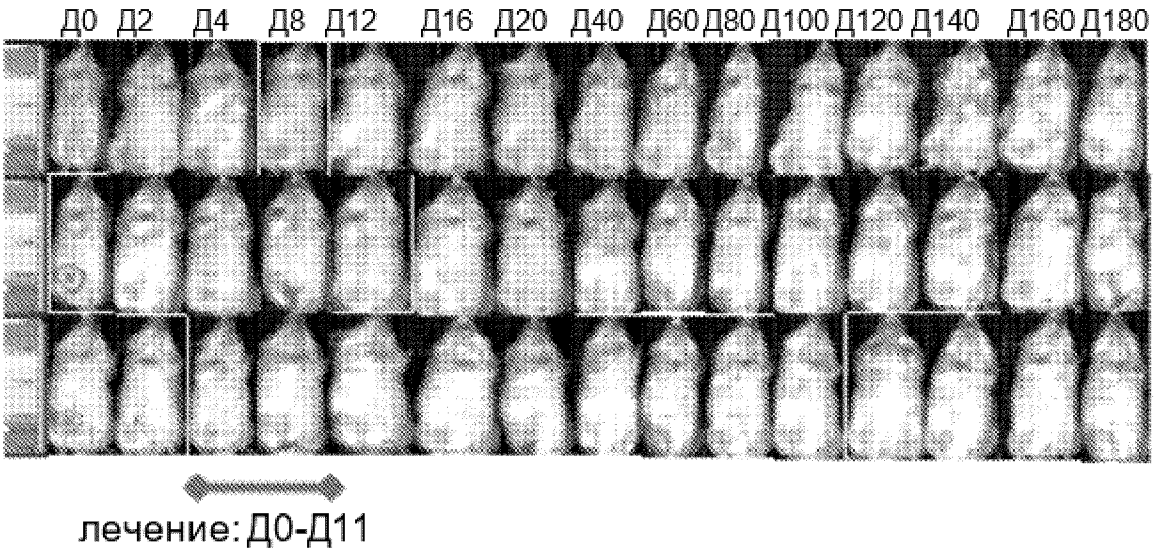


* у животных развилась тератома, которая была luc-

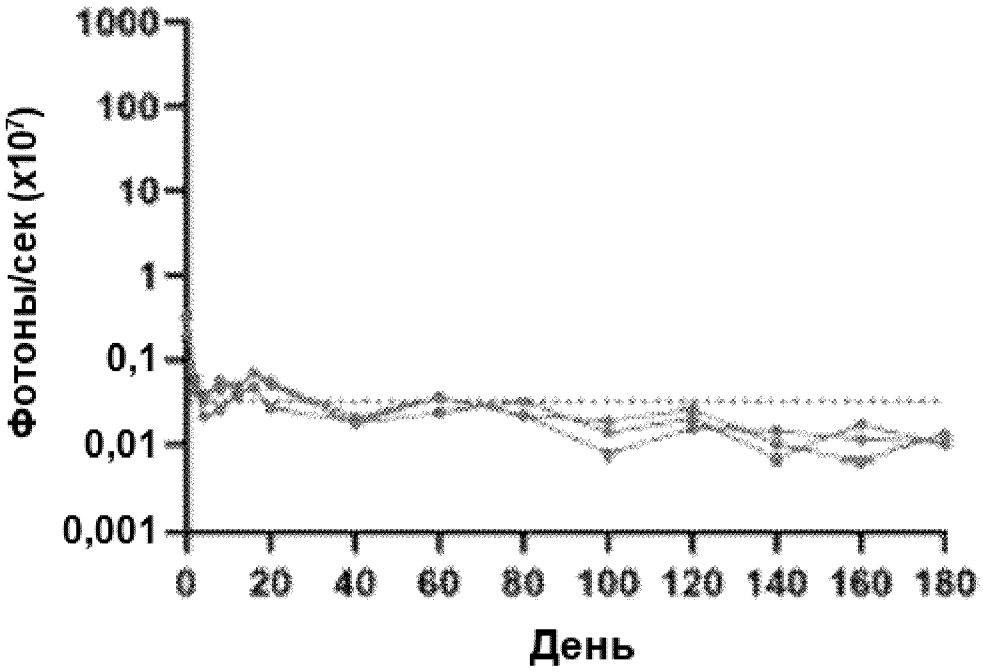
Фиг. 46B



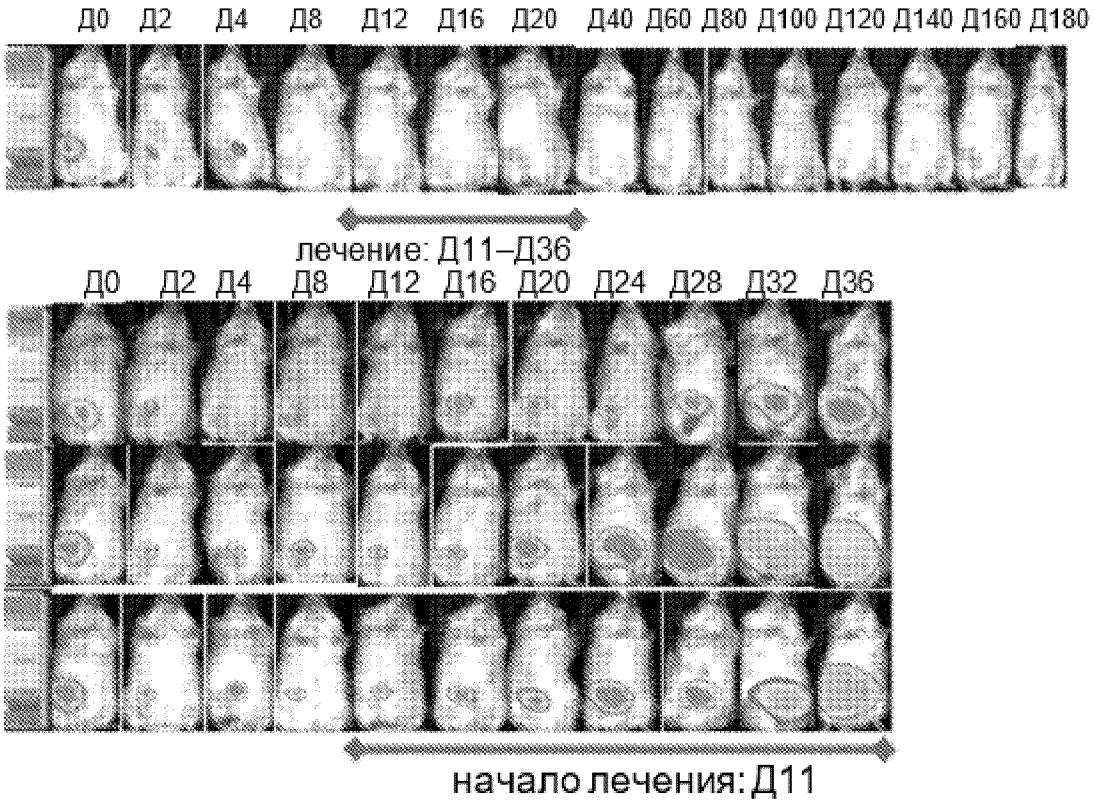
Фиг. 47A



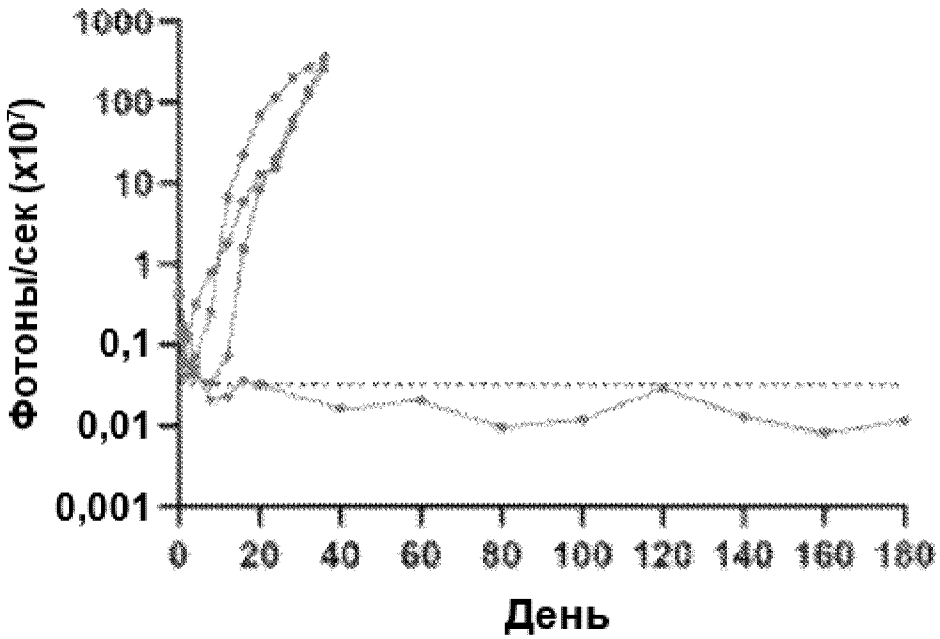
Фиг. 47B



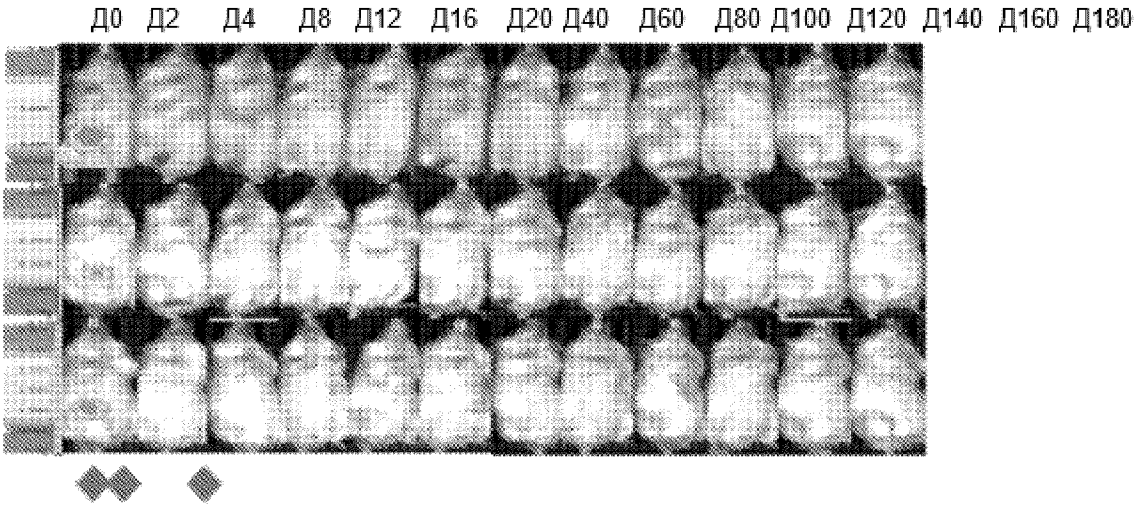
Фиг. 48A



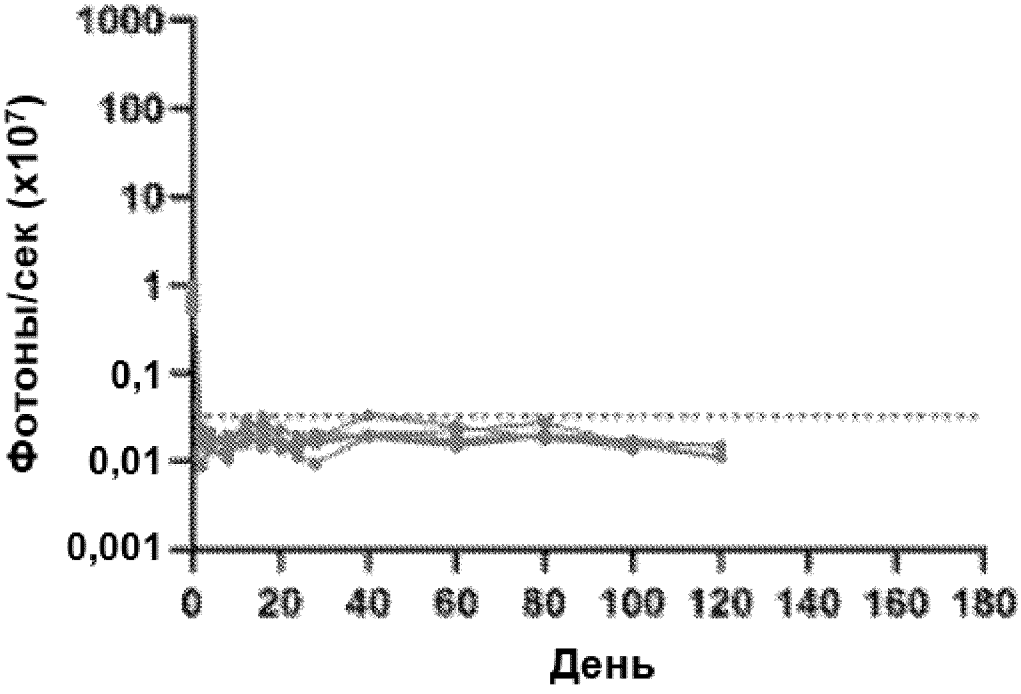
Фиг. 48B



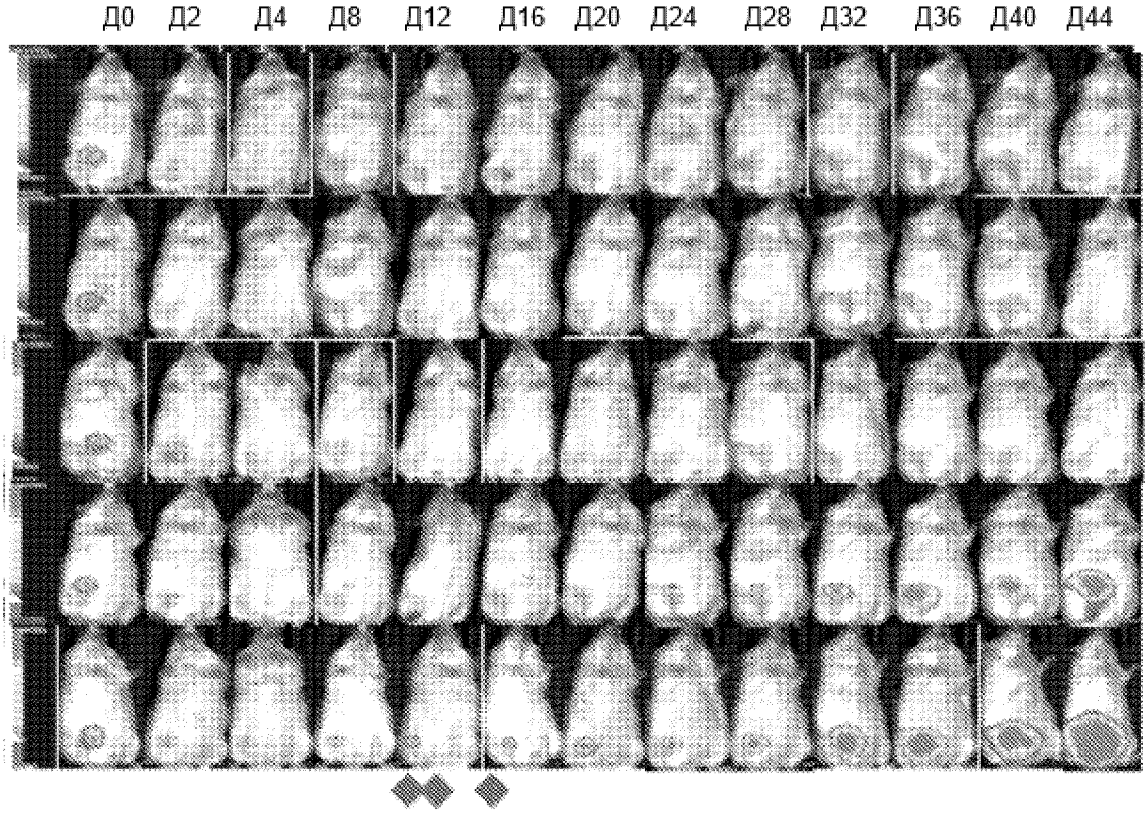
Фиг. 49A



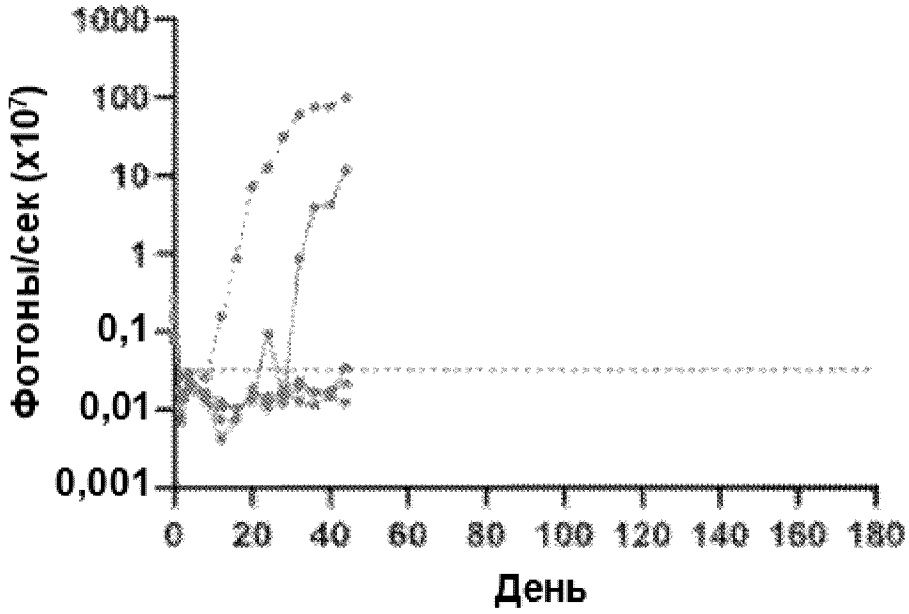
Фиг. 49B



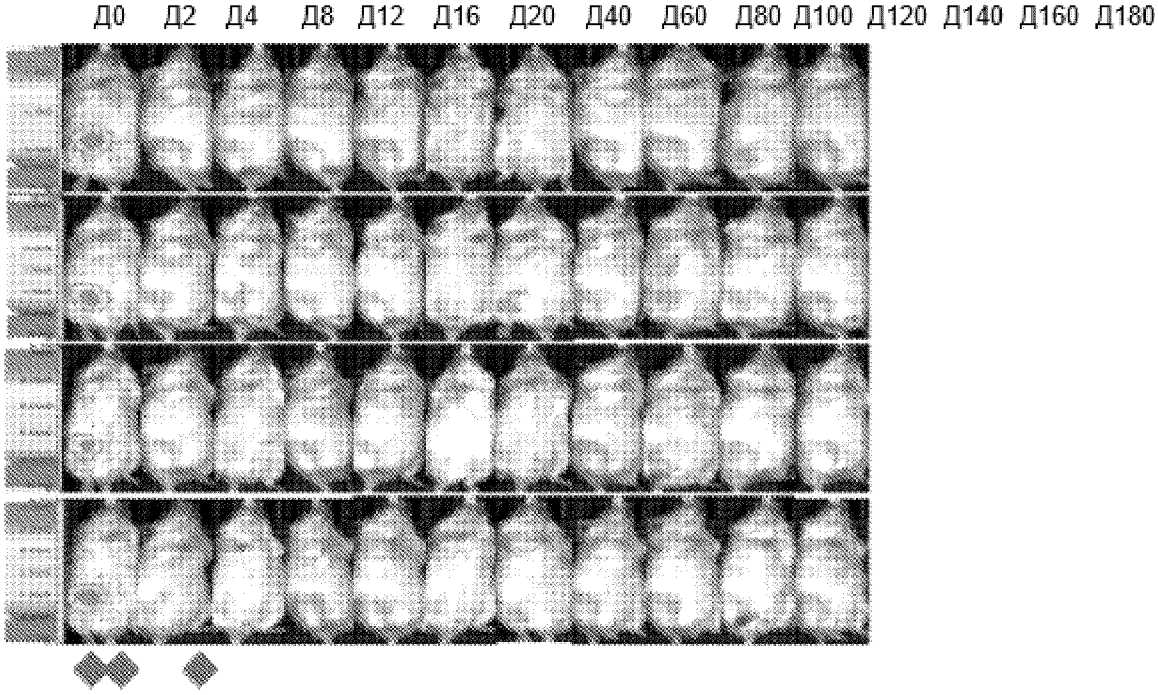
Фиг. 50A



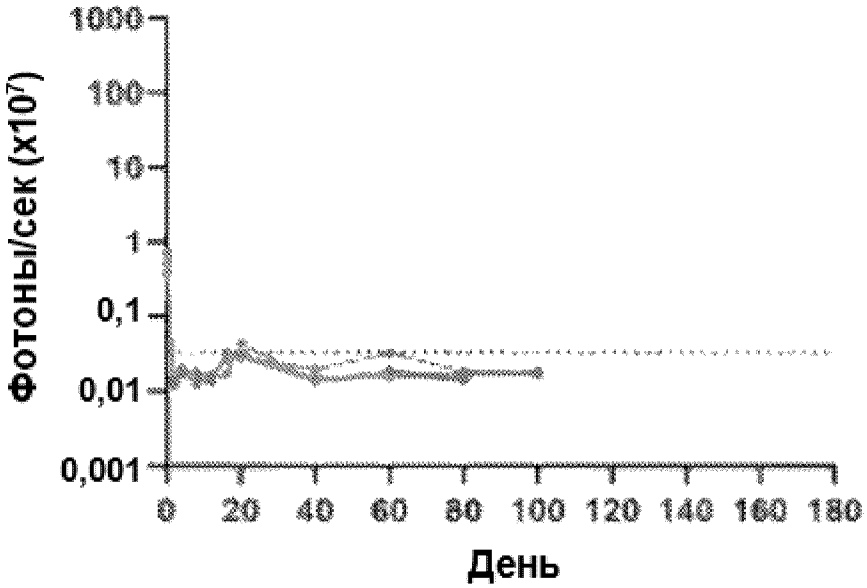
Фиг. 50B



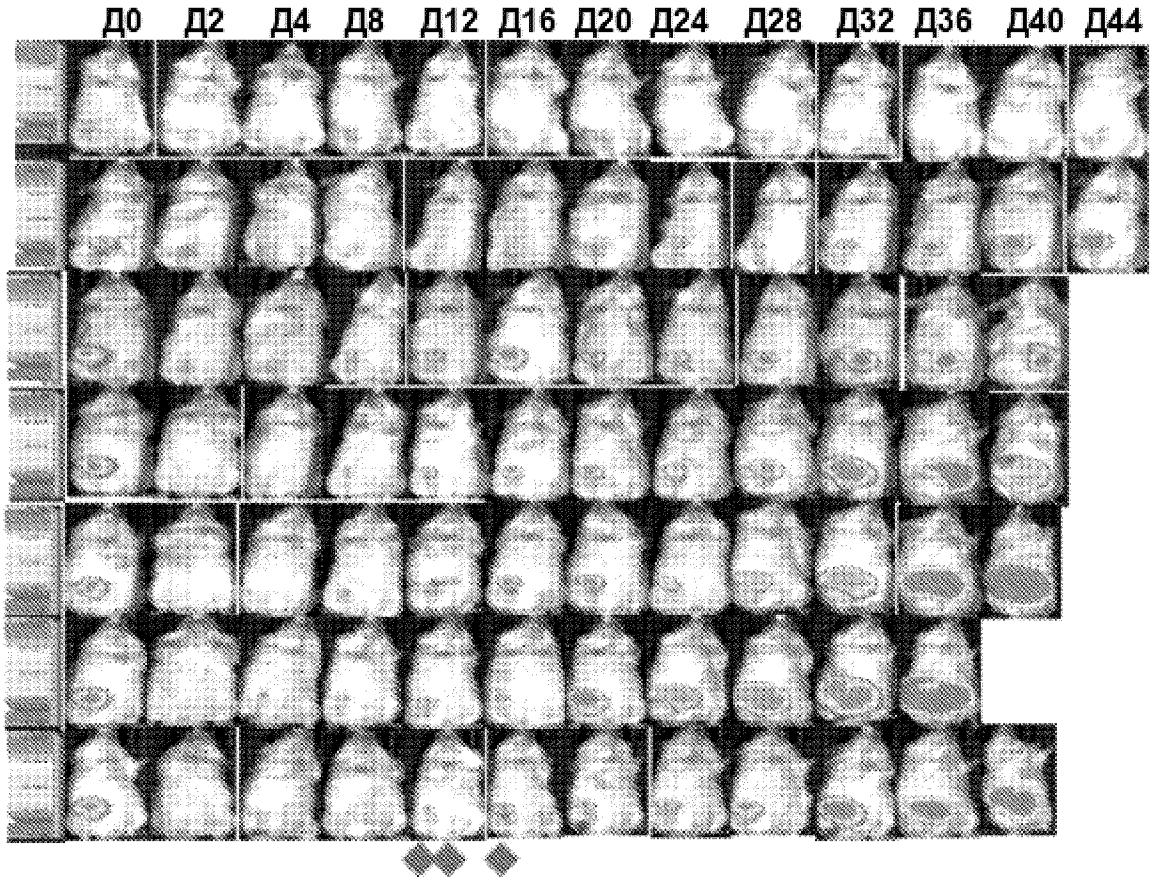
Фиг. 51A



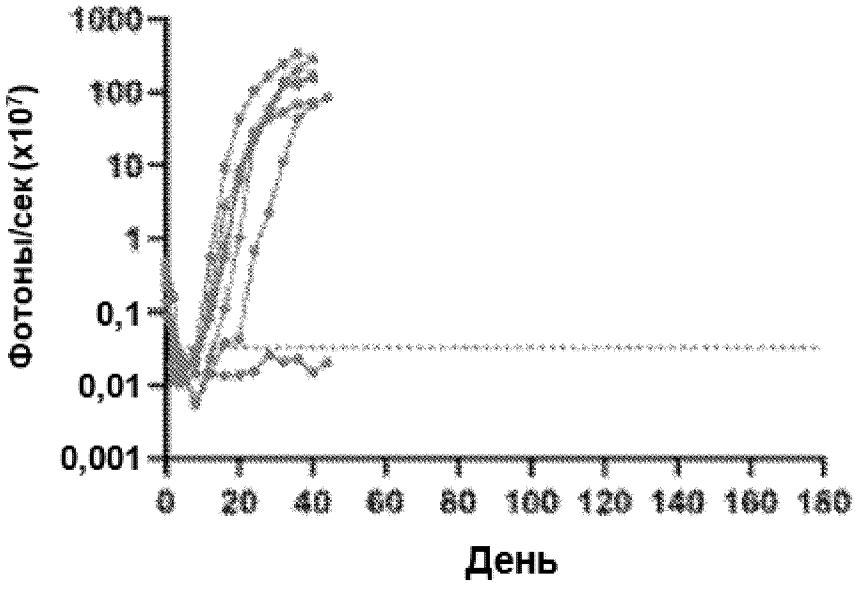
Фиг. 51B



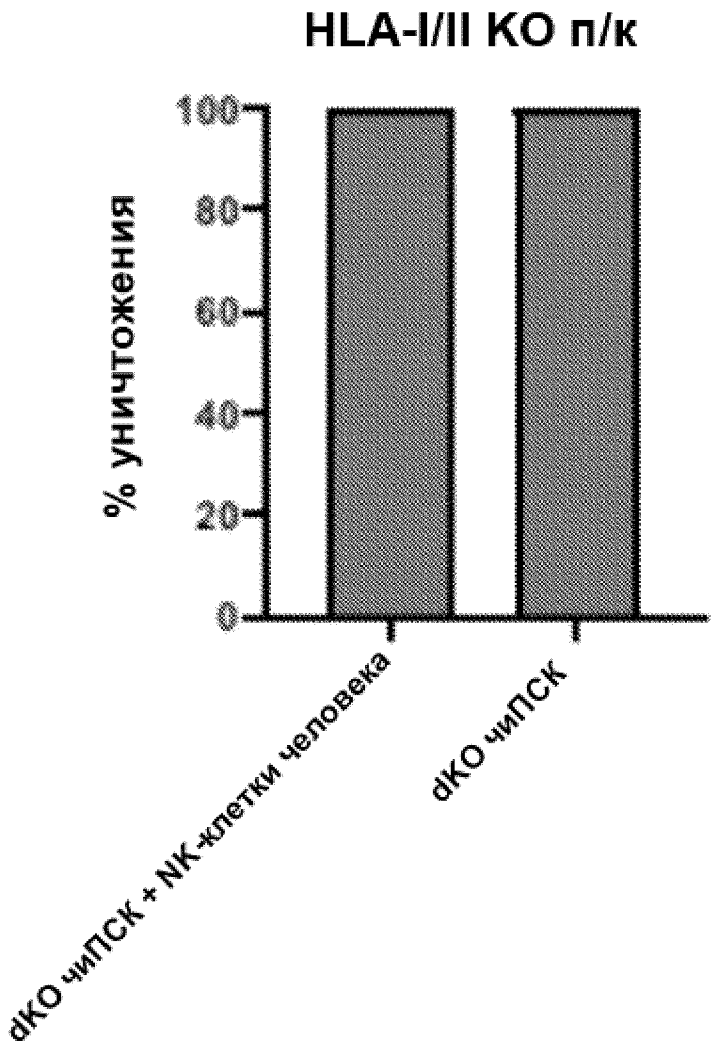
Фиг. 52A



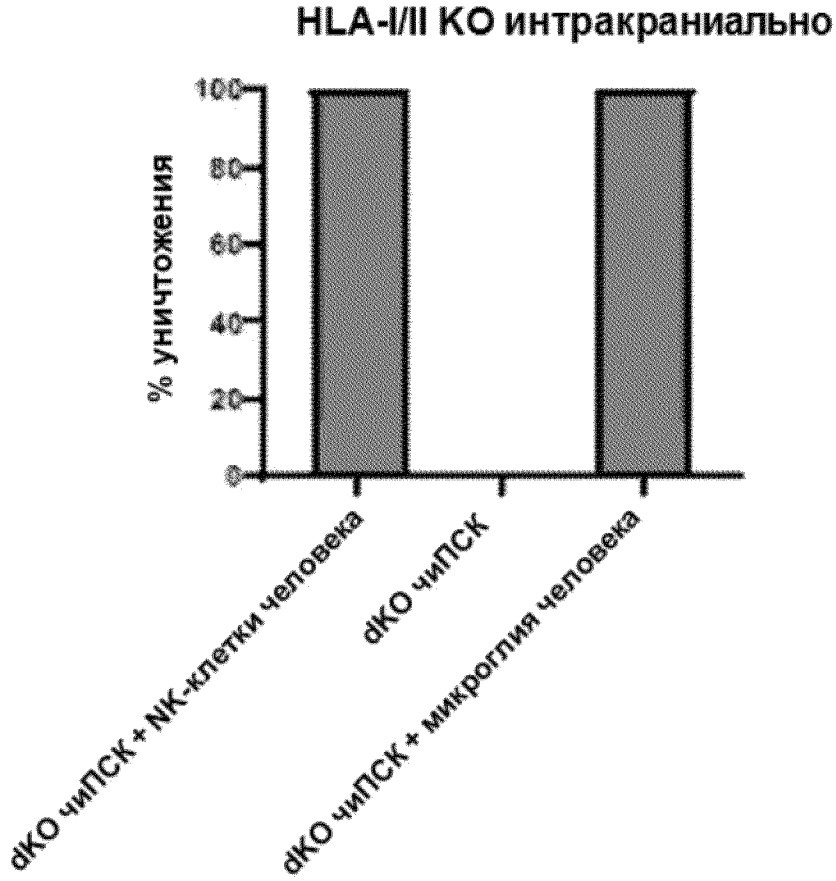
Фиг. 52B



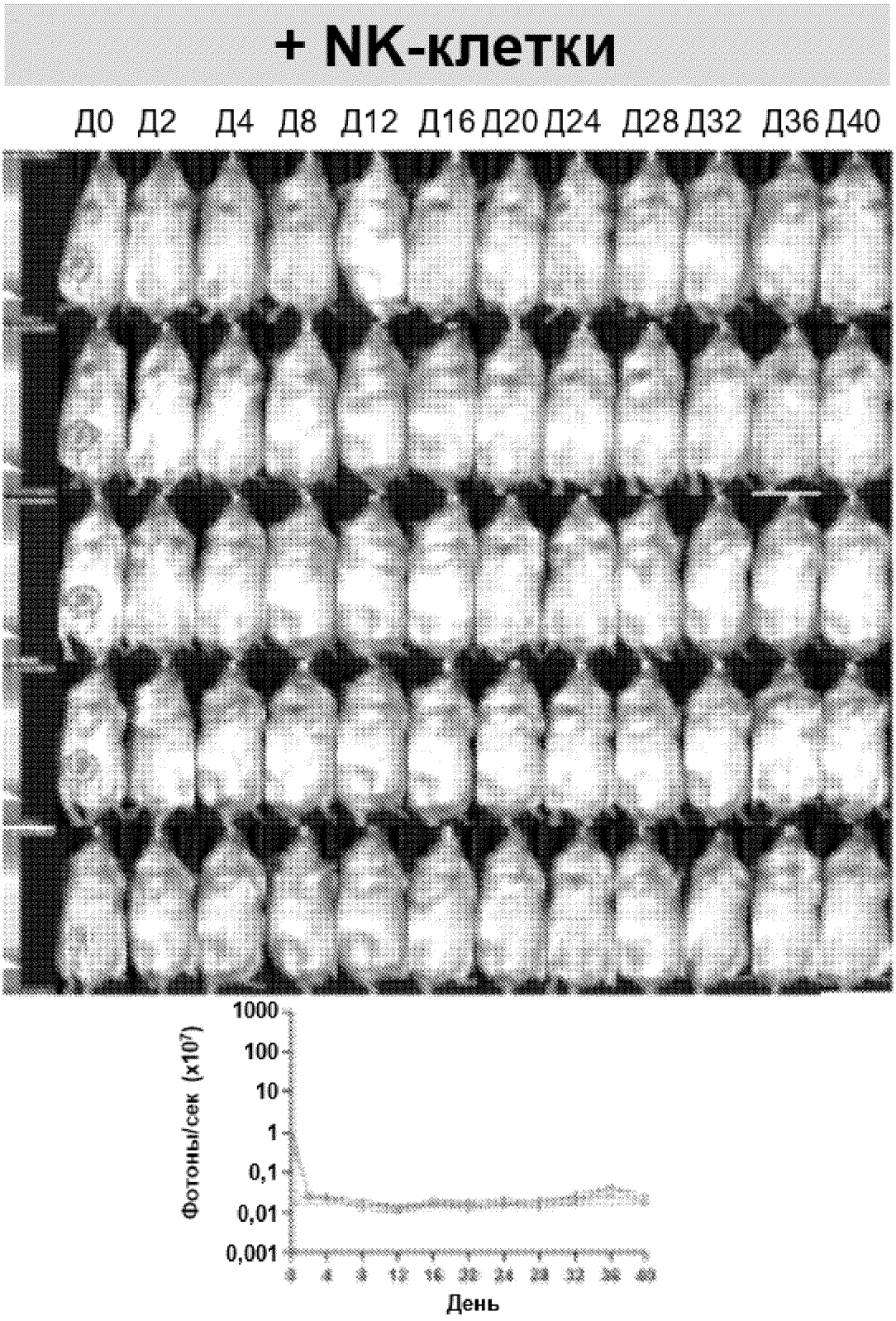
Фиг. 53


HLA-I/II KO п/к
% уничтожения
100
80
60
40
20
0
dKO чиПСК + NK-клетки человека
dKO чиПСК

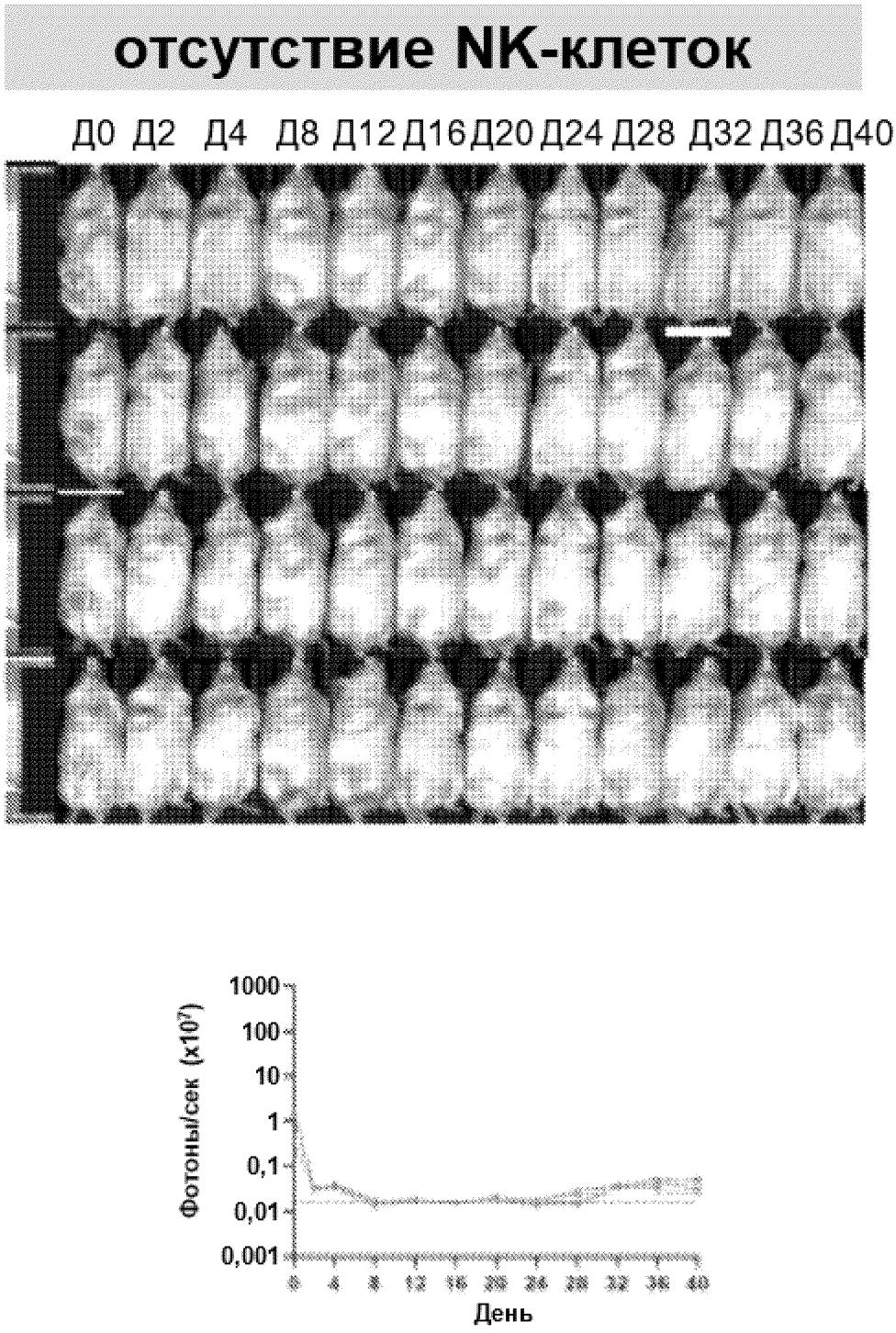
Фиг. 54


HLA-I/II KO интракраниально
% уничтожения
100
80
60
40
20
0
dKO чиПСК + NK-клетки человека
dKO чиПСК
dKO чиПСК + микроглия человека

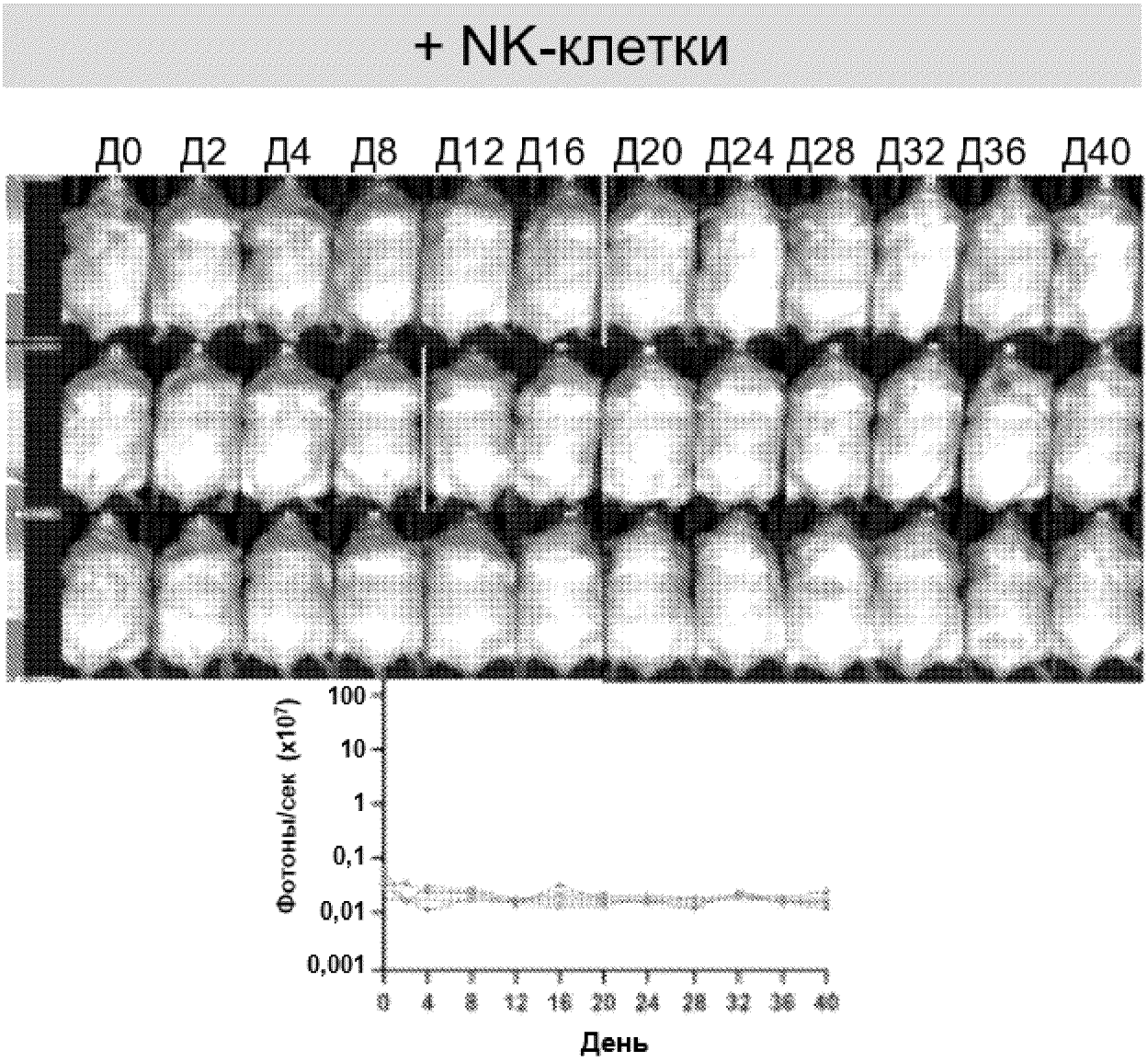
Фиг. 55A


+ NK-клетки
Д0 Д2 Д4 Д8 Д12 Д16 Д20 Д24 Д28 Д32 Д36 Д40
Фотоны/сек (x10⁷)
1000
100
10
1
0,1
0,01
0,001
День

Фиг. 55B

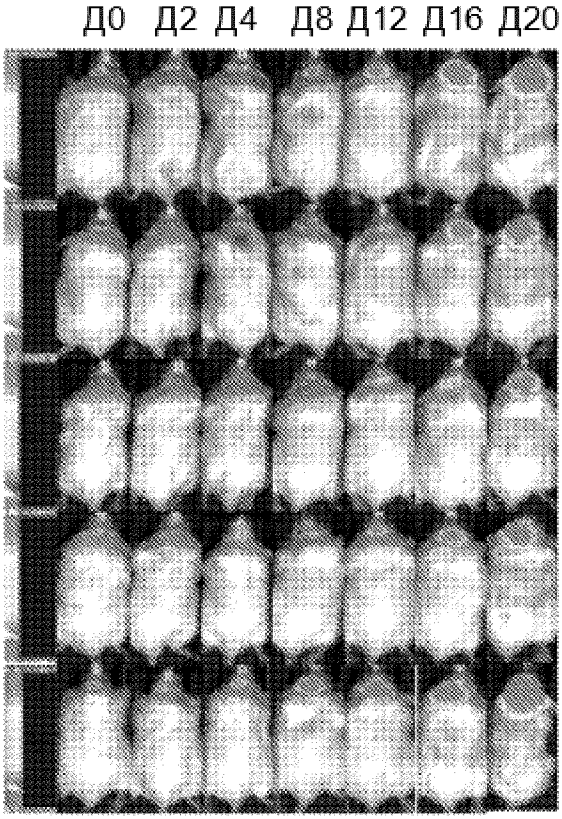

отсутствие NK-клеток
Д0 Д2 Д4 Д8 Д12 Д16 Д20 Д24 Д28 Д32 Д36 Д40
1000
100
10
1
0,1
0,01
0,001
Фотоны/сек (x10⁷)
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40
День

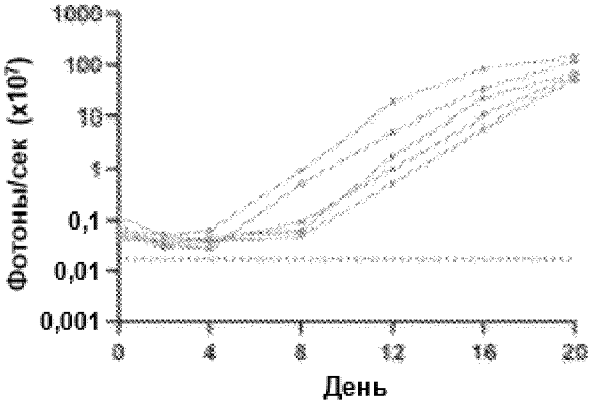
Фиг. 56A


+ NK-клетки
Д0 Д2 Д4 Д8 Д12 Д16 Д20 Д24 Д28 Д32 Д36 Д40
Фотоны/сек (x10⁷)
100
10
1
0,1
0,01
0,001
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40
День

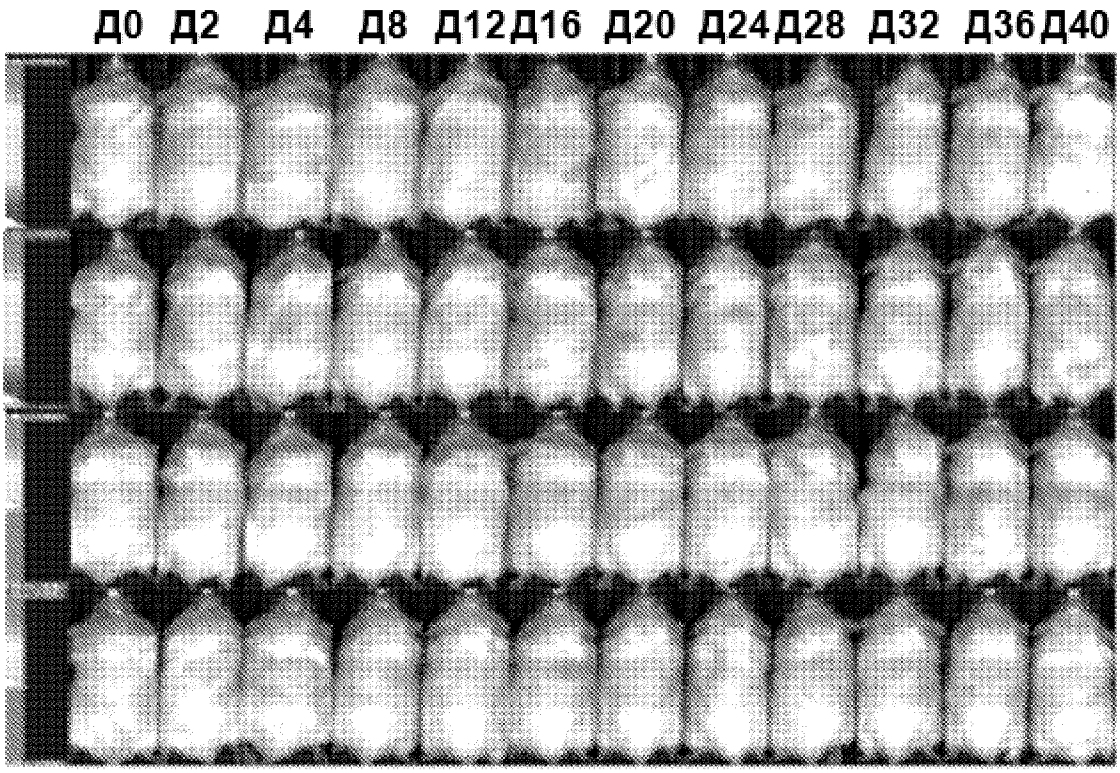
Фиг. 56B

отсутствие NK-клеток

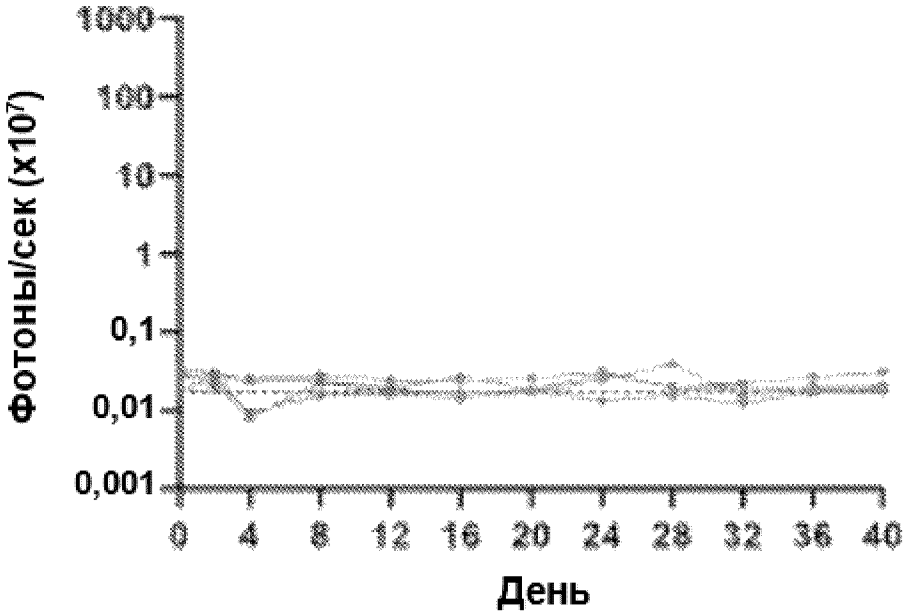




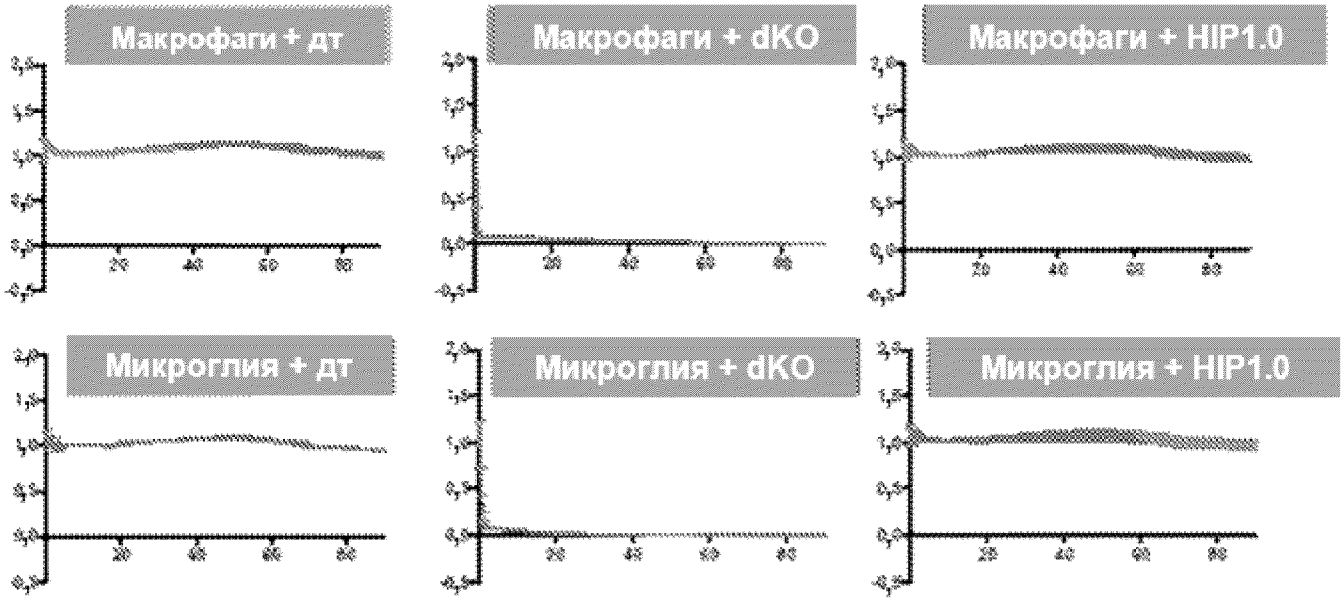
Фиг. 57A



Фиг. 57B

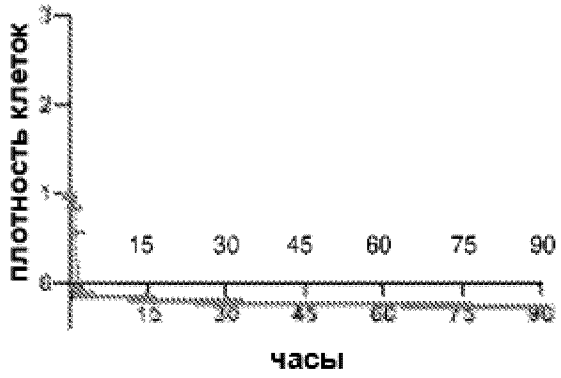


Фиг. 58

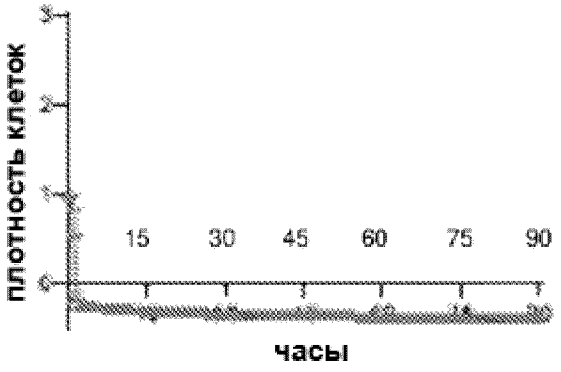

Макрофаги + дт
Макрофаги + dKO
Макрофаги + HIP1.0
Микроглия + дт
Микроглия + dKO
Микроглия + HIP1.0

Фиг. 59

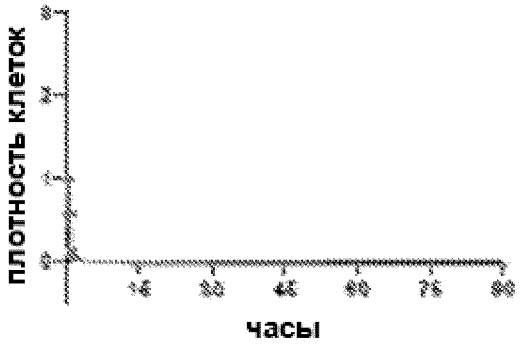
Макрофаги человека + dKO человека



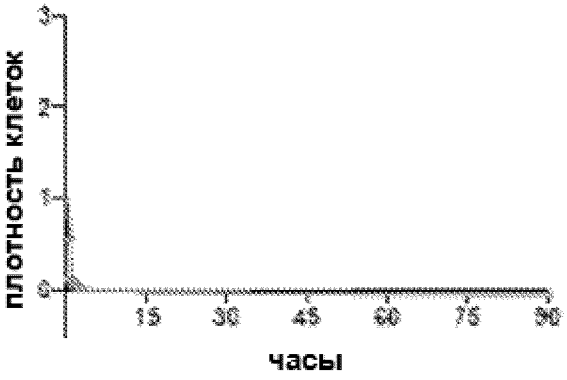
Микроглия мыши + dKO мыши



Микроглия человека + dKO человека

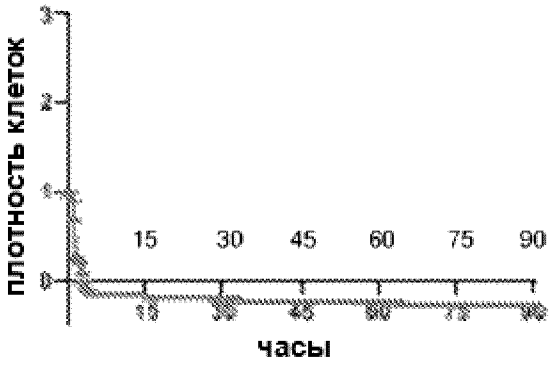


Микроглия мыши + dKO мыши

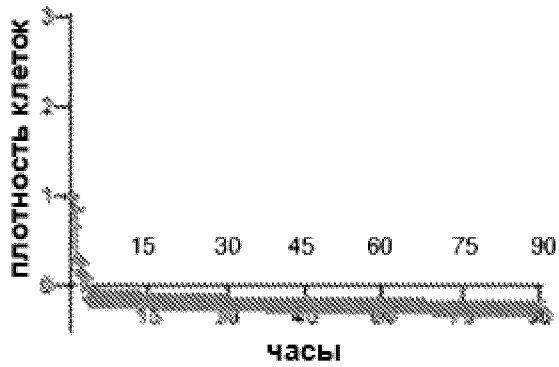


Фиг. 60

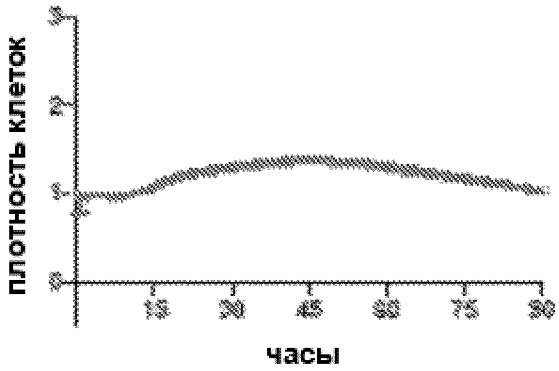
Макрофаги человека + dKO мыши



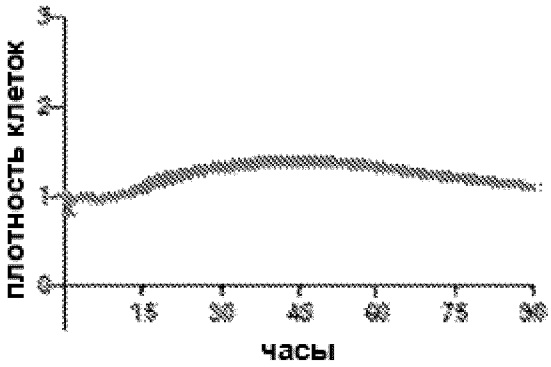
Макрофаги мыши + dKO человека



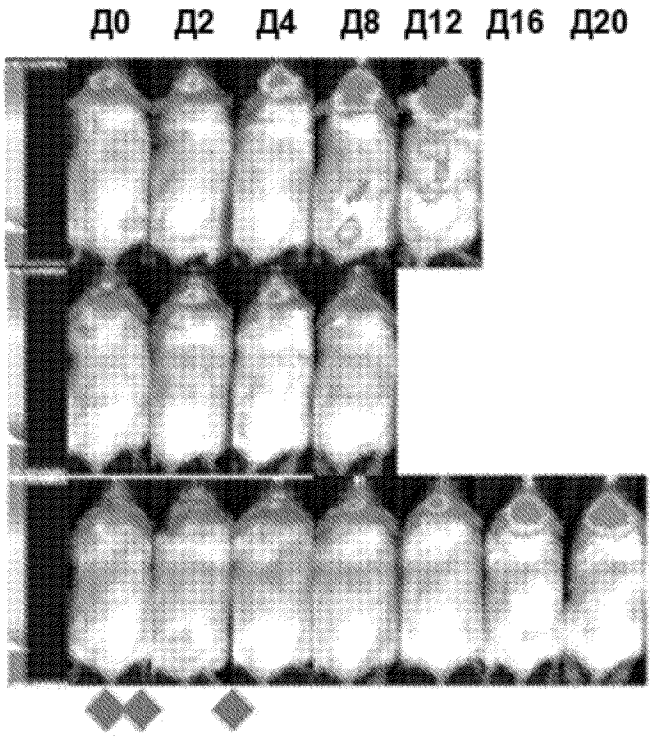
Микроглия человека + dKO мыши



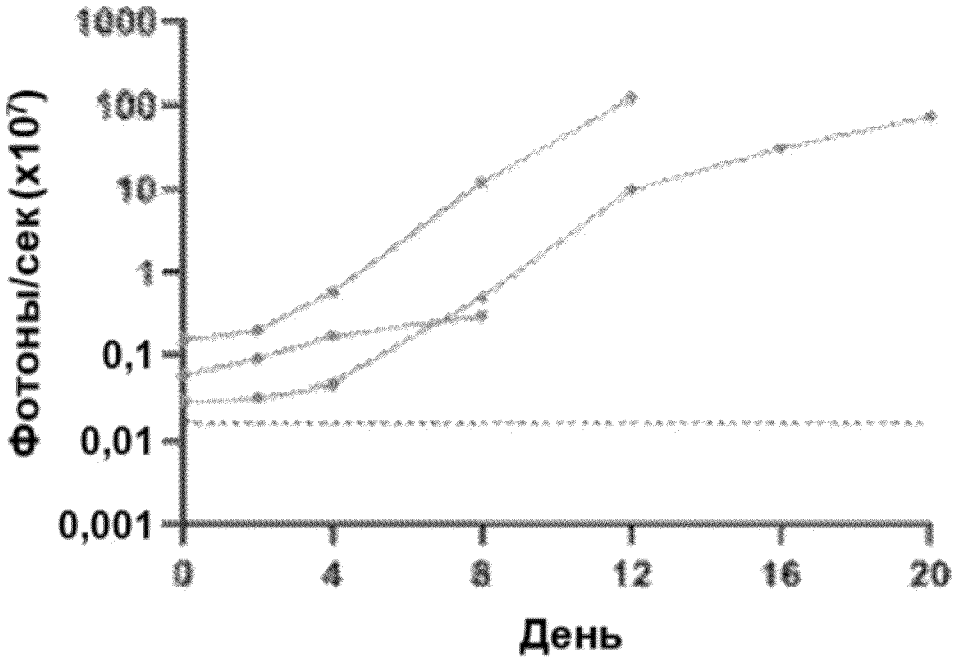
Микроглия мыши + dKO человека



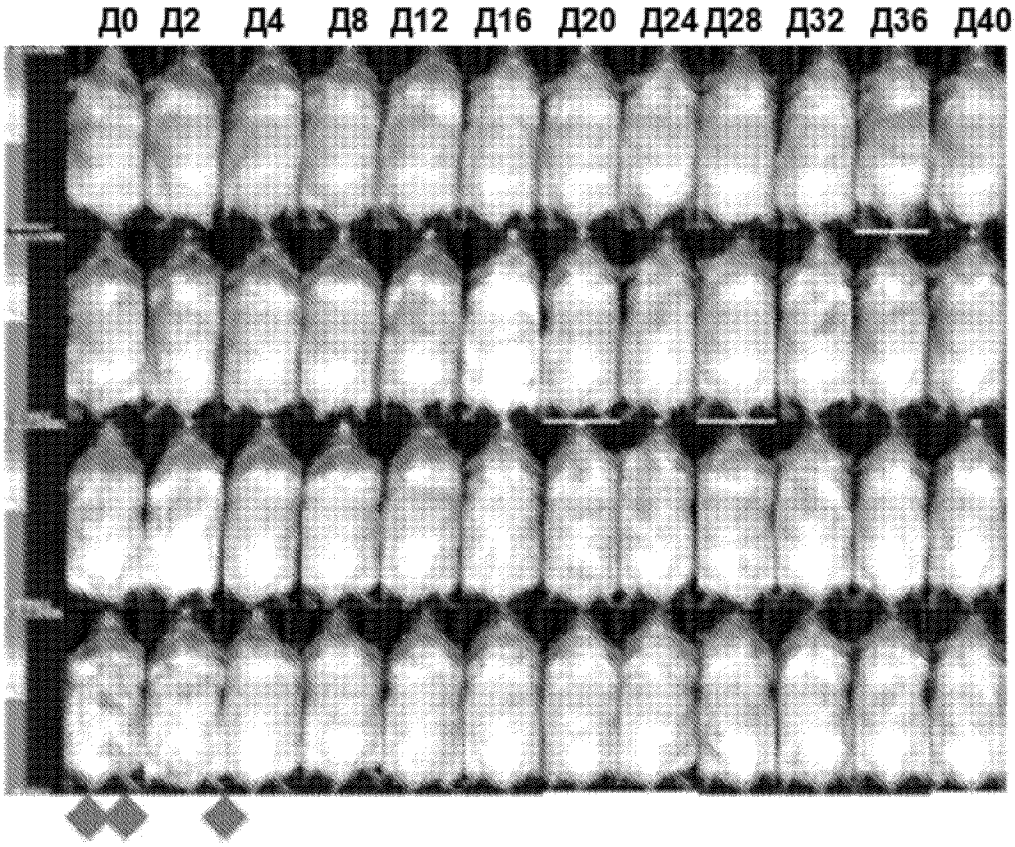
Фиг. 61A



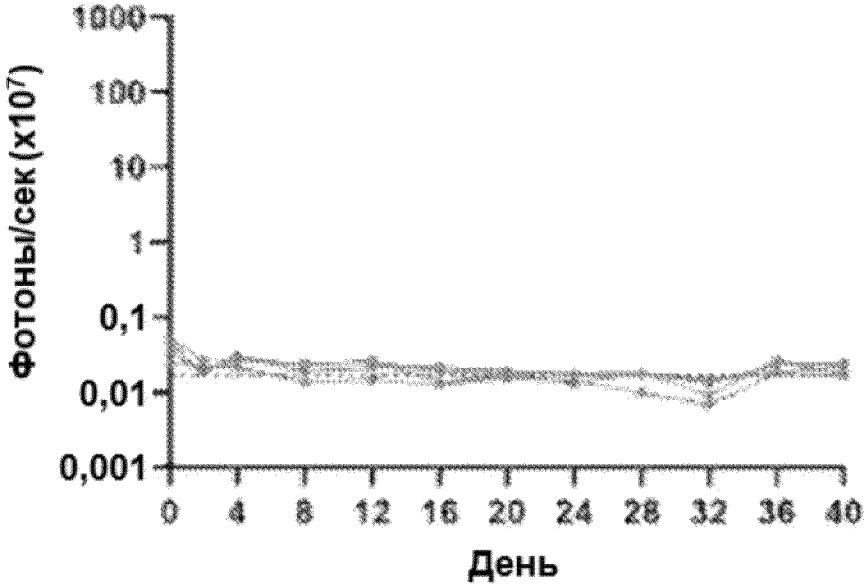
Фиг. 61B



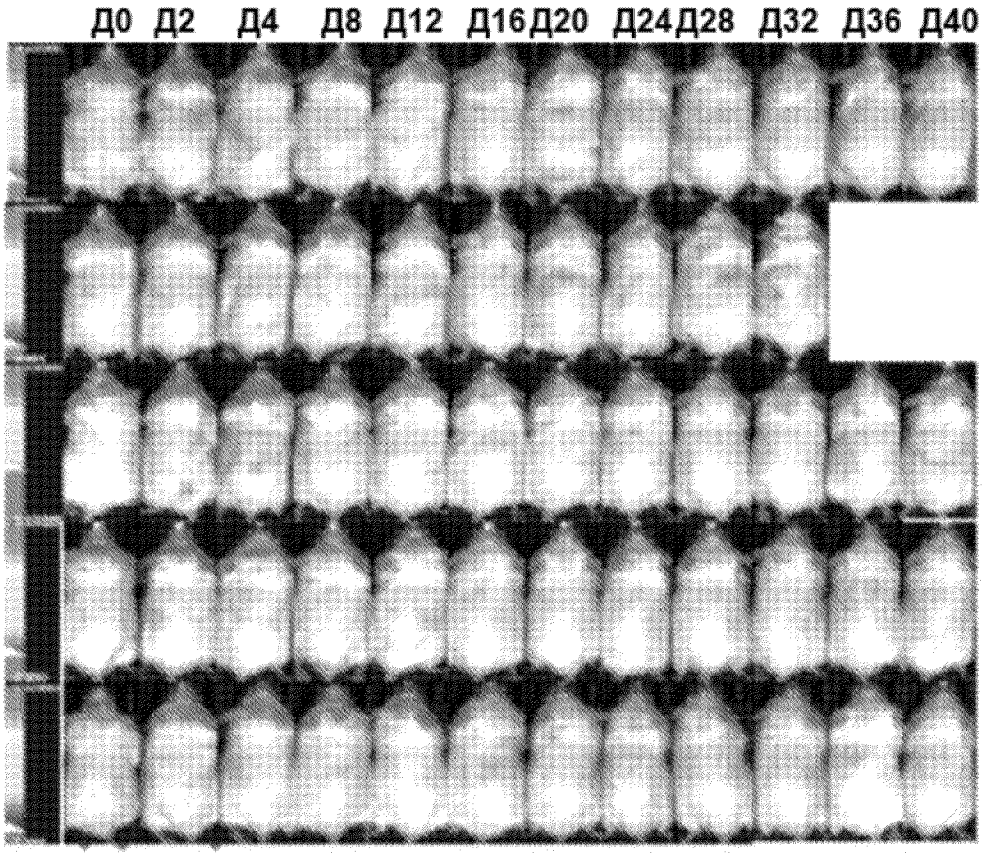
Фиг. 62A



Фиг. 62B

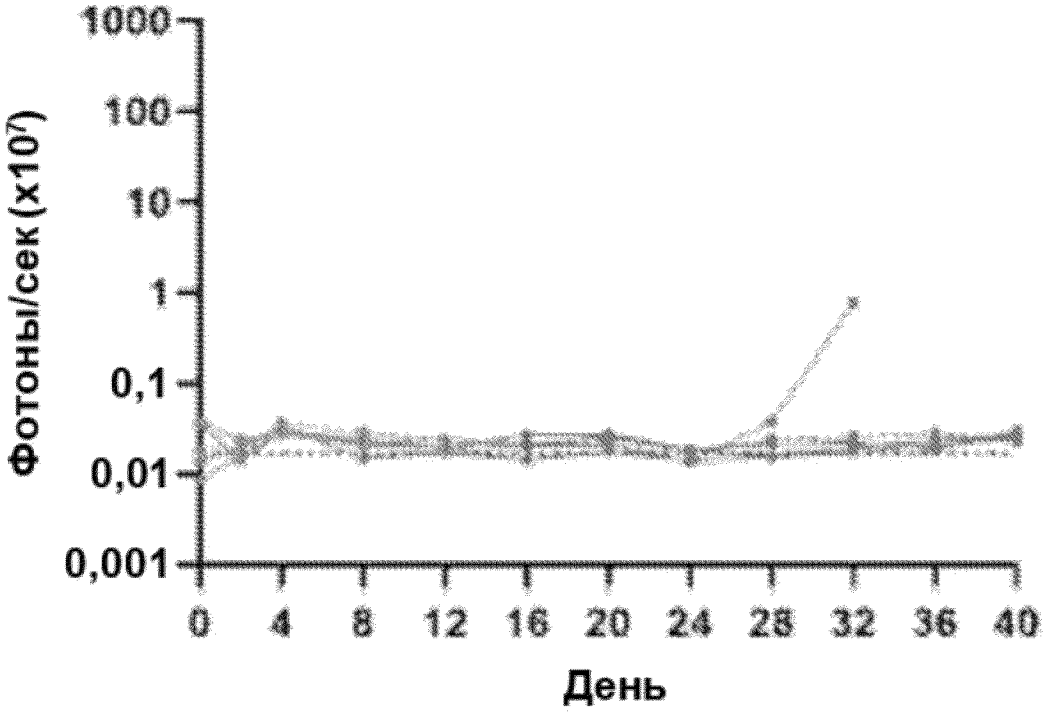


Фиг. 63A

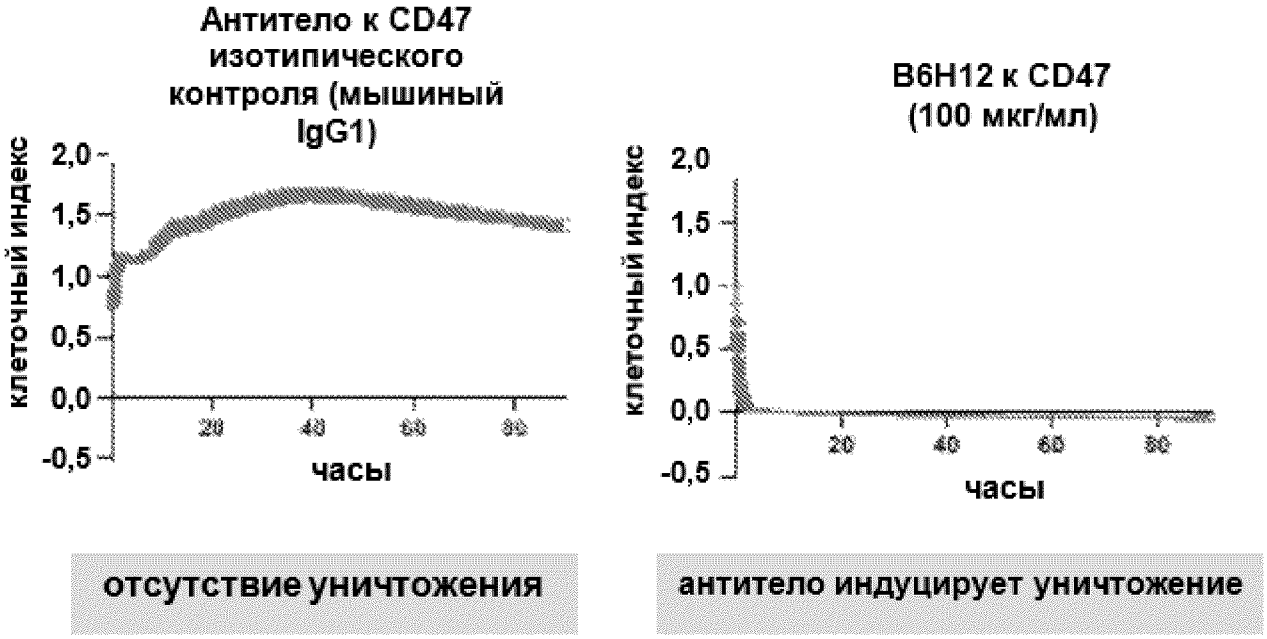


лечение:
Д0, Д1, Д3

Фиг. 63B



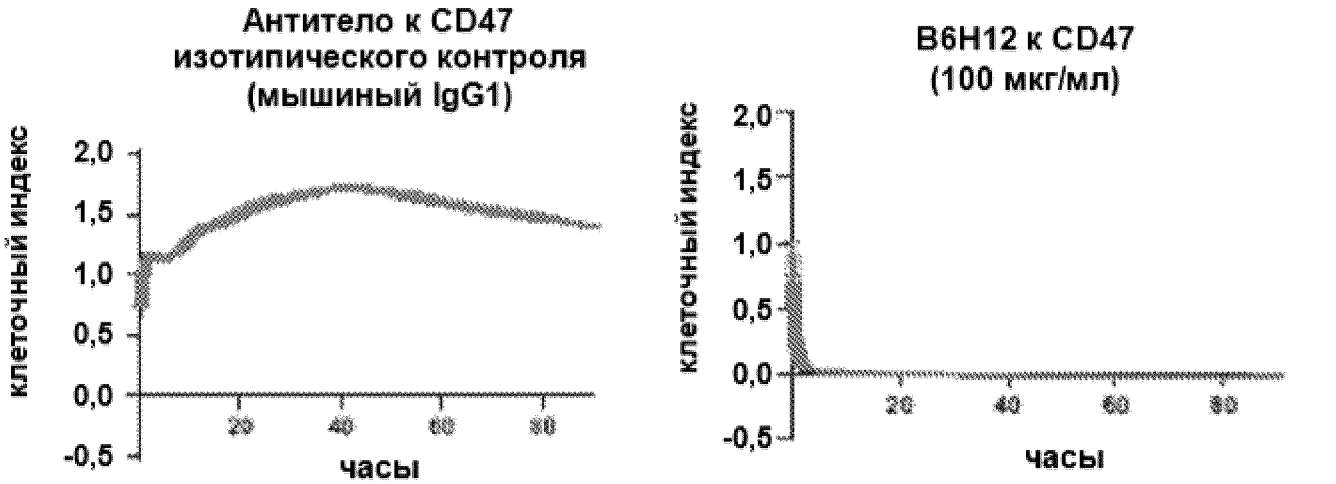
Фиг. 64A



отсутствие уничтожения

антитело индуцирует уничтожение

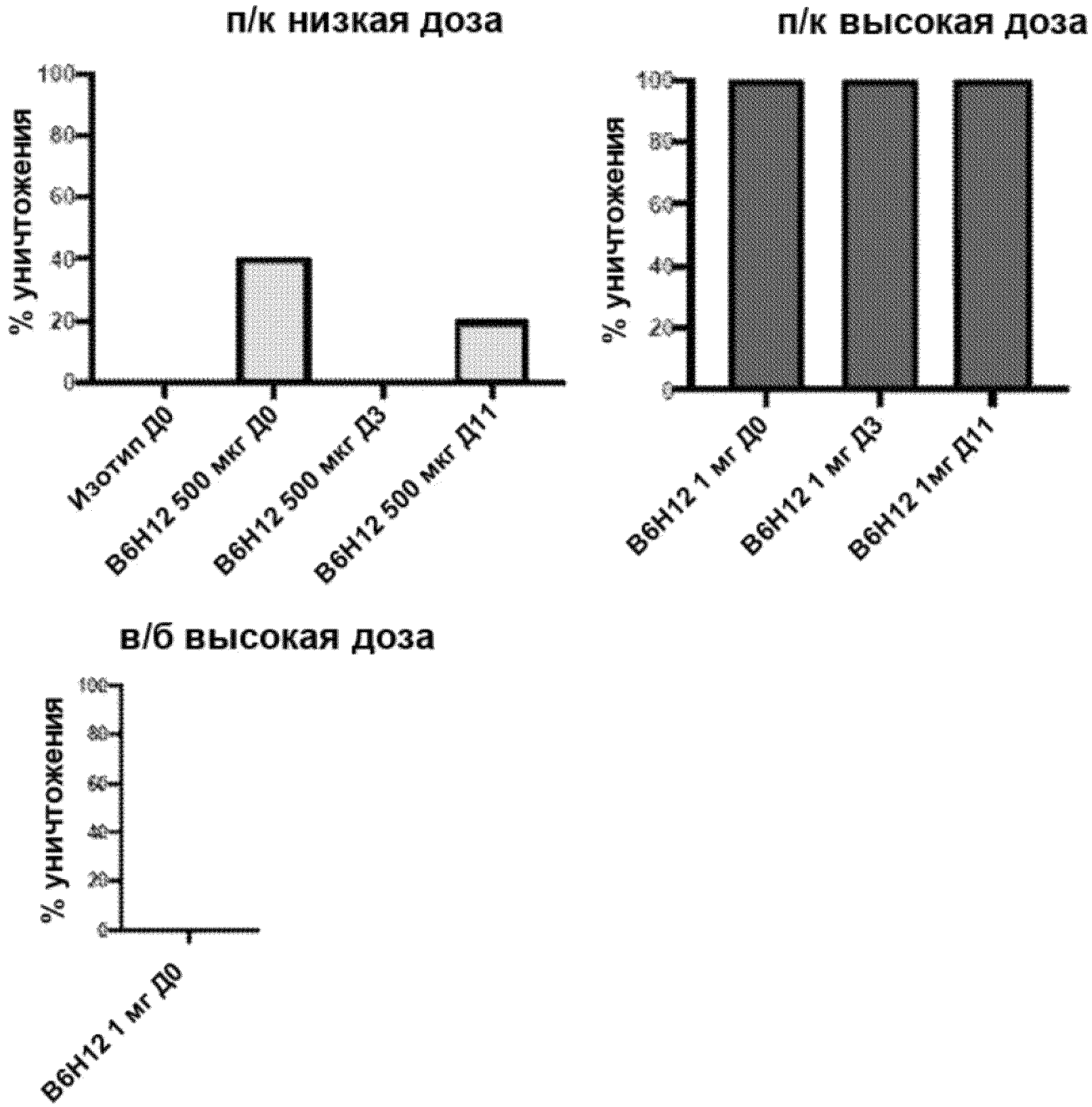
Фиг. 64B



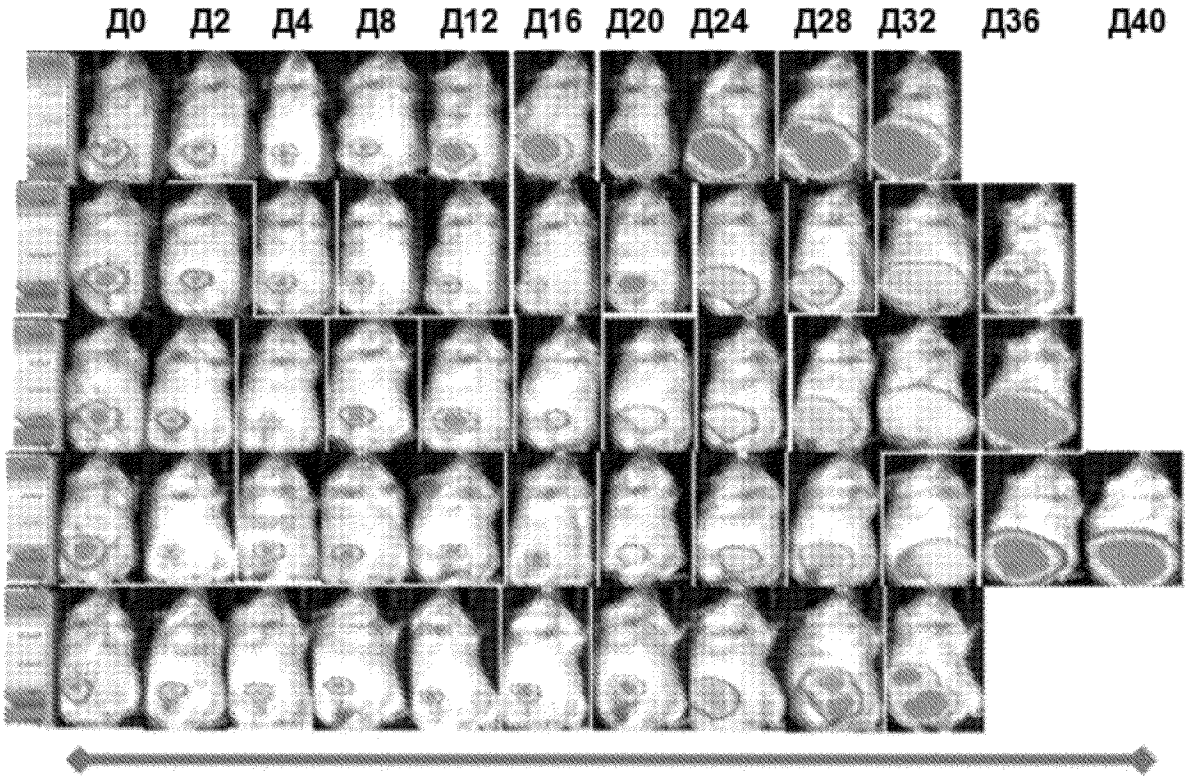
отсутствие уничтожения

антитело индуцирует уничтожение

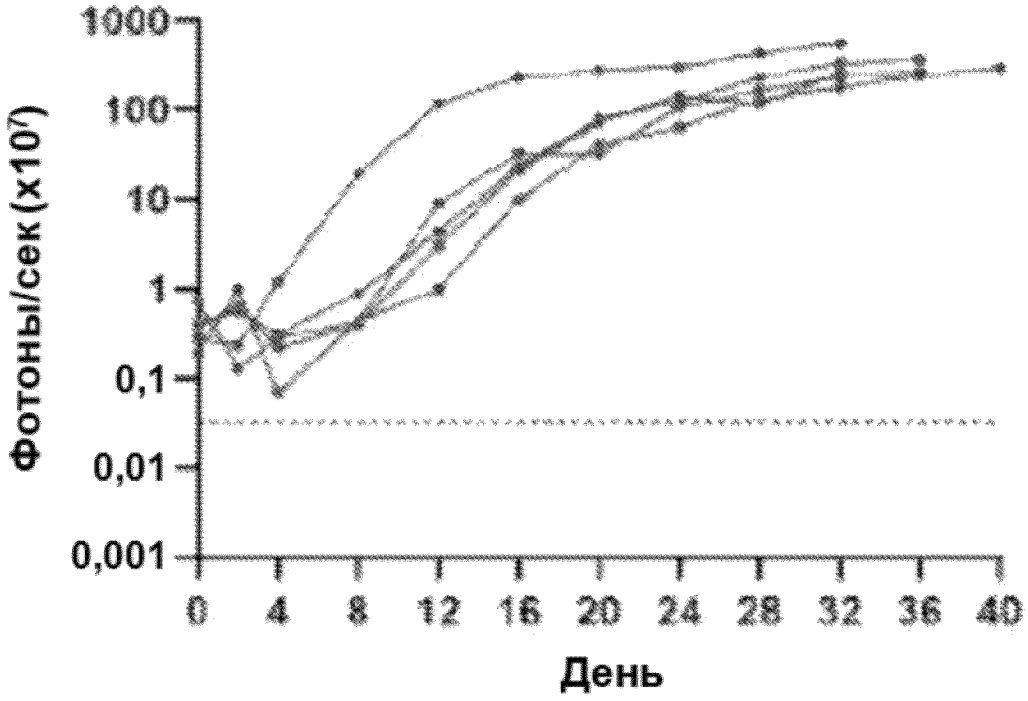
Фиг. 65


п/к низкая доза
% уничтожения
100
80
60
40
20
0
Изотип Д0
B6H12 500 мкг Д0
B6H12 500 мкг Д3
B6H12 500 мкг Д11
п/к высокая доза
% уничтожения
100
80
60
40
20
0
B6H12 1 мг Д0
B6H12 1 мг Д3
B6H12 1мг Д11
в/б высокая доза
% уничтожения
B6H12 1 мг Д0

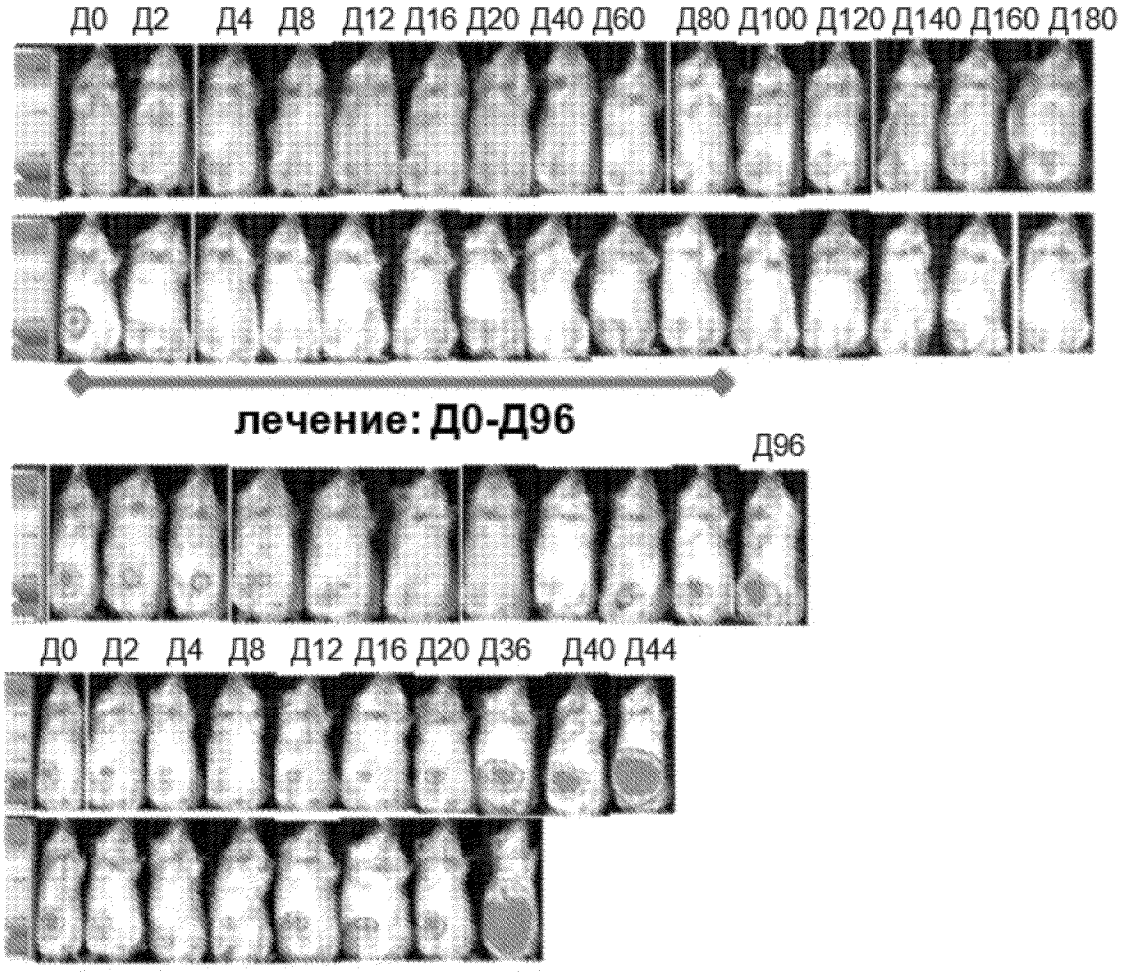
Фиг. 66A



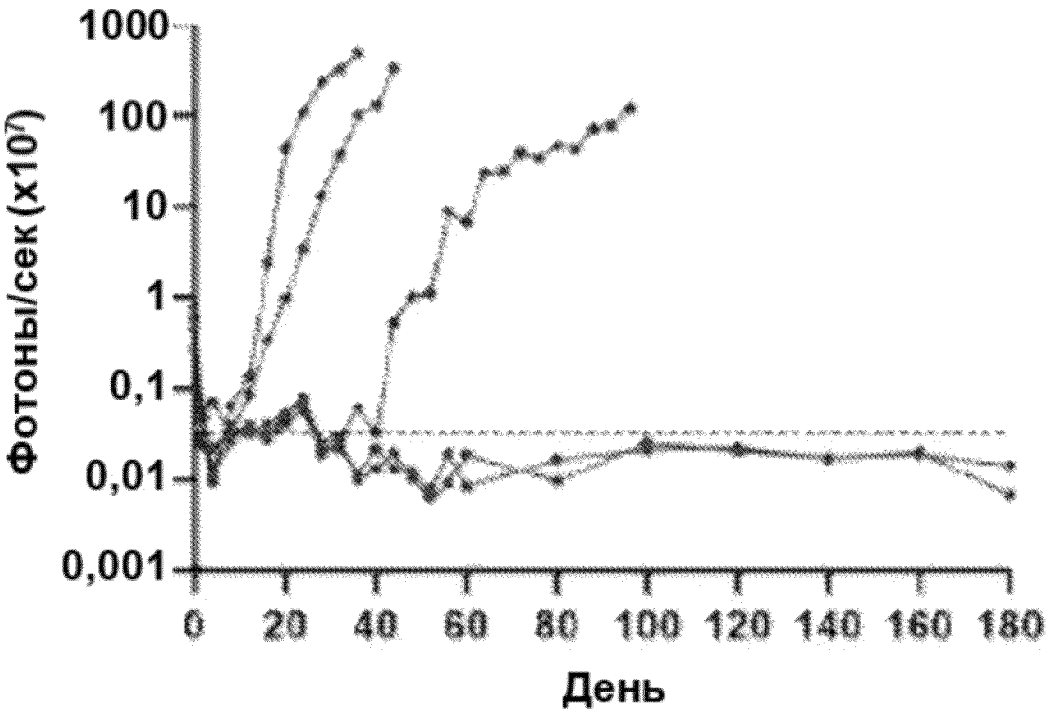
Фиг. 66B



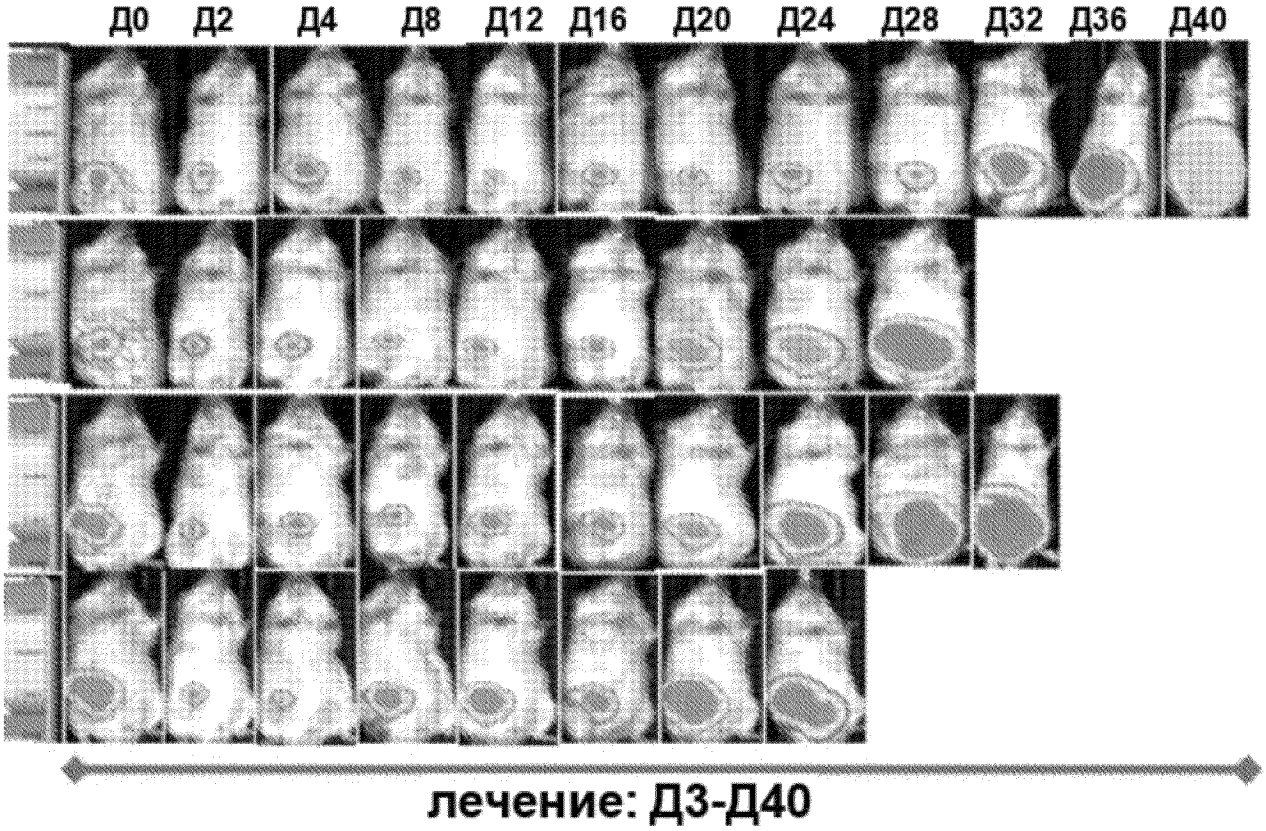
Фиг. 67A



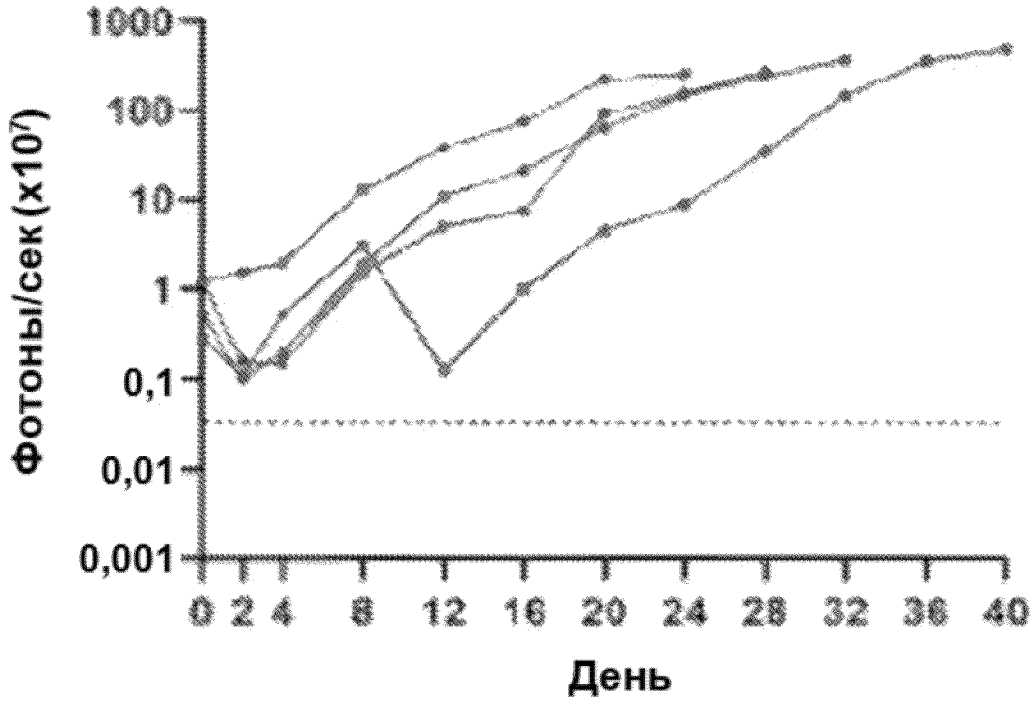
Фиг. 67B



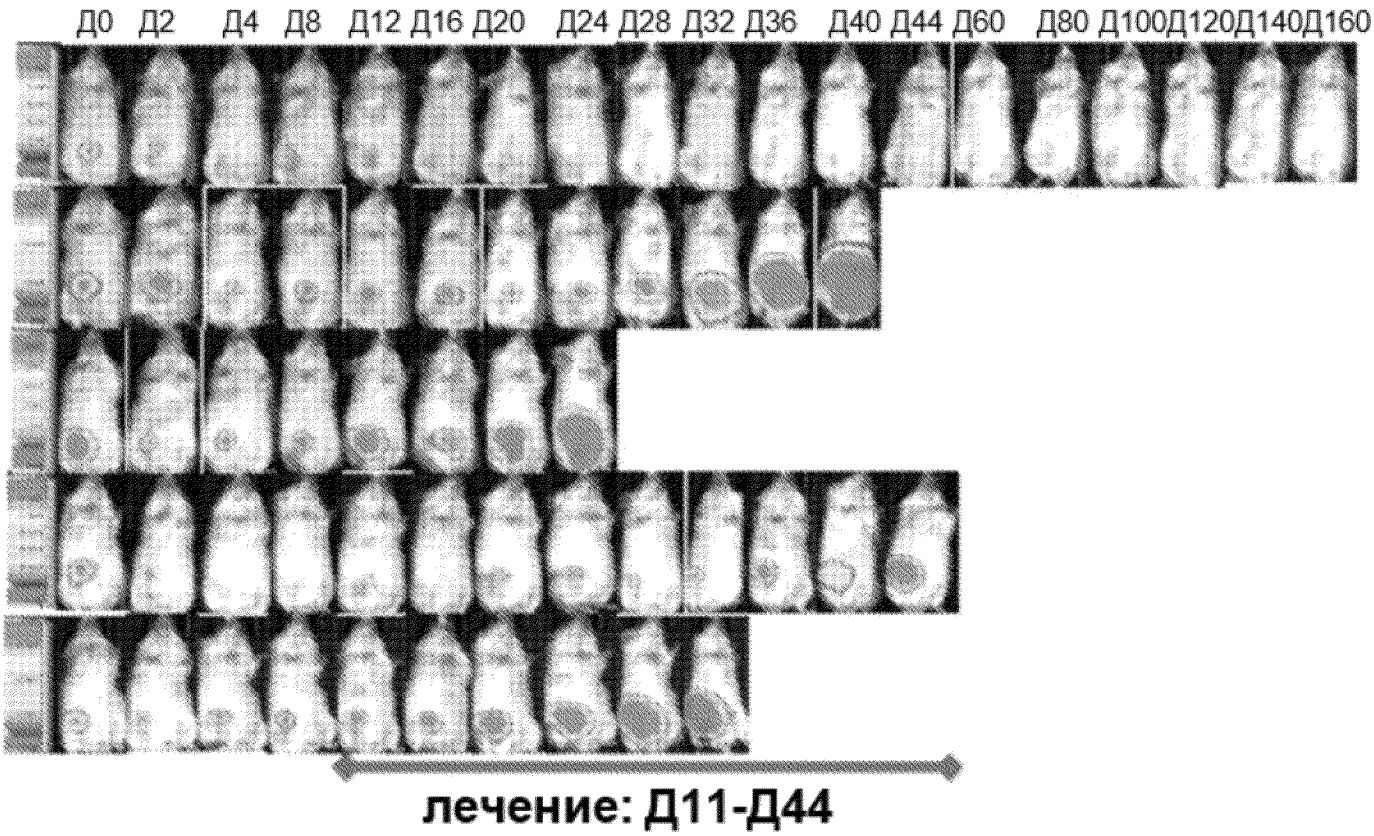
Фиг. 68A



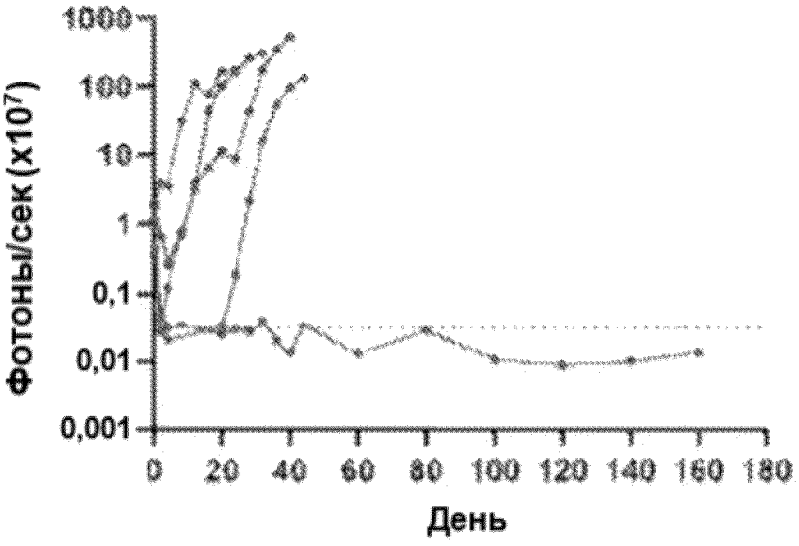
Фиг. 68B



Фиг. 69A

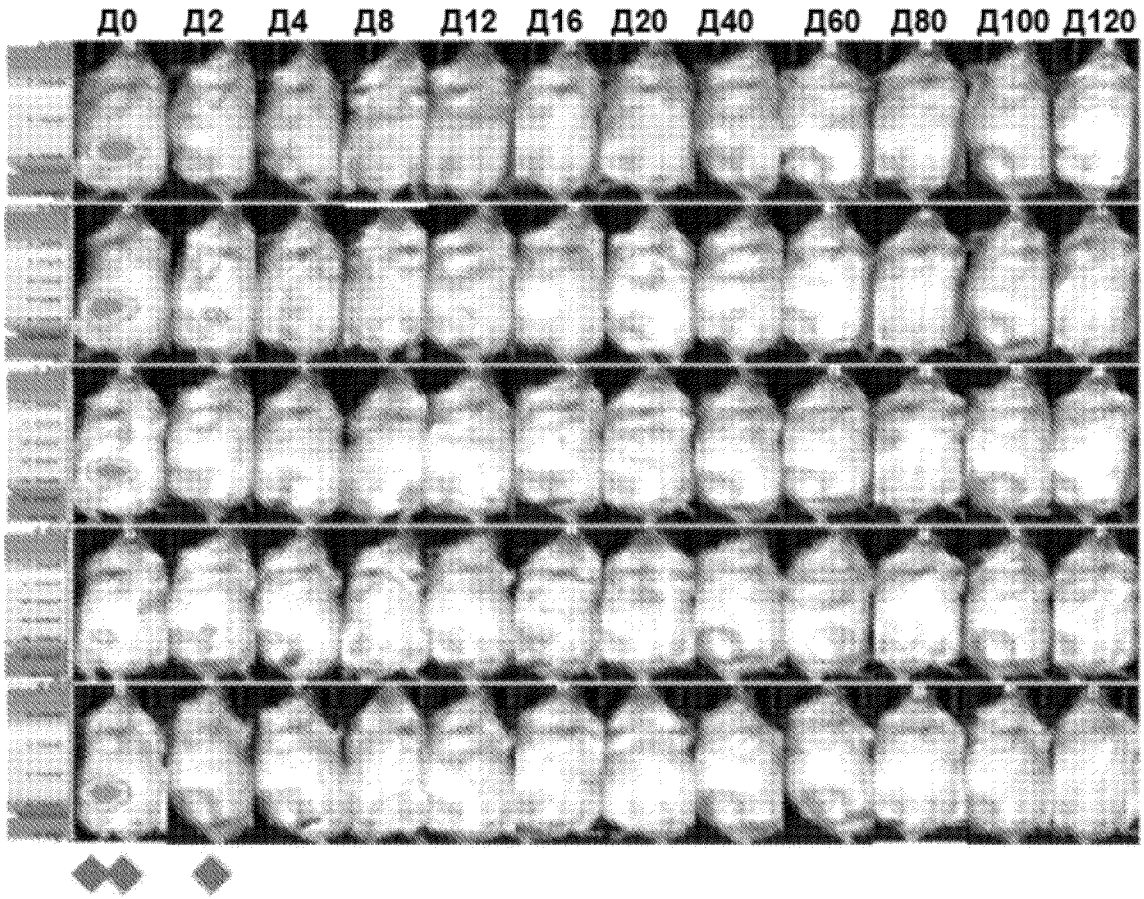


Фиг. 69B



Последующее наблюдение через 160 дней:
Тератома развилась у всех 4 из 5 мышей.

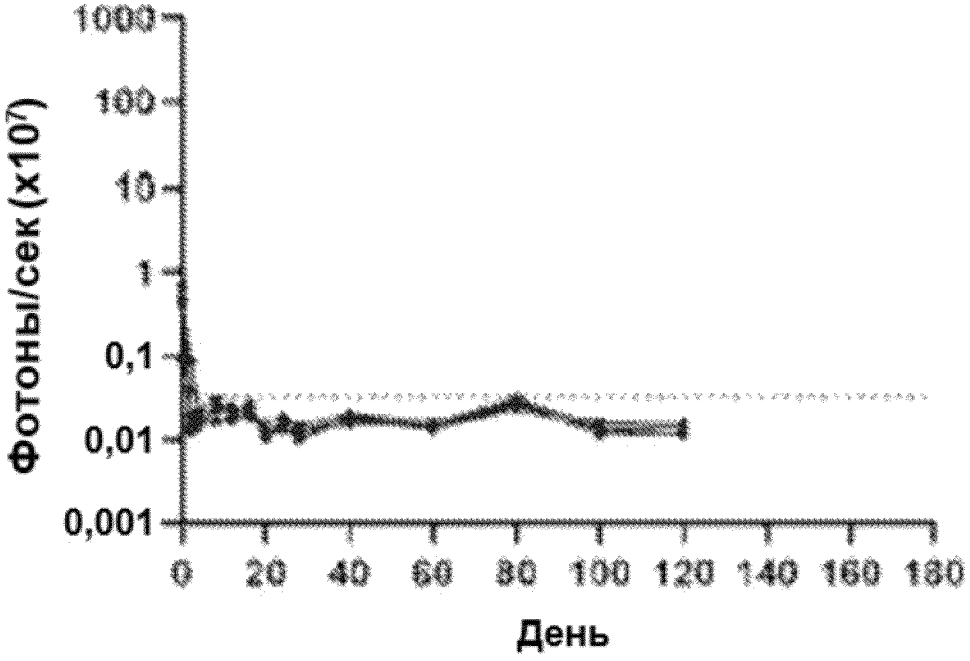
Фиг. 70A



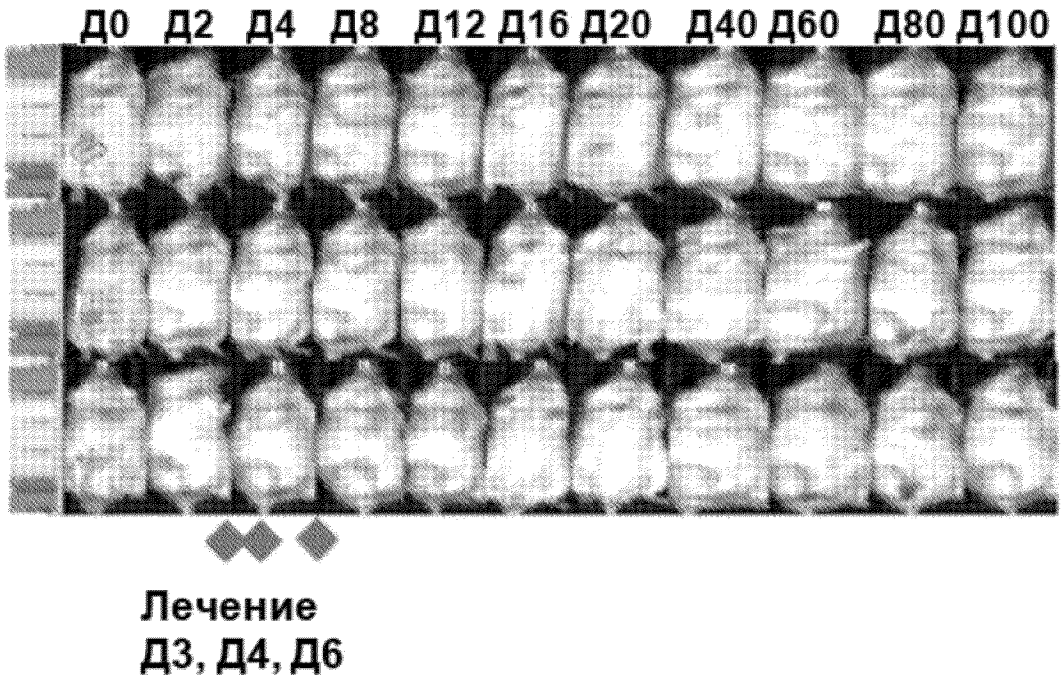
лечение:
Д0, Д1, Д3

SANA КОНФИДЕНЦИАЛЬНО

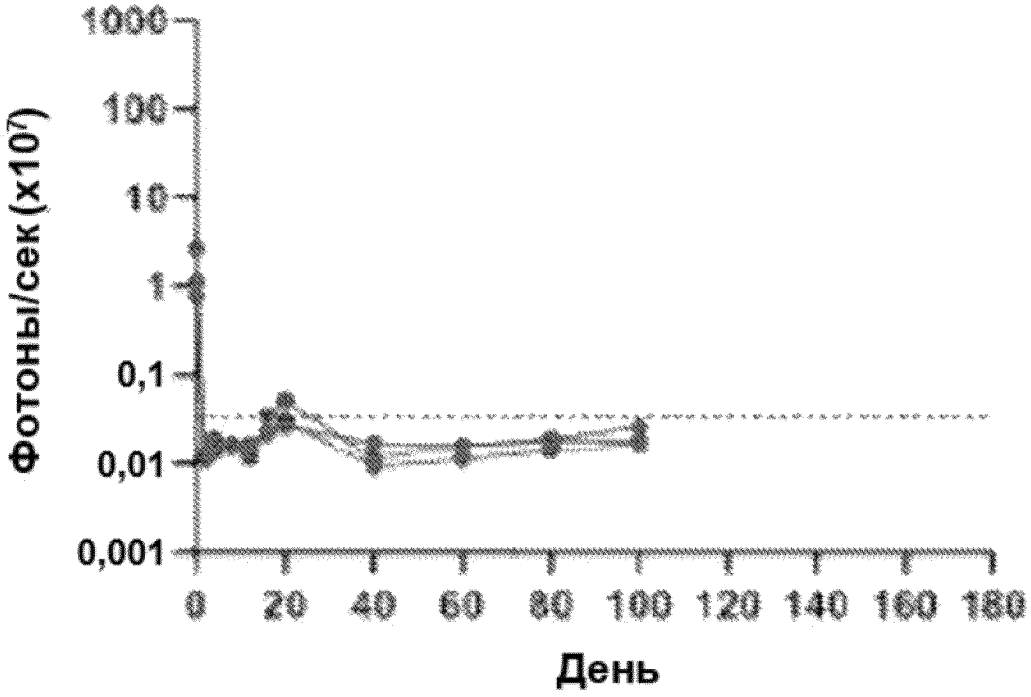
Фиг. 70B



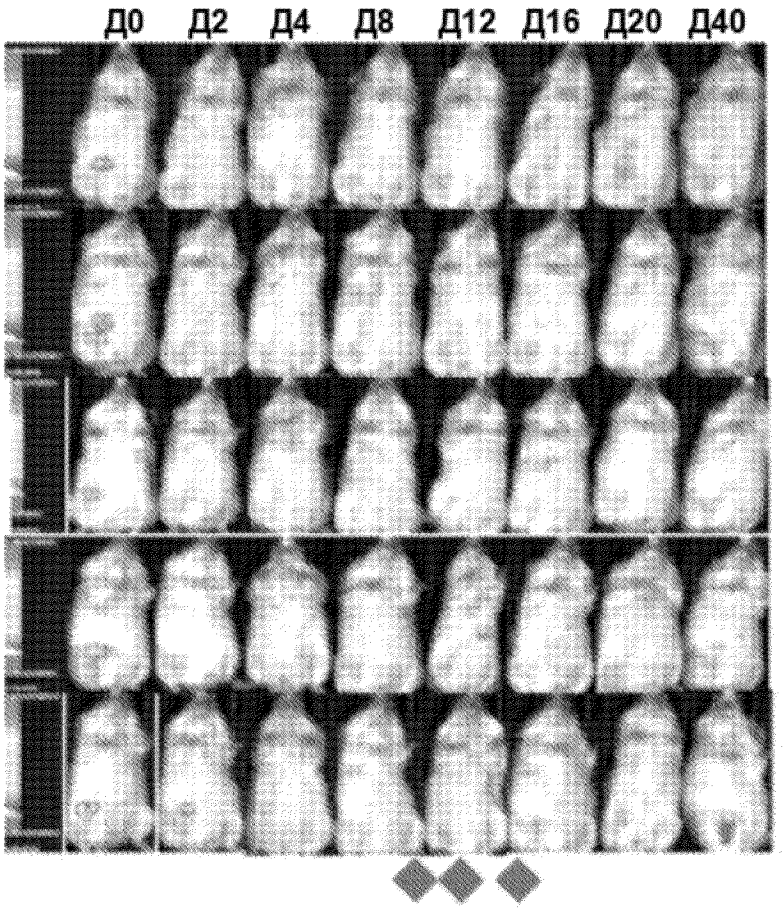
Фиг. 71A



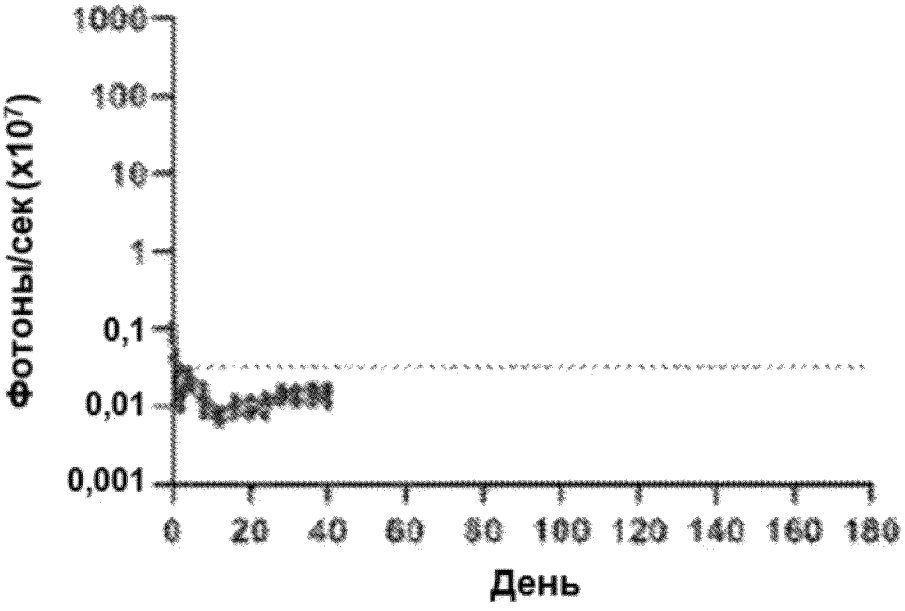
Фиг. 71B



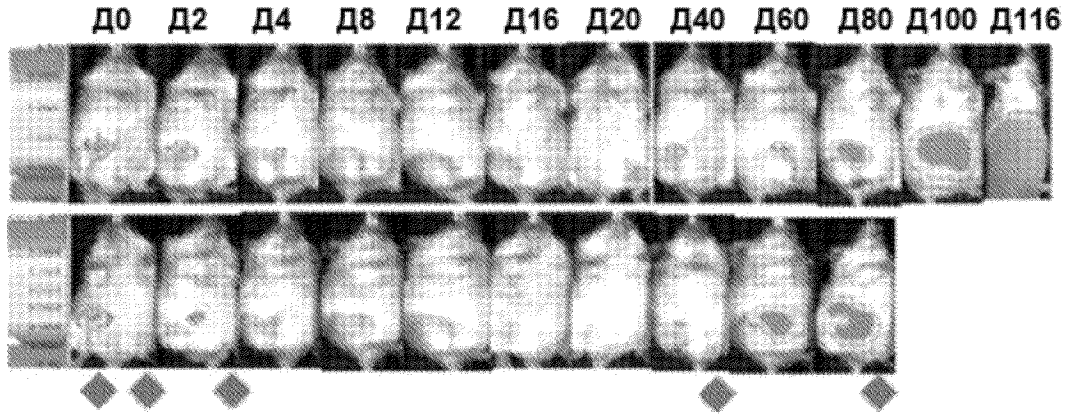
Фиг. 72A



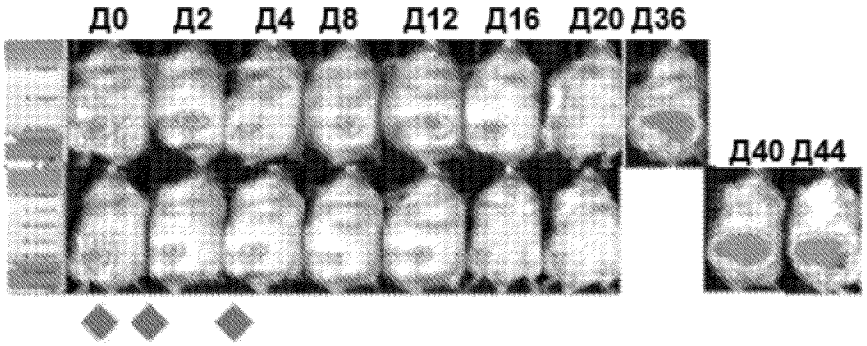
Фиг. 72B



Фиг. 73A

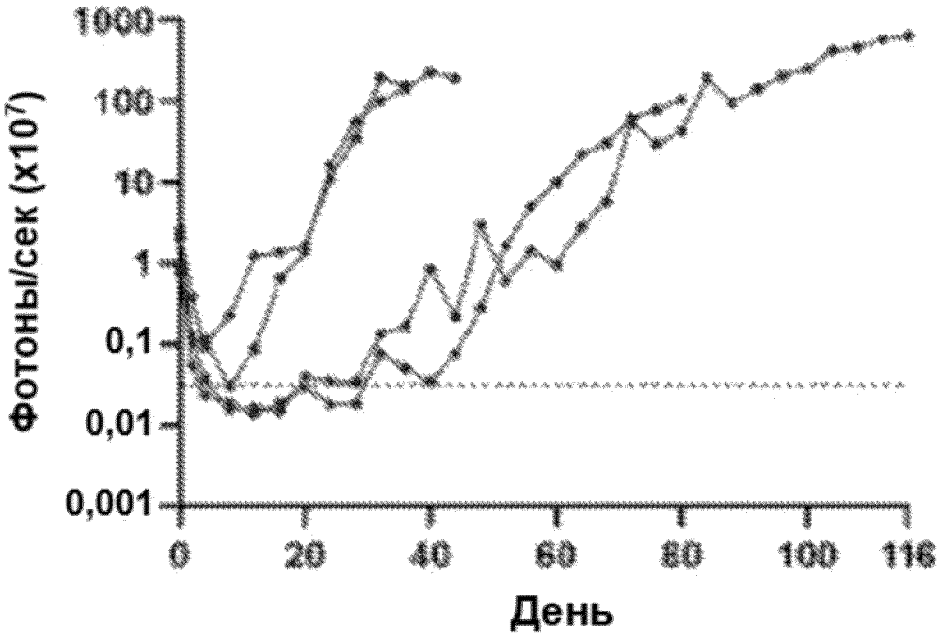


лечение:
Д0, Д1, Д3

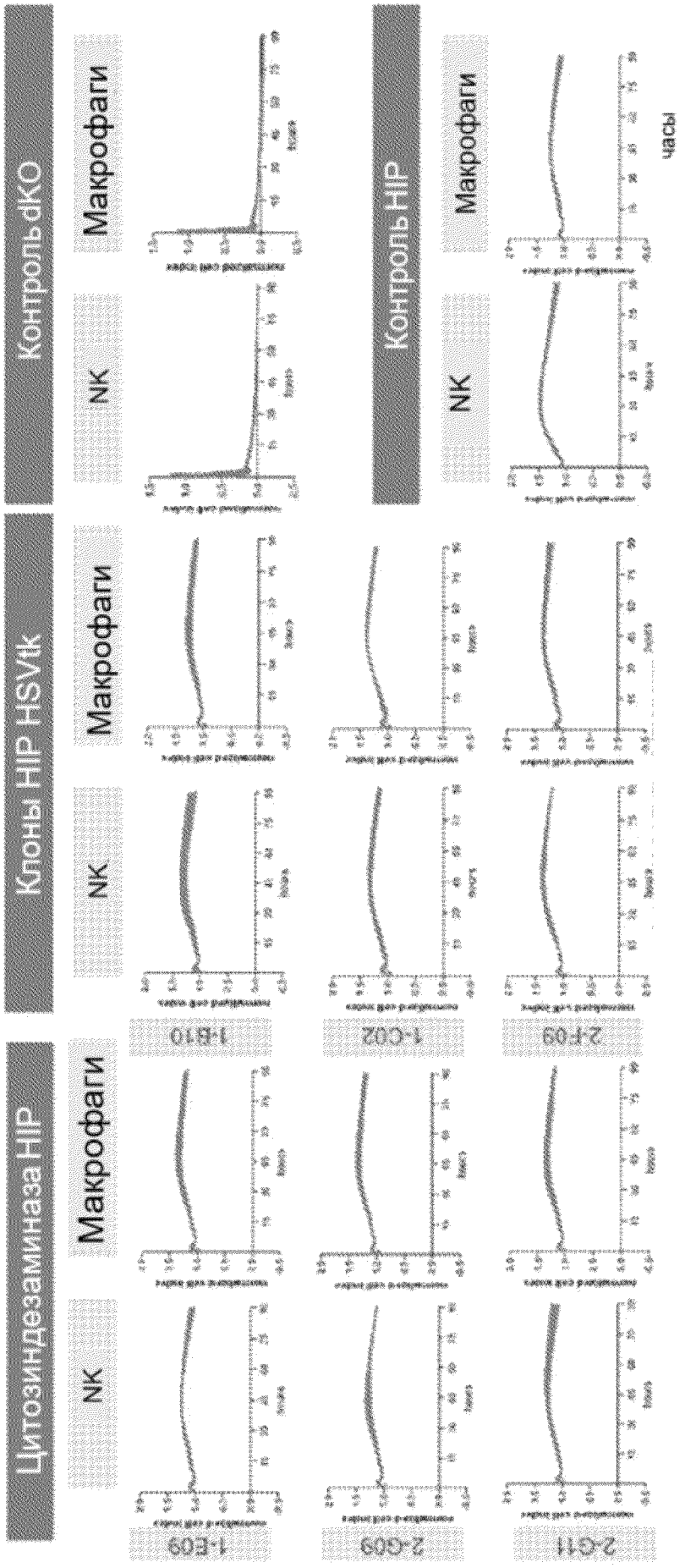


Лечение
Д0, Д1, Д3

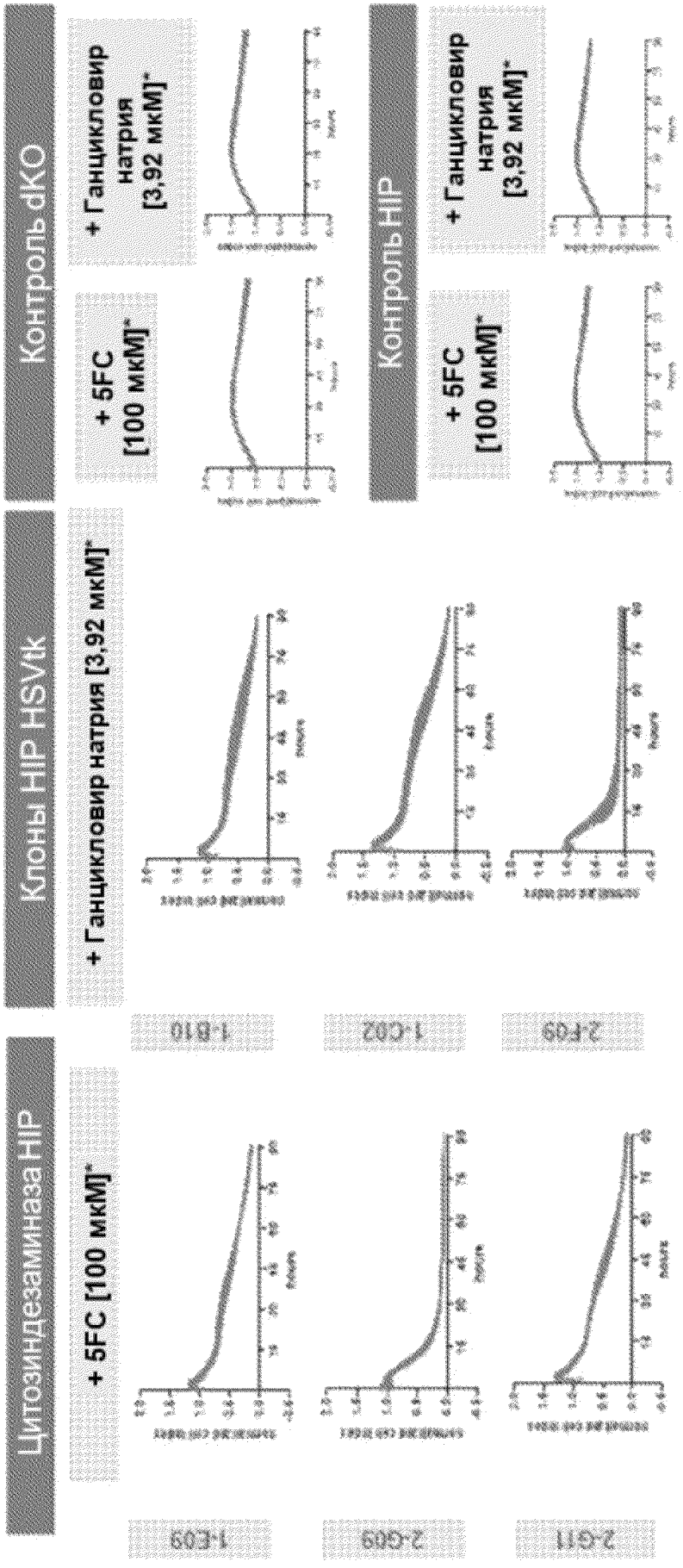
Фиг. 73B



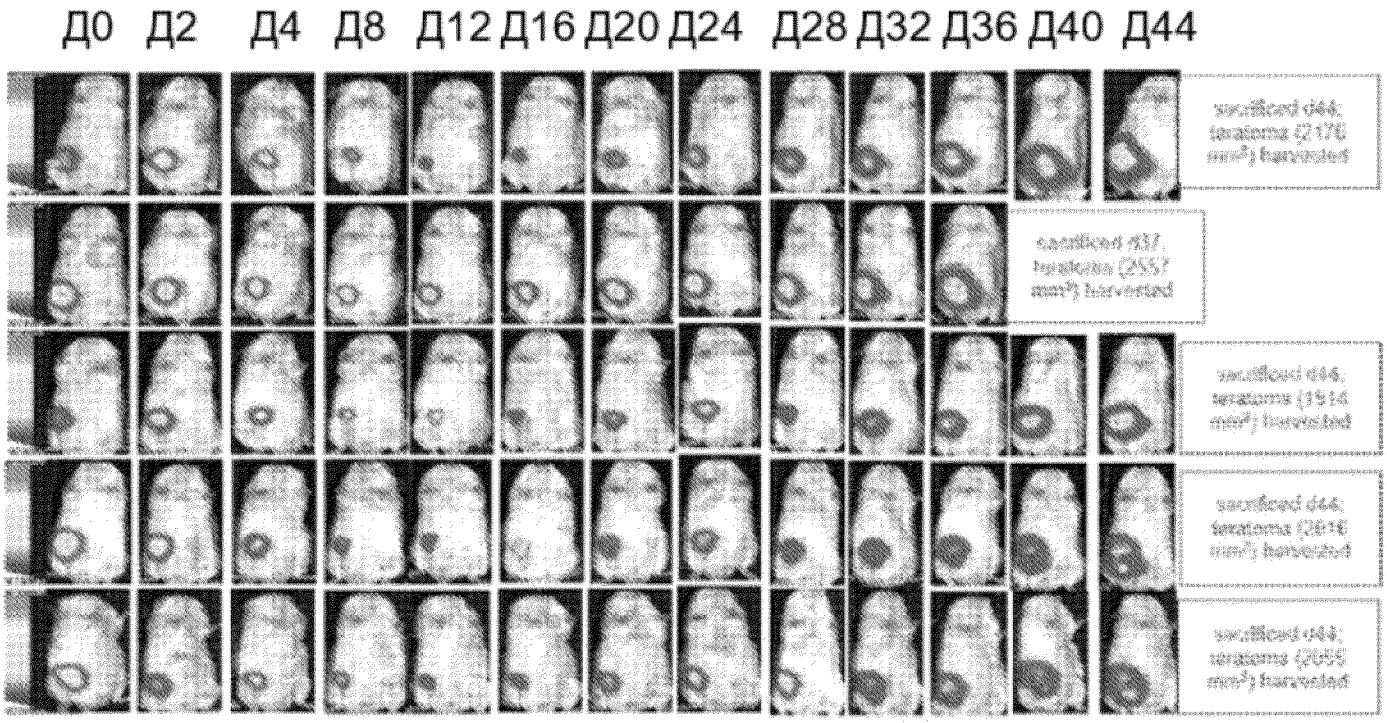
Фиг. 74


Цитозиндезаминаза HIP
Клоны HIP HSVtk
Контроль dKO
Контроль HIP
NK
Макрофаги
1-E09
1-B10
2-G09
1-C02
2-G11
2-F09
часы

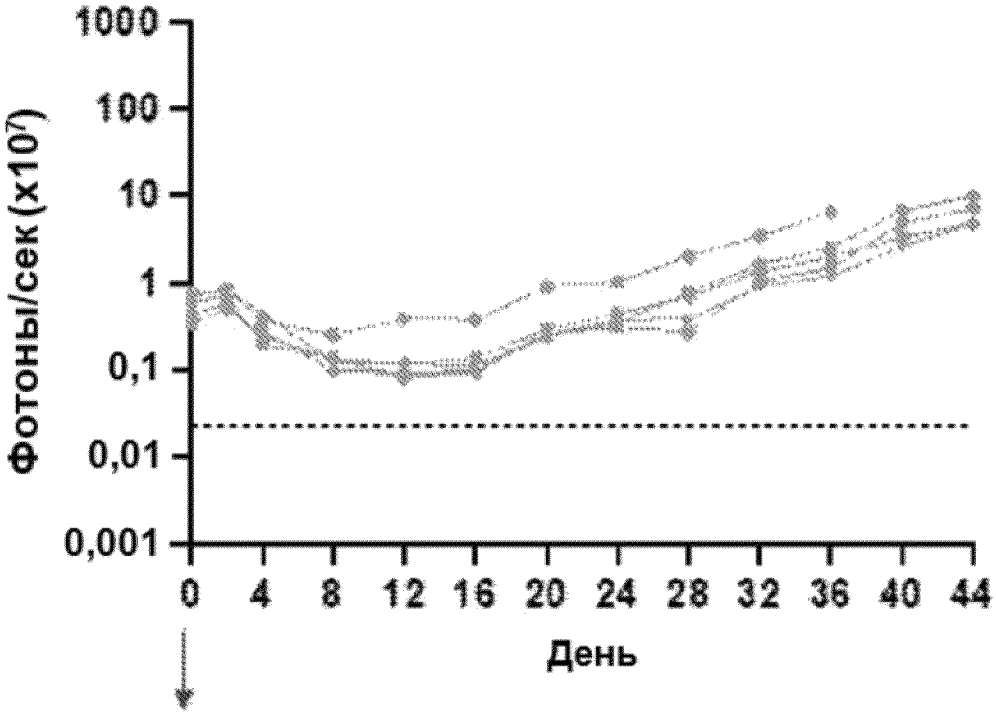
Фиг. 75


Контроль dKO
+ Ганцикловир натрия [3,92 мкМ]*
+ 5FC [100 мкМ]*
Контроль HIP
+ Ганцикловир натрия [3,92 мкМ]*
+ 5FC [100 мкМ]*
Клоны HIP HSVtk
+ Ганцикловир натрия [3,92 мкМ]*
1-B10
1-C02
2-F09
Цитозиндезаминаза HIP
+ 5FC [100 мкМ]*
1-C09
2-G09
2-G11

Фиг. 76A

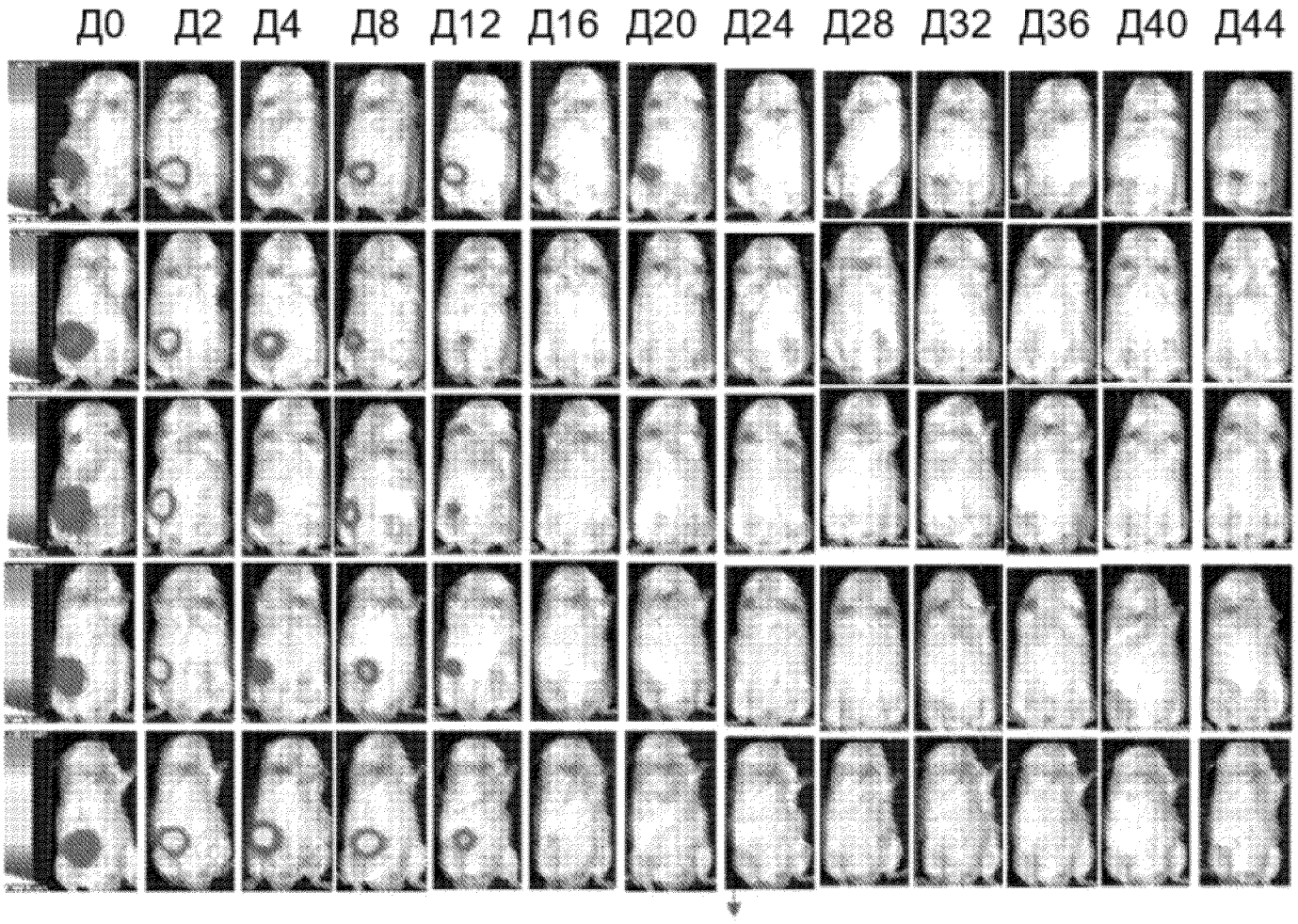


Фиг. 76B

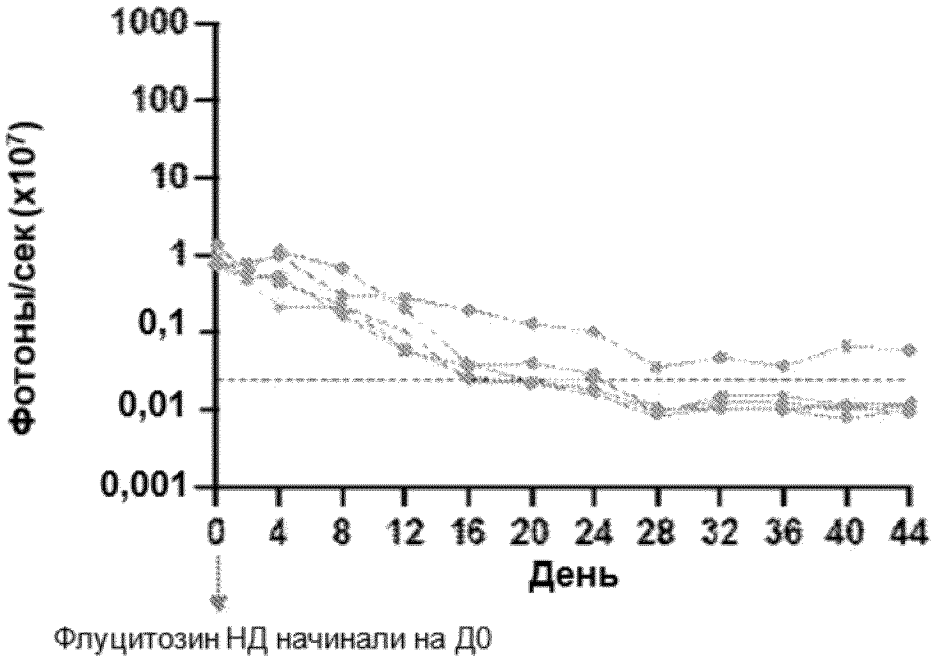


Исходный уровень (контроль) начинался в день 0

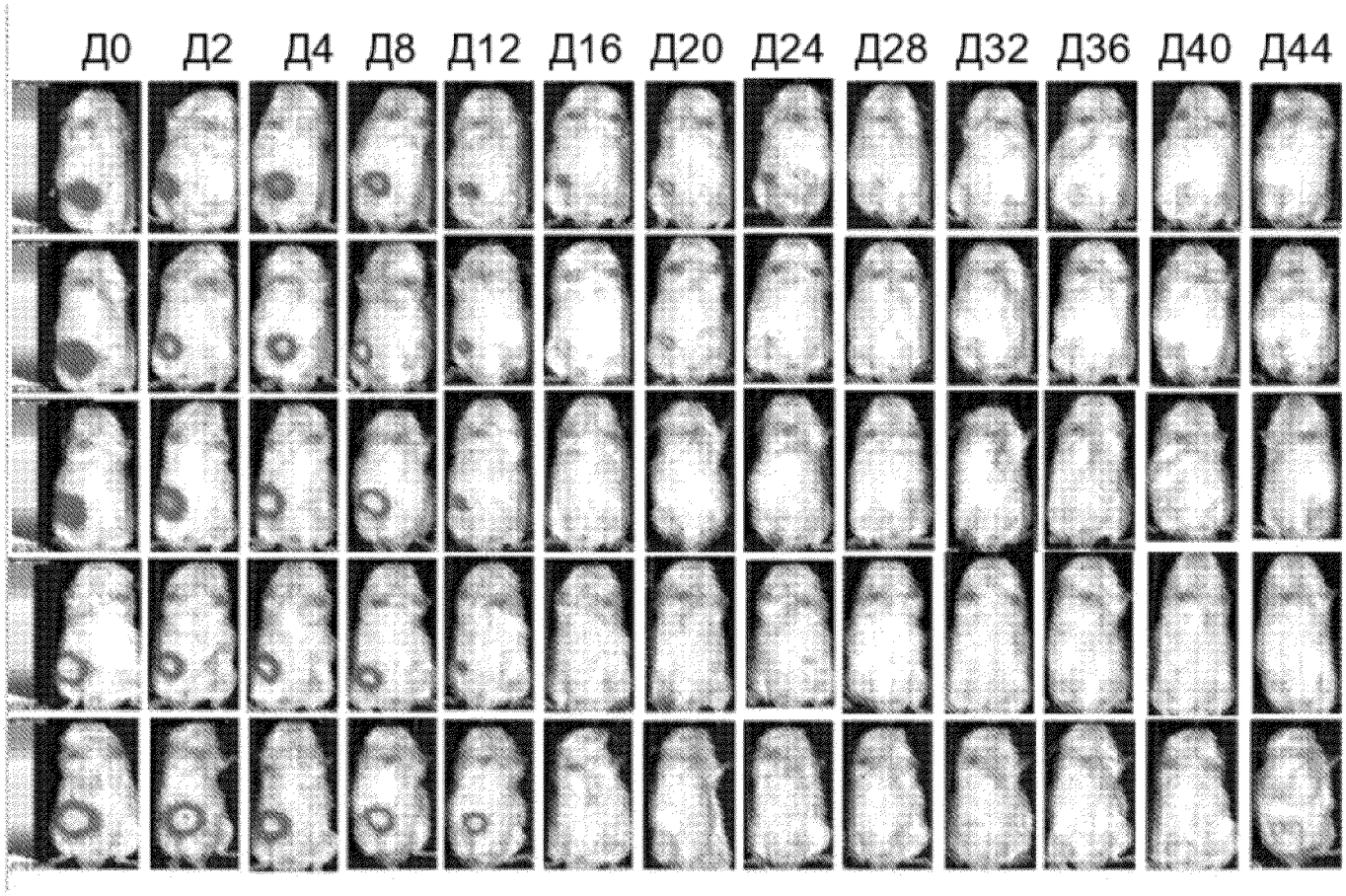
Фиг. 77A



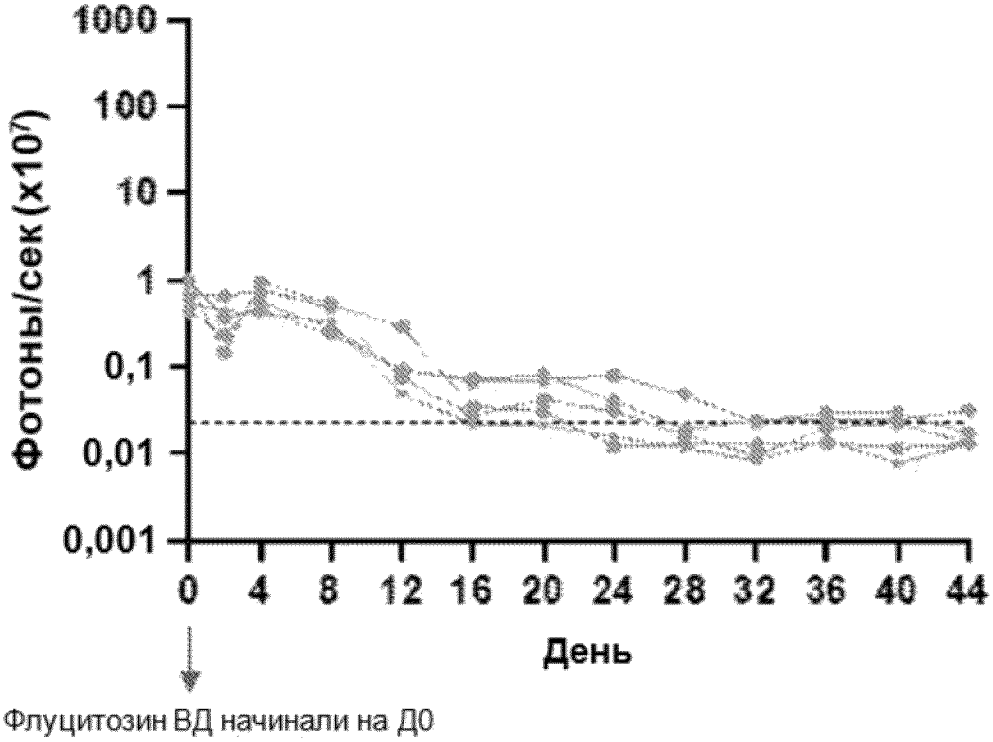
Фиг. 77B



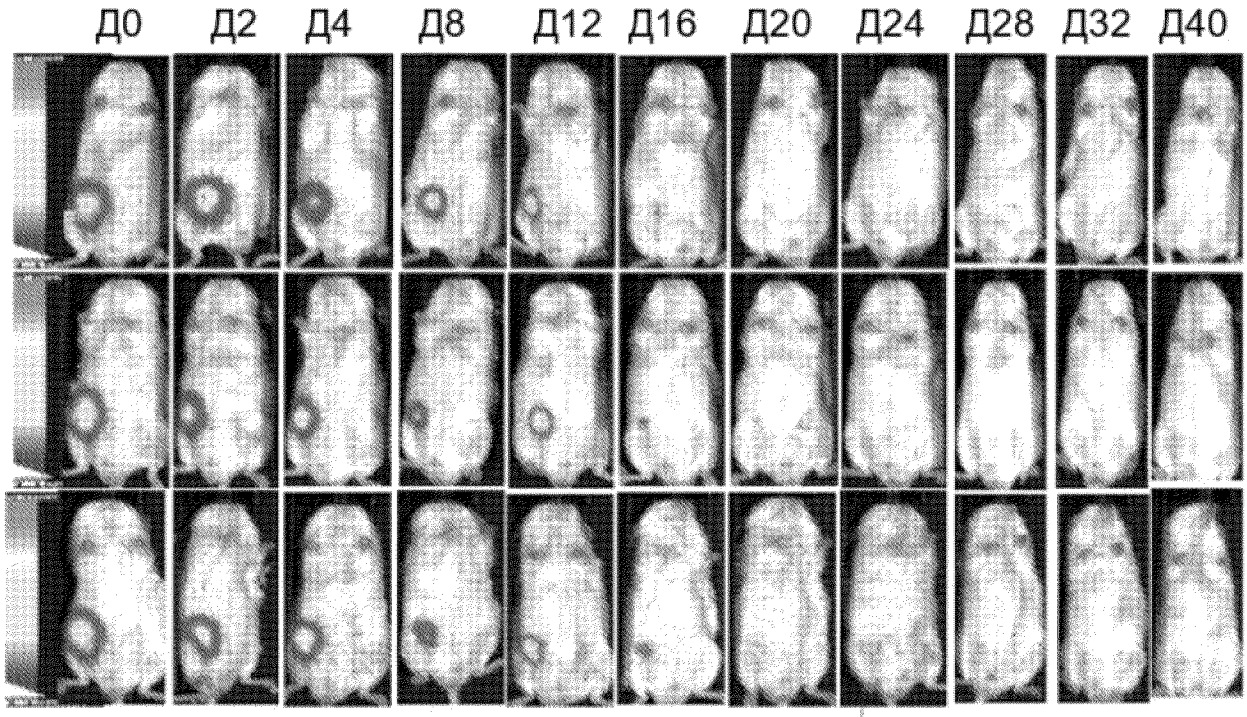
Фиг. 78A



Фиг. 78B



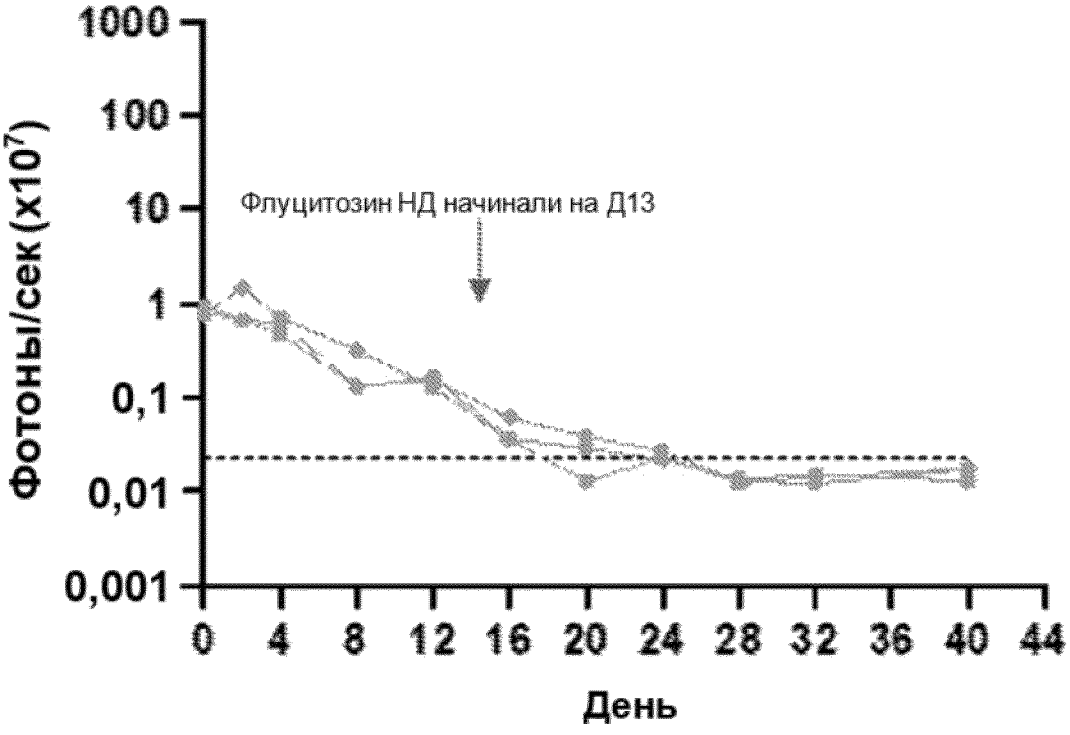
Фиг. 79A



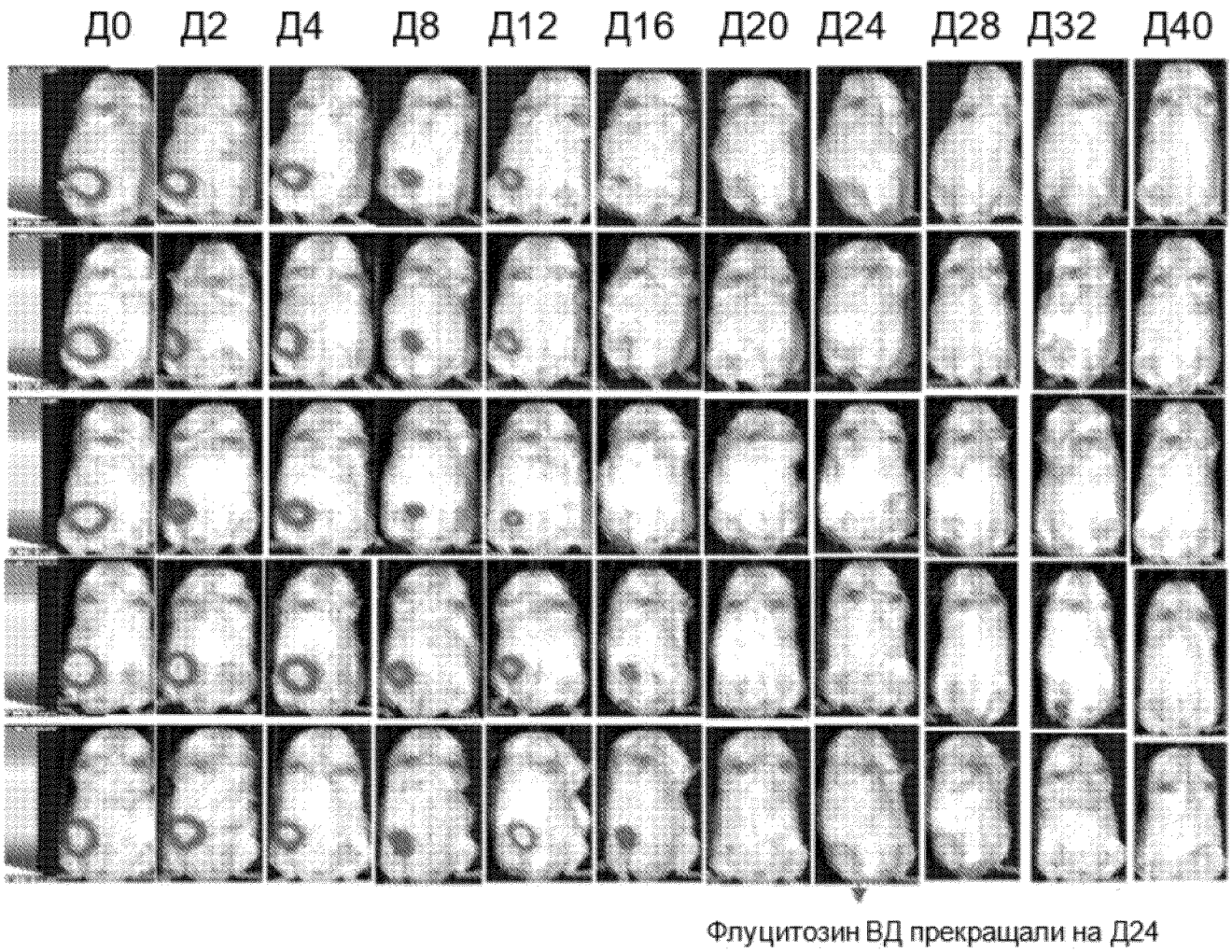
Две мыши умерли после визуализации, не связанной с синтетическим препаратом

Флуцитозин НД прекращали на Д24

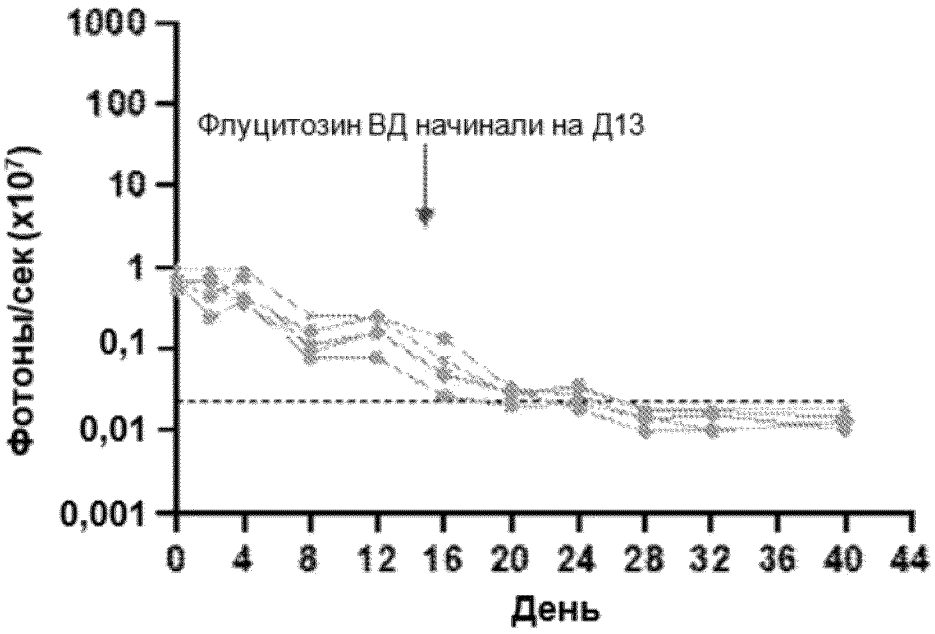
Фиг. 79B



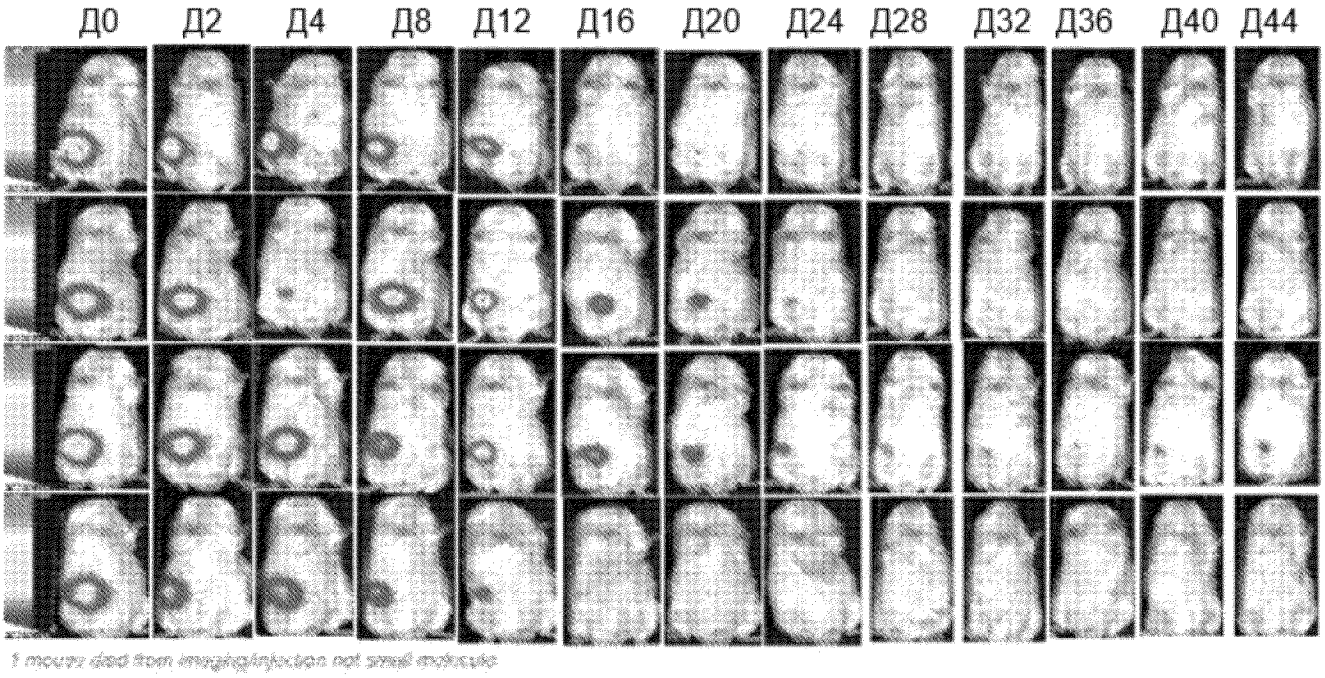
Фиг. 80A



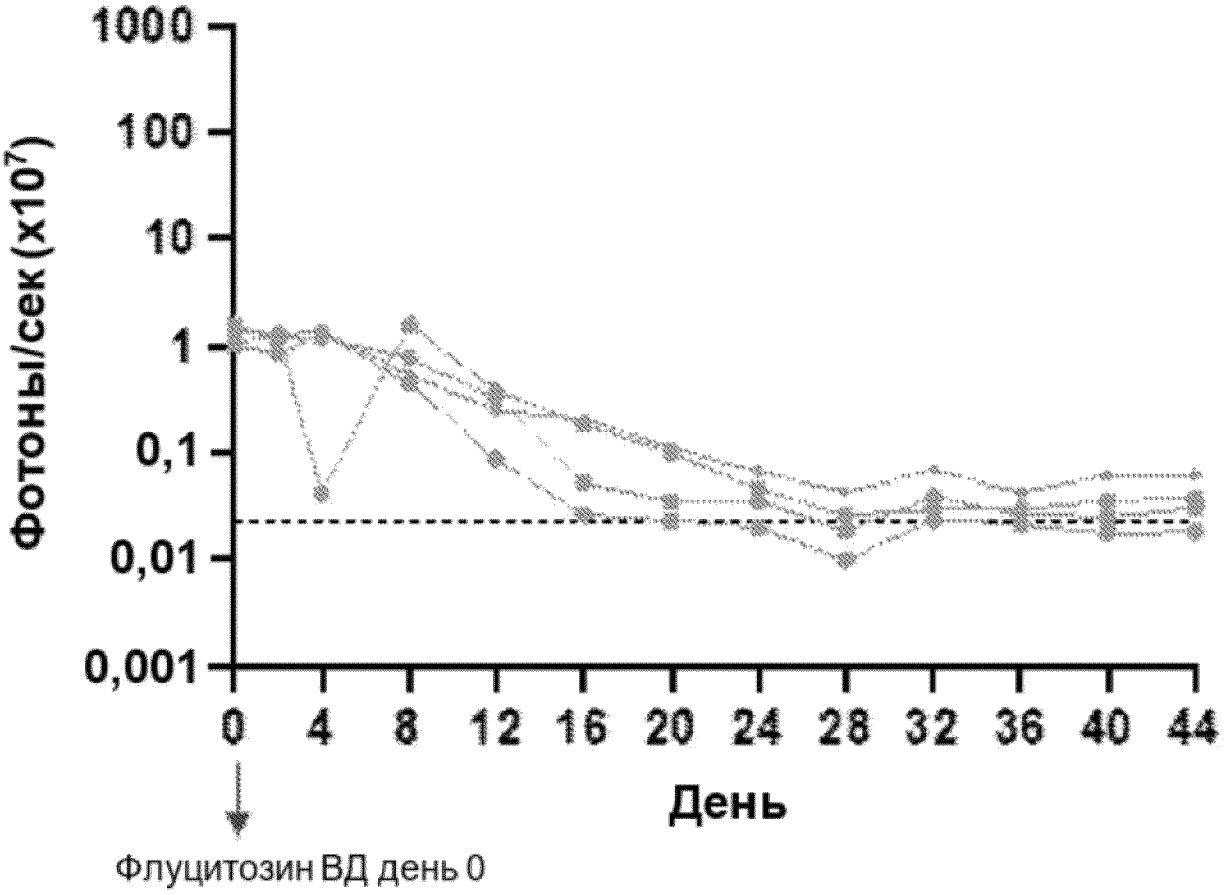
Фиг. 80B



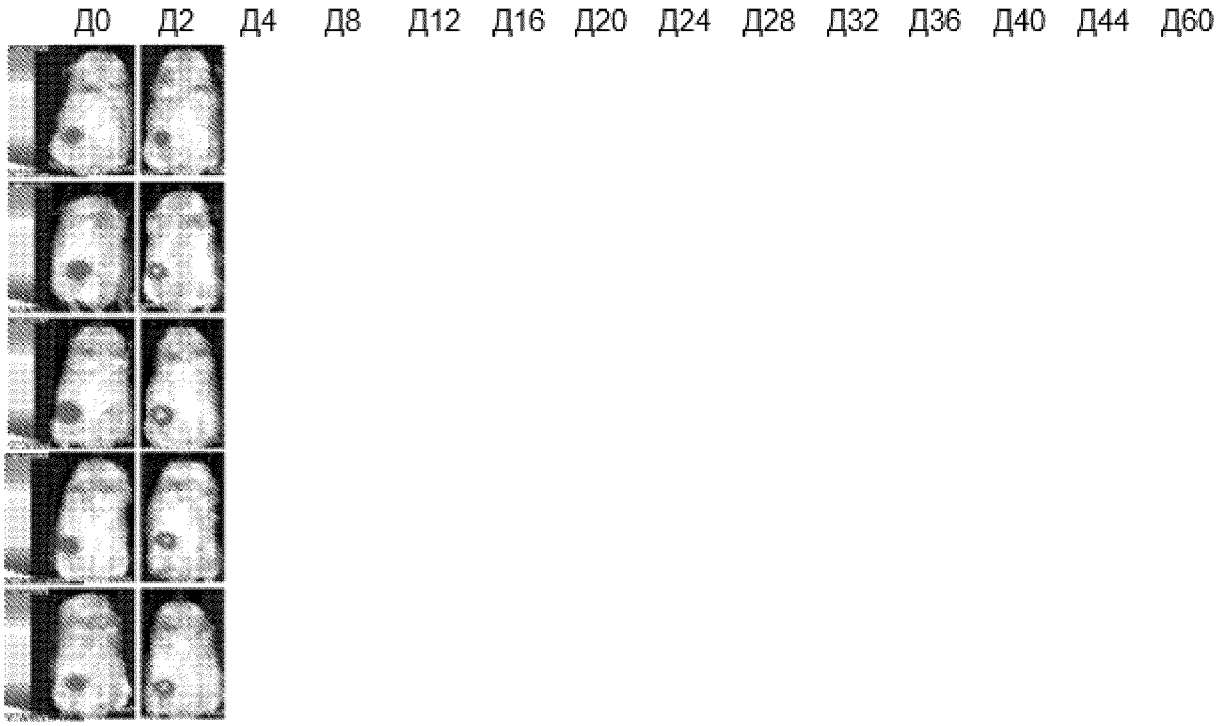
Фиг. 81A



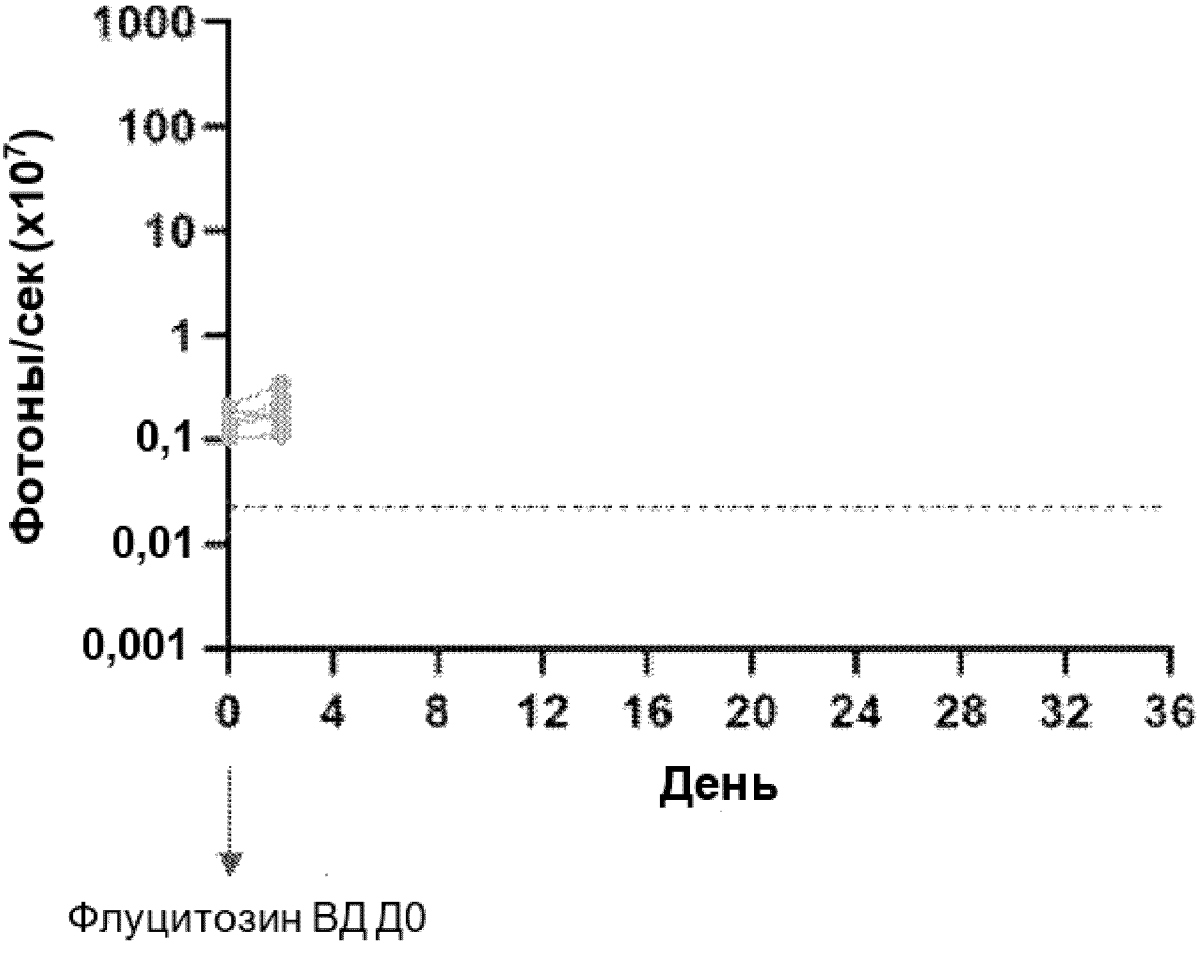
Фиг. 81B



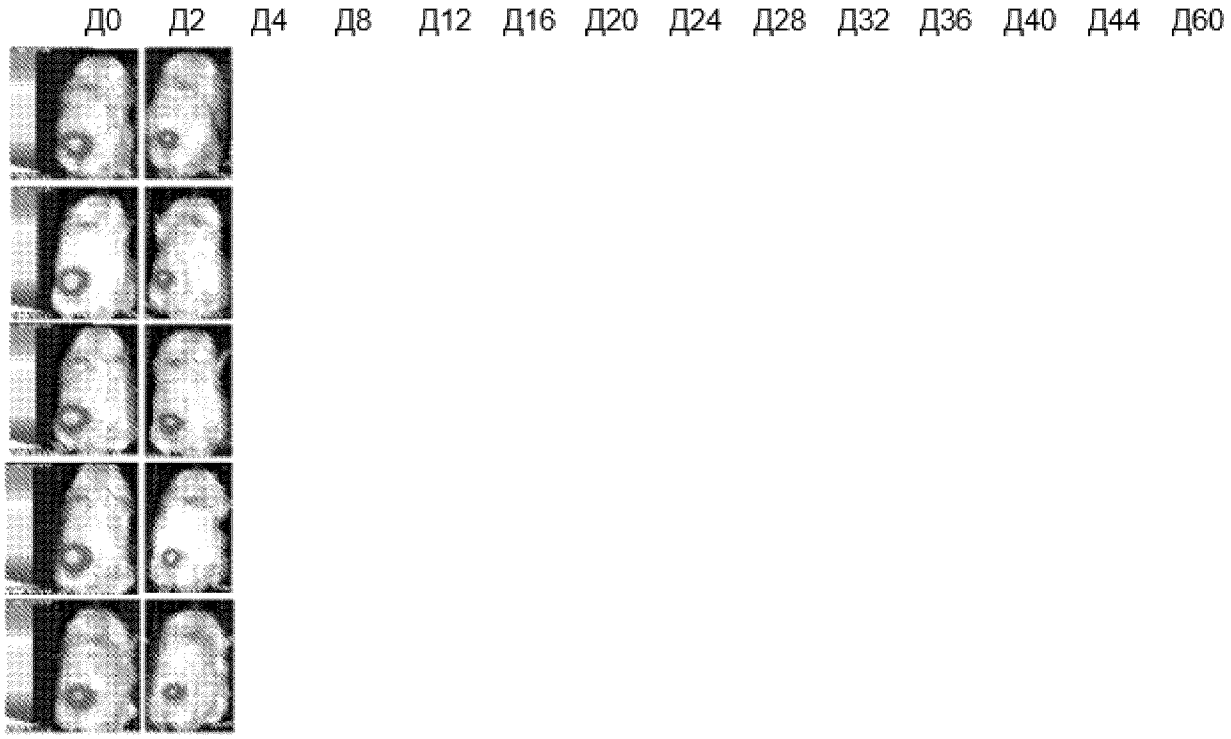
Фиг. 81C



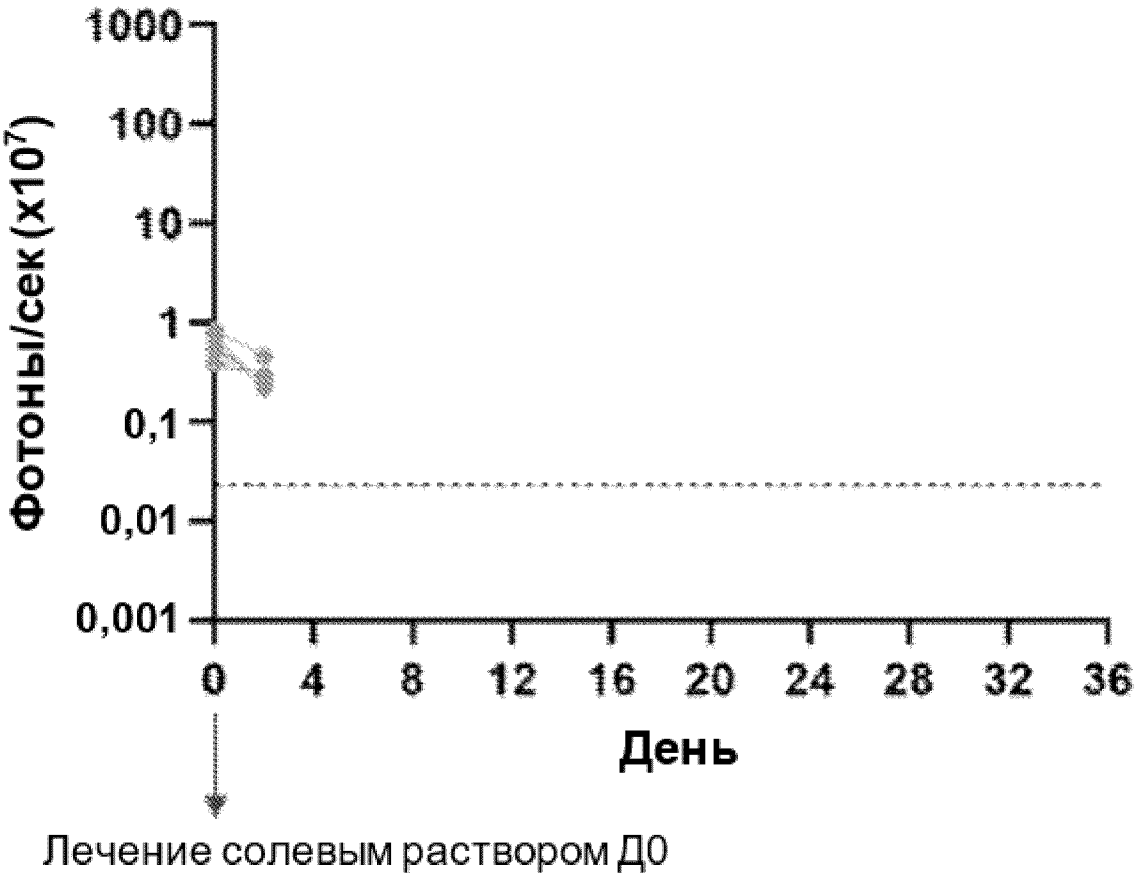
Фиг. 81D



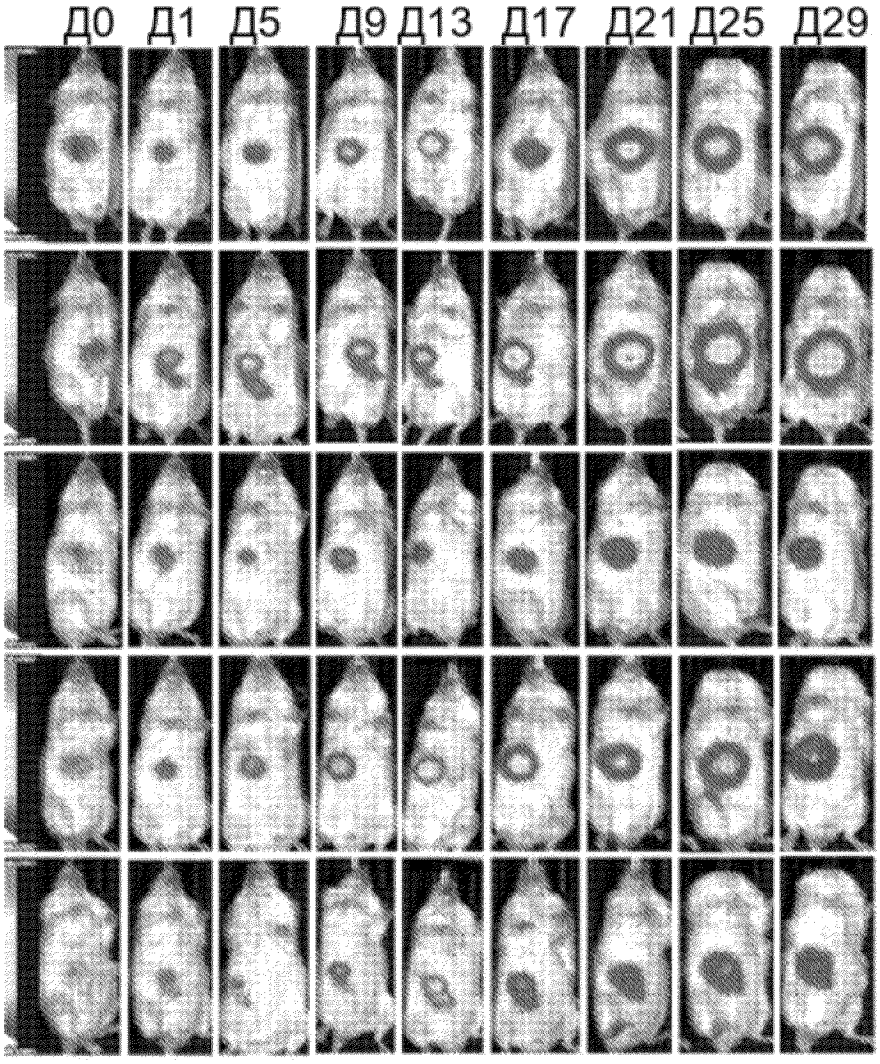
Фиг. 81E



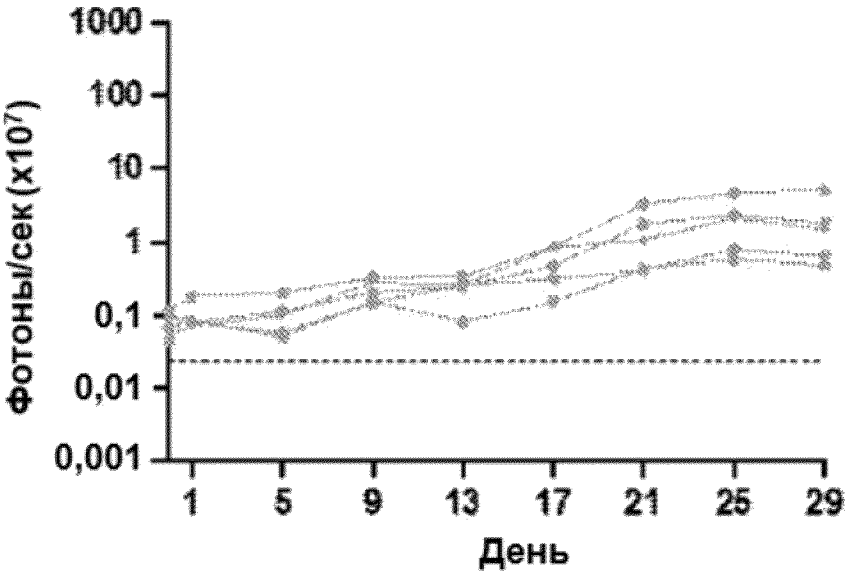
Фиг. 81F



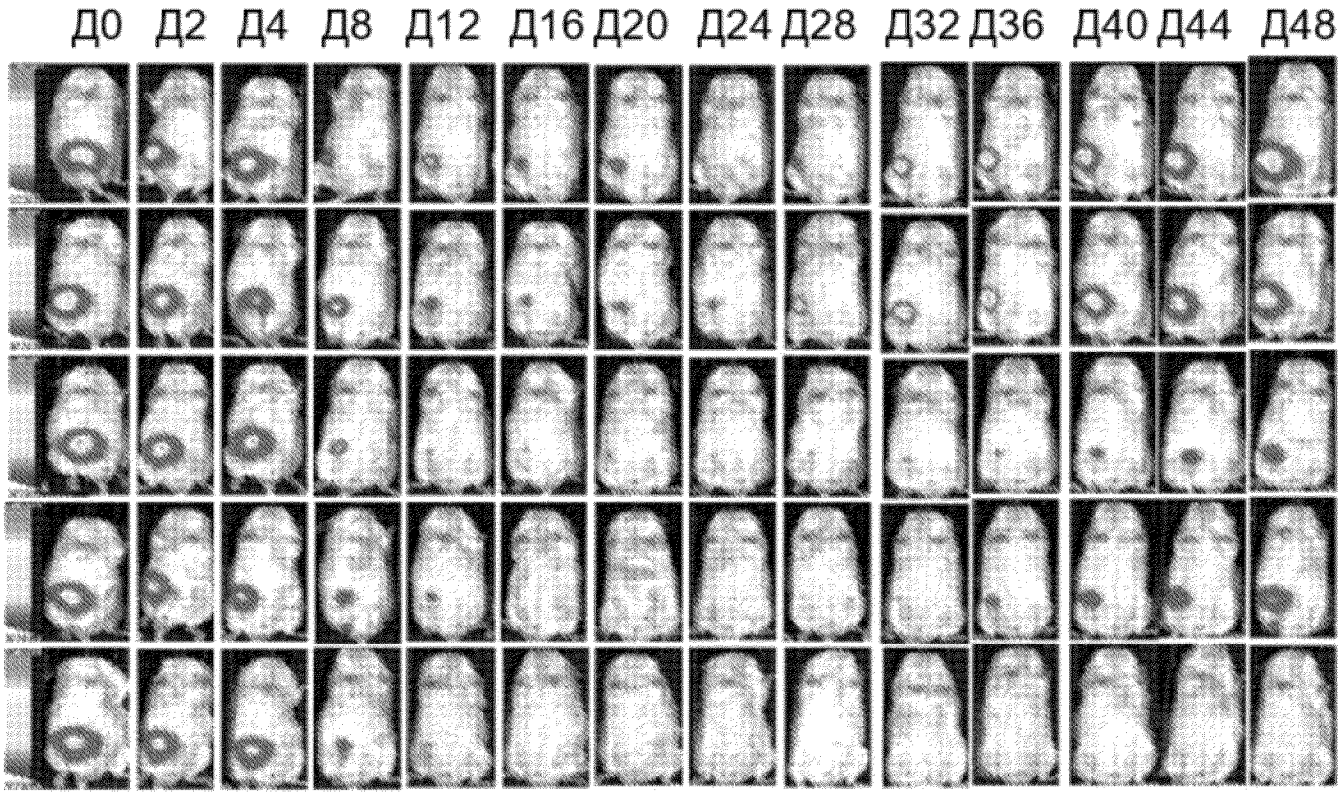
Фиг. 82A



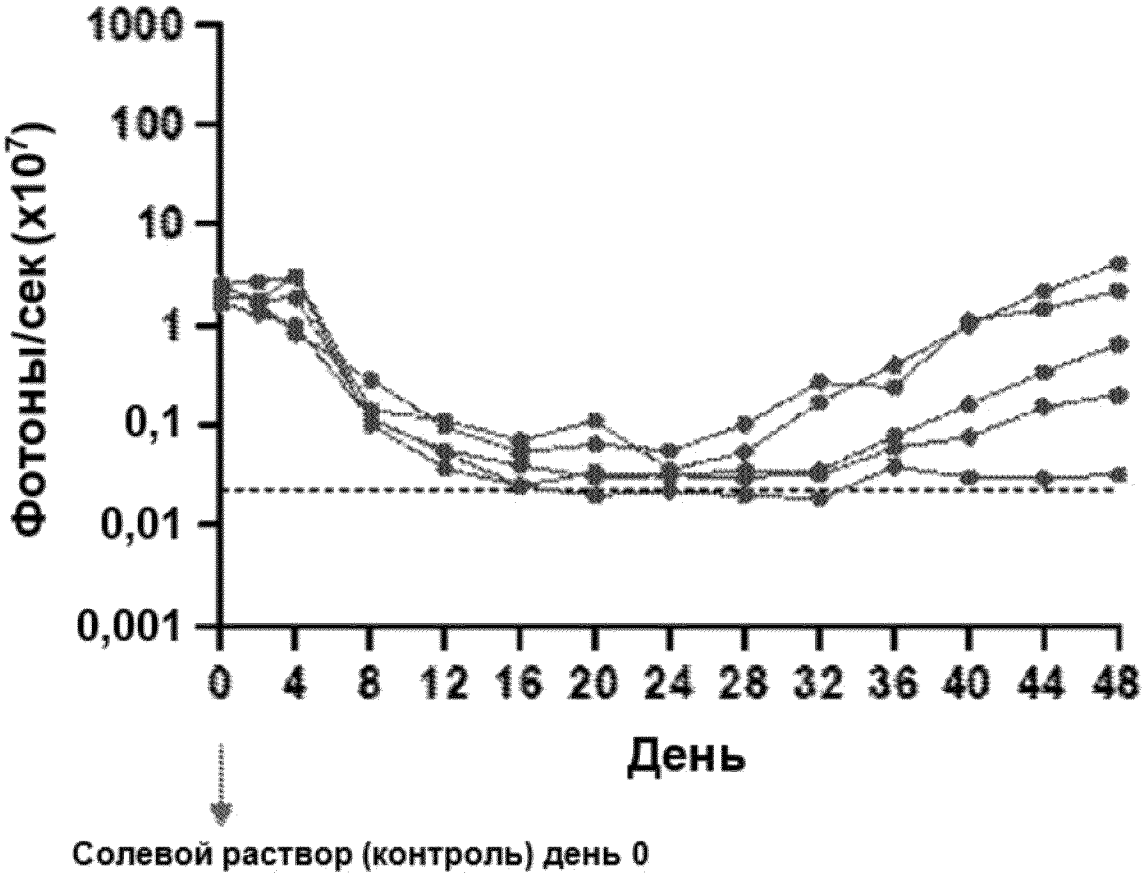
Фиг. 82B



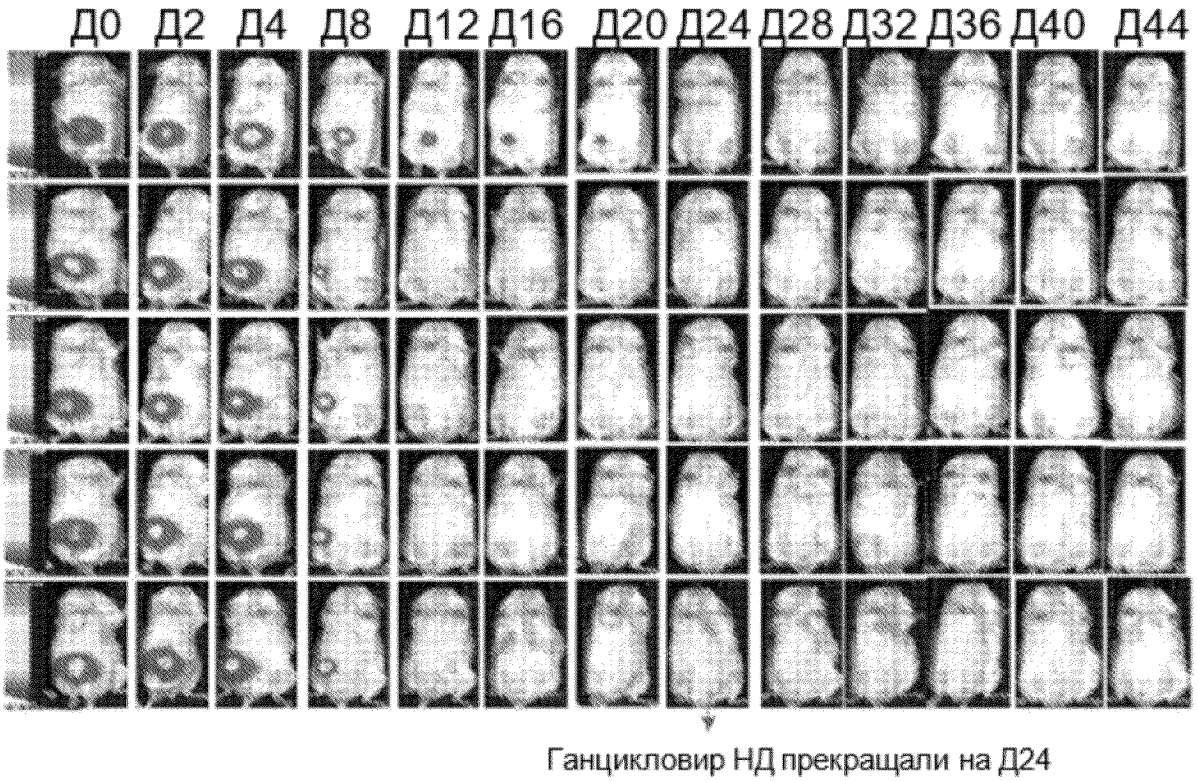
Фиг. 83A



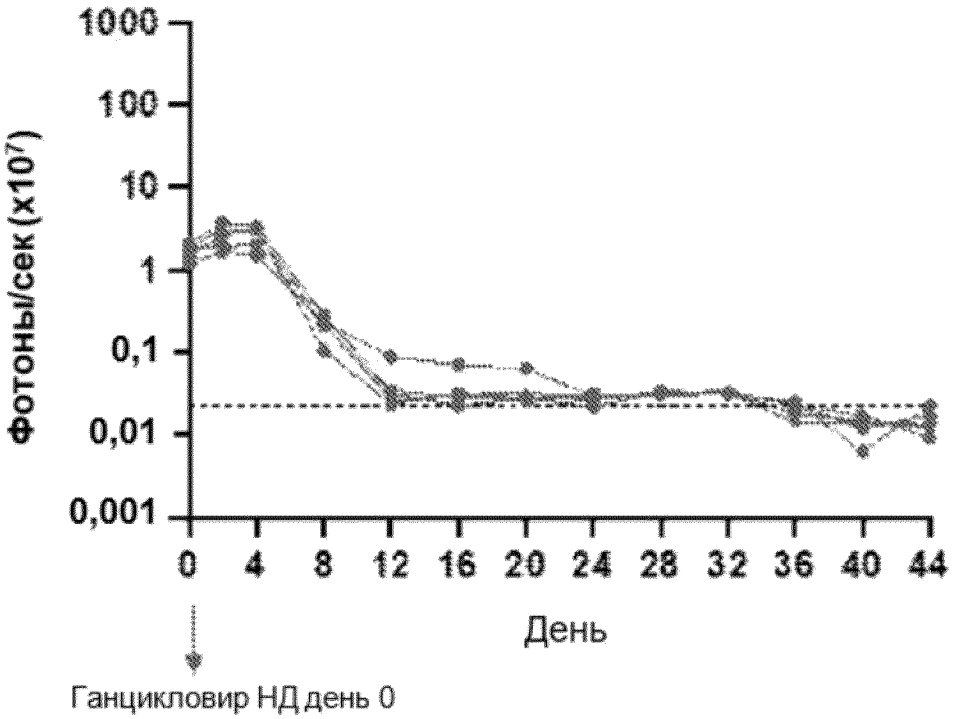
Фиг. 83B



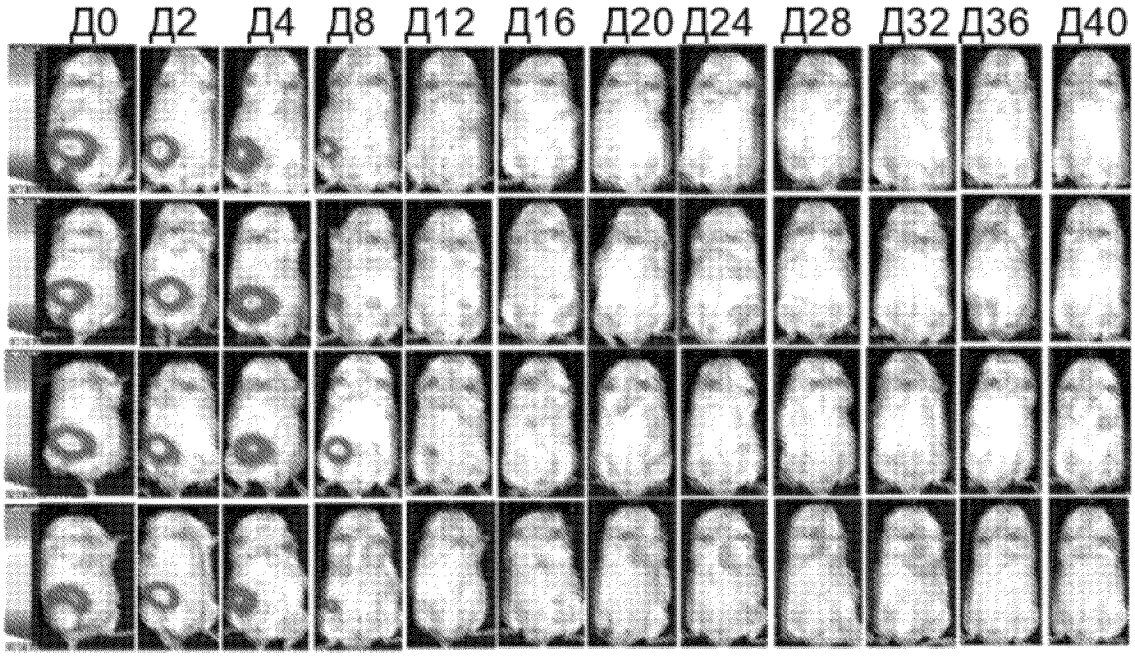
Фиг. 84A



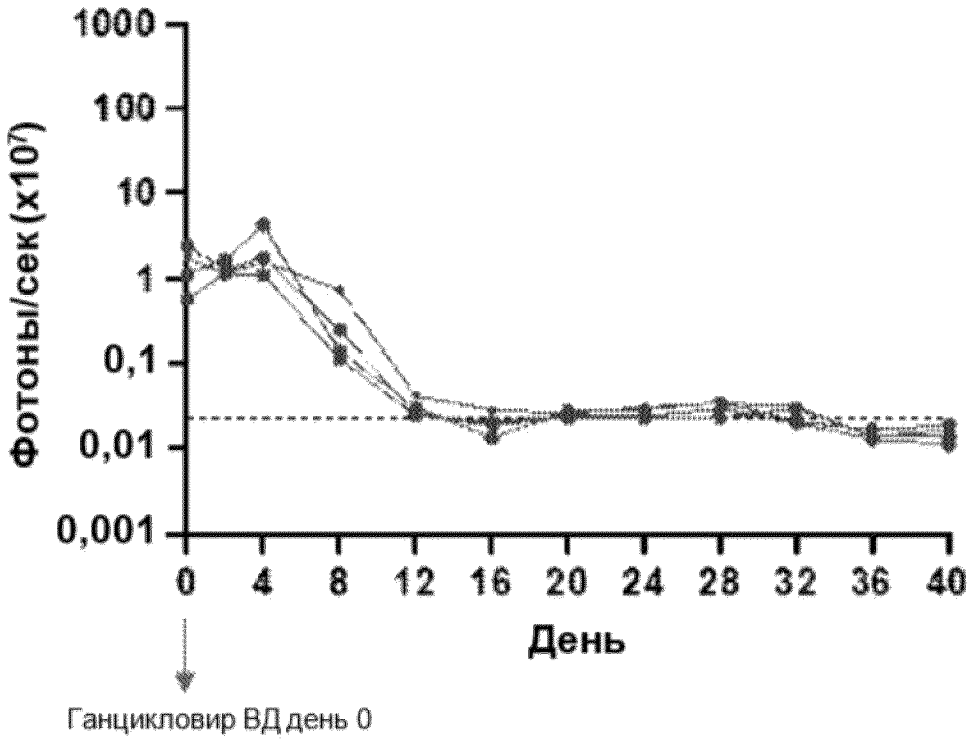
Фиг. 84B



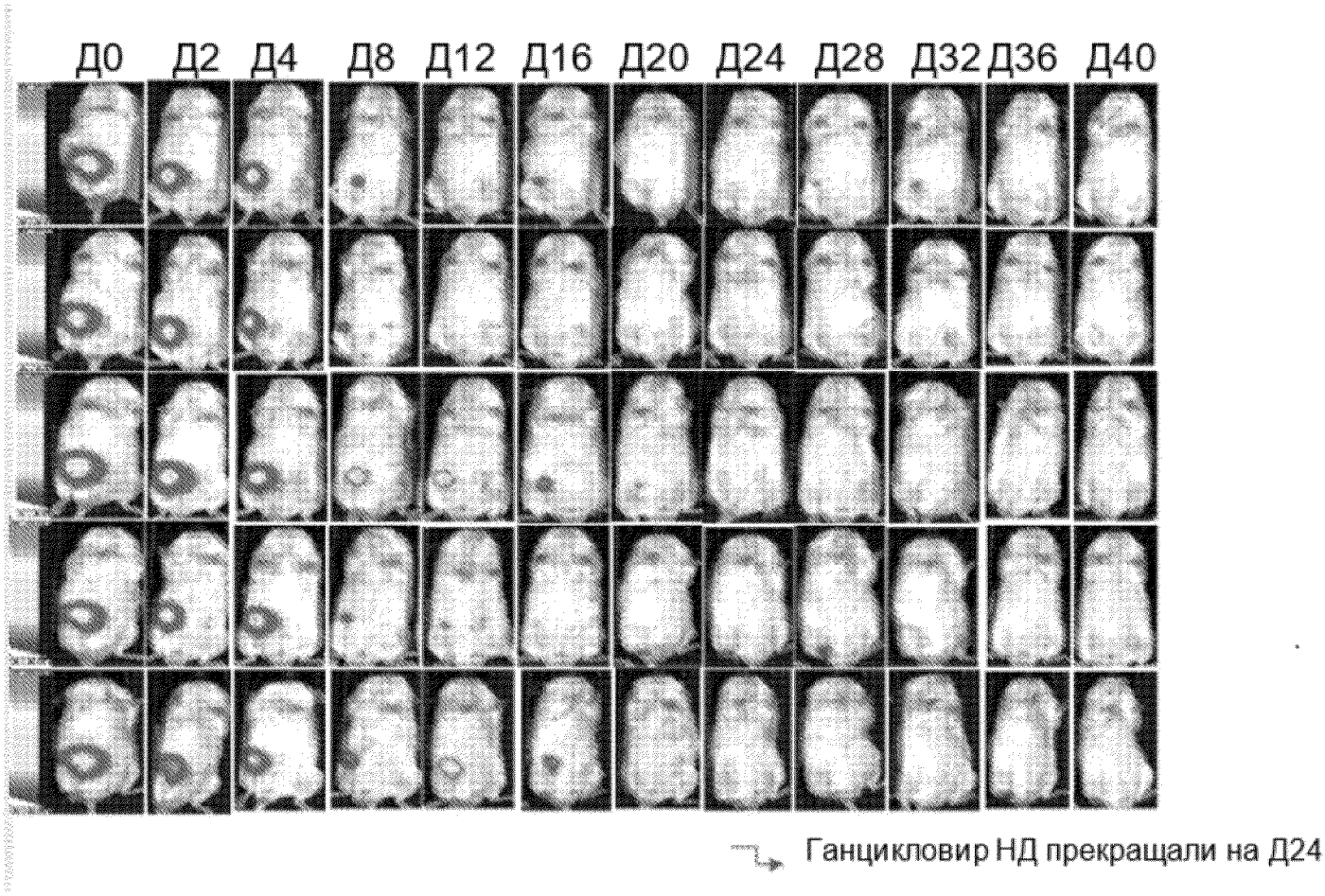
Фиг. 85A



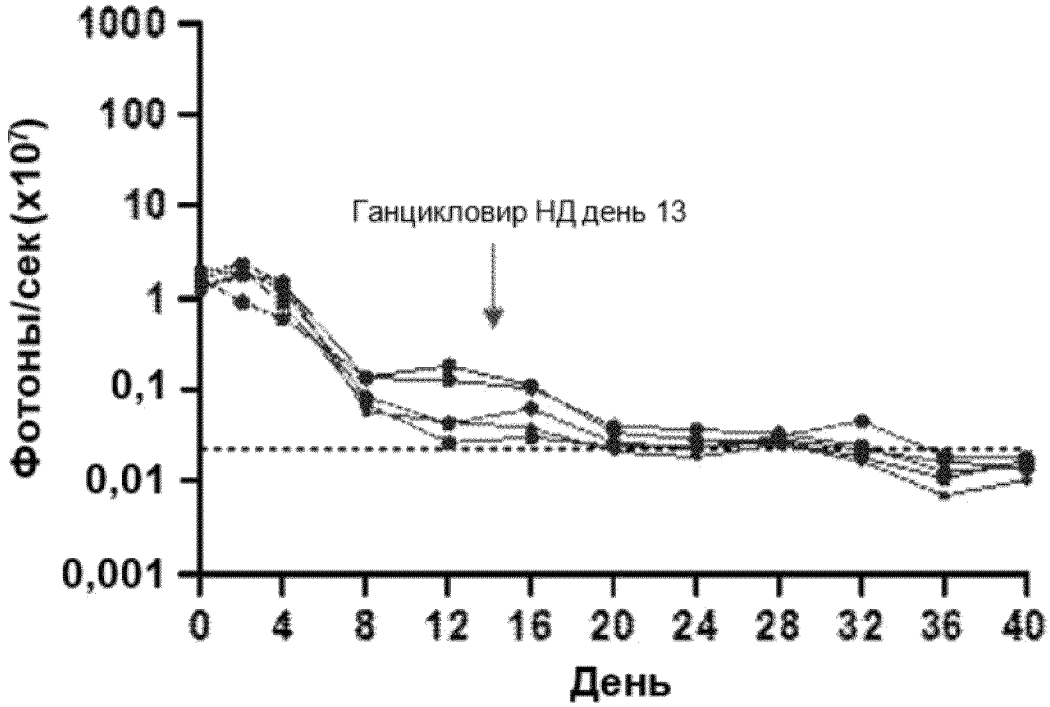
Фиг. 85B



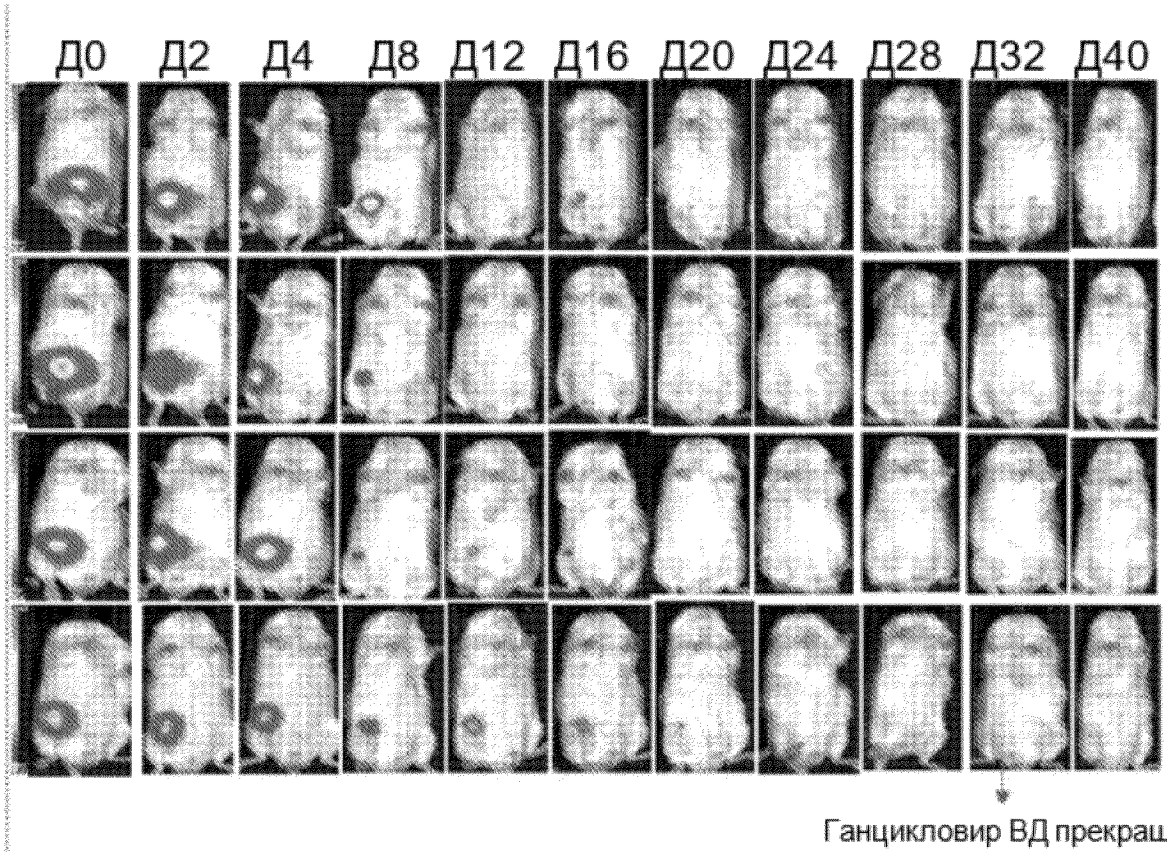
Фиг. 86A



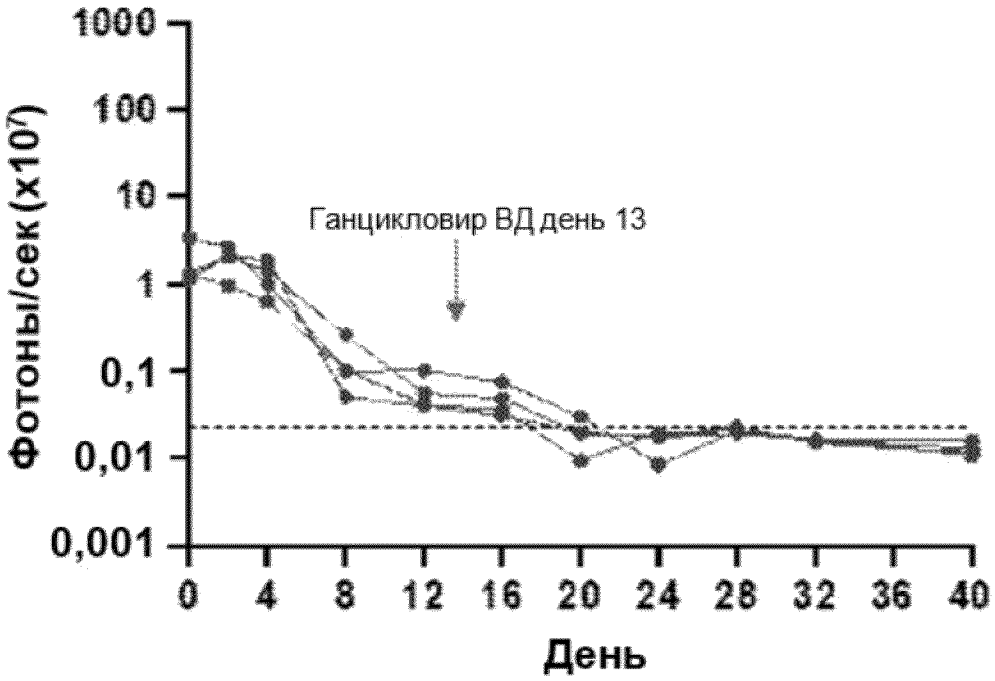
Фиг. 86B



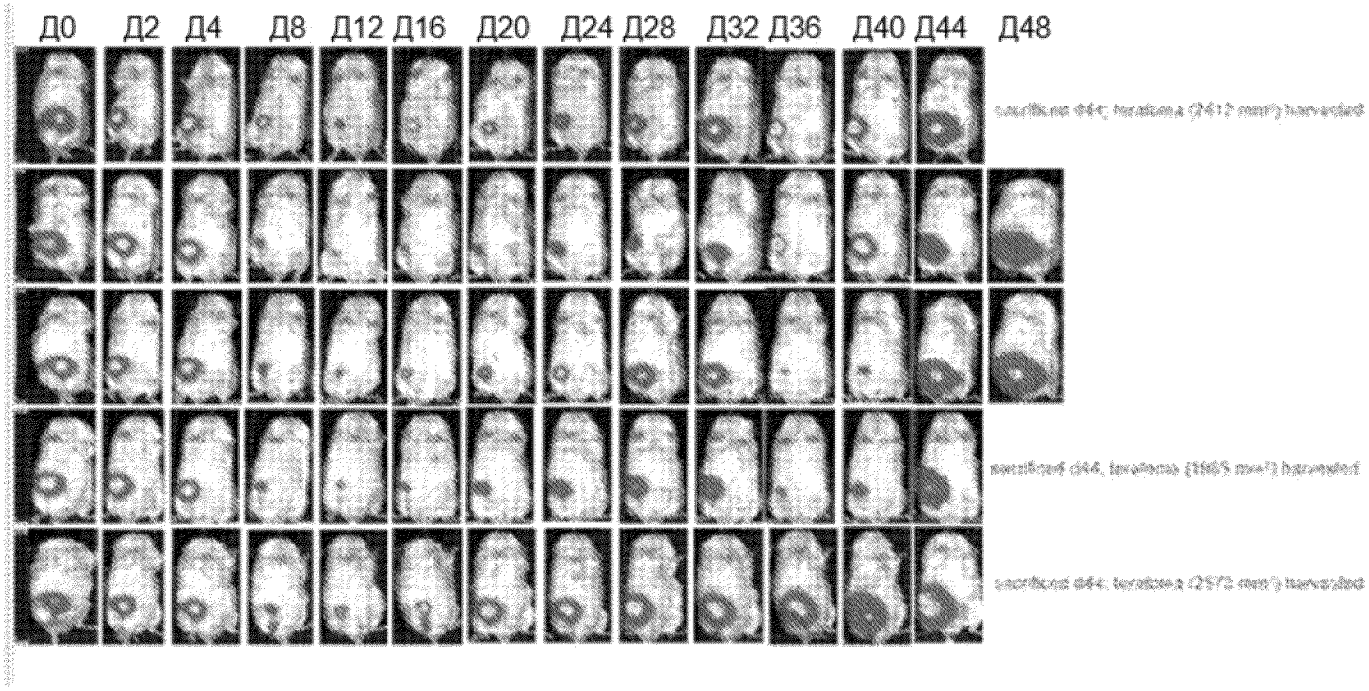
Фиг. 87A



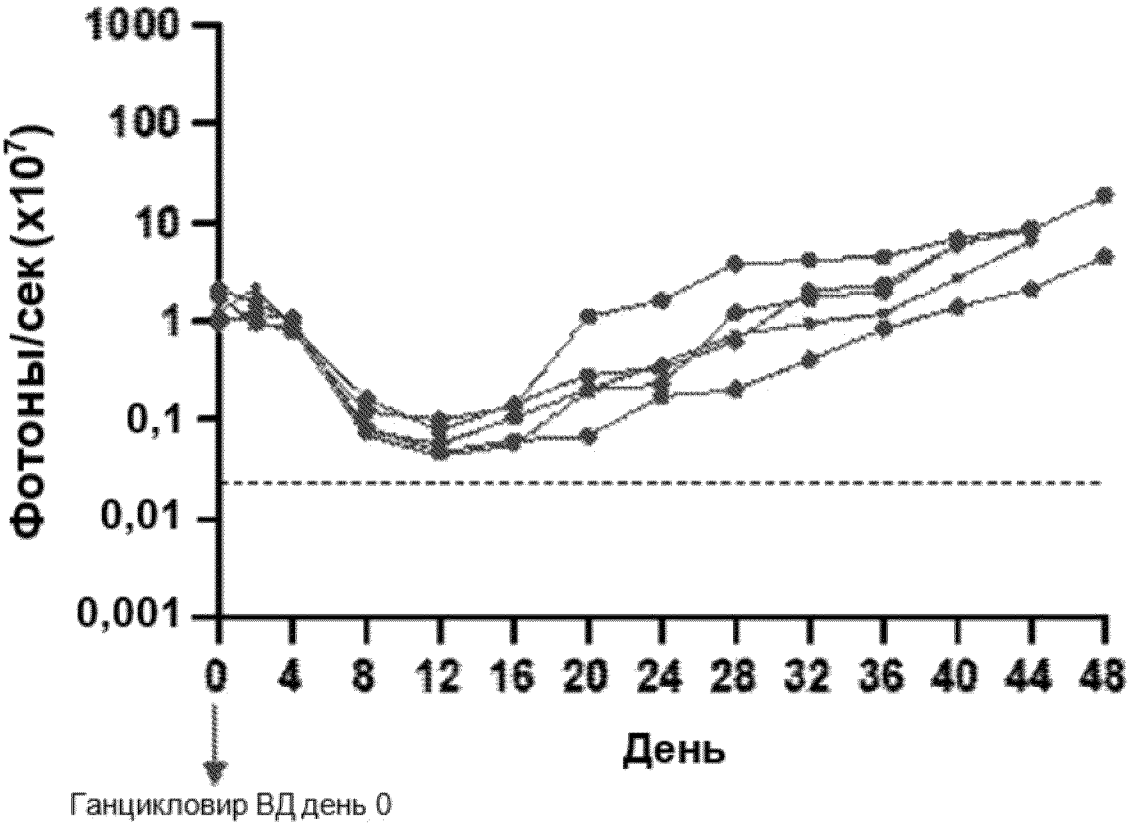
Фиг. 87B



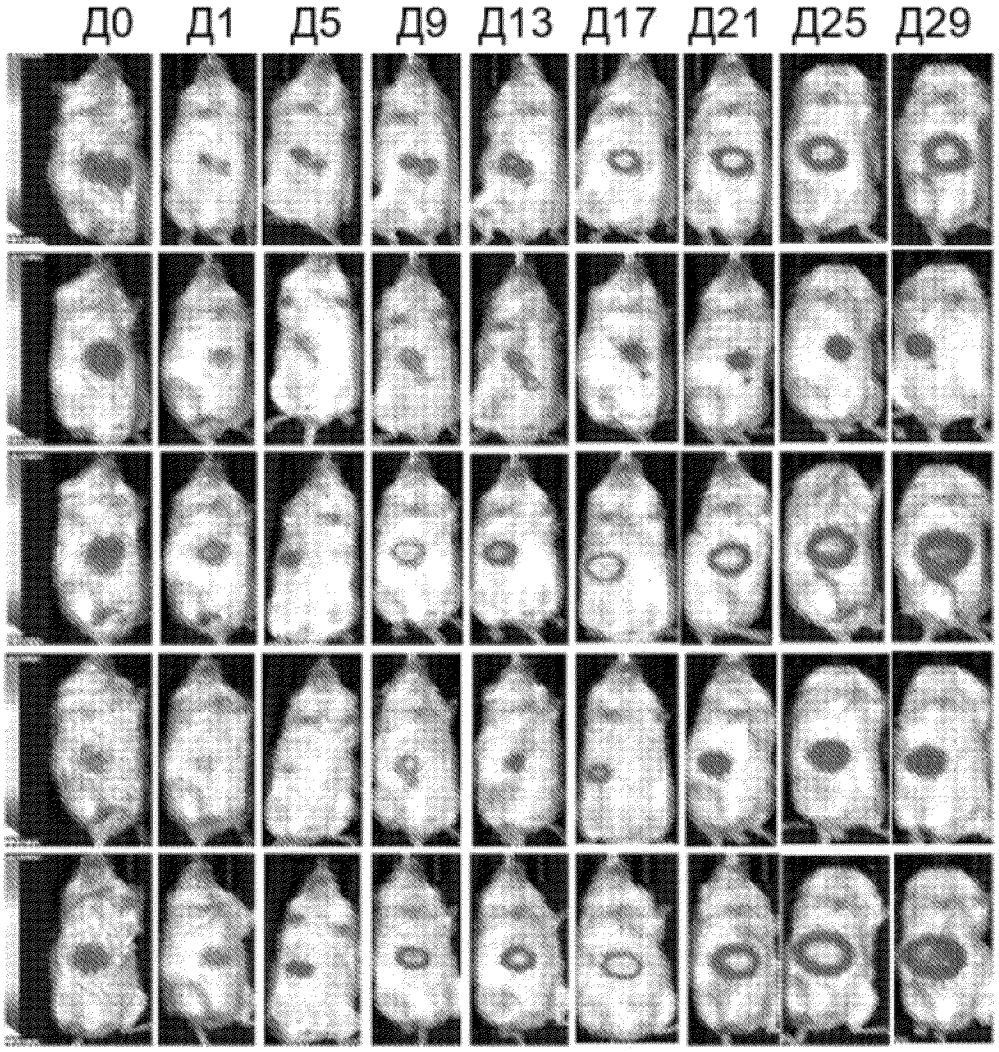
Фиг. 88A



Фиг. 88B



Фиг. 89A



Фиг. 89B